

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD GERMINATIVA DE SEMILLAS DE *Ilex*
paraguariensis DE DIFERENTES POBLACIONES NATIVAS DE URUGUAY

por

Lucía DEMICHELI AUDI

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2020

Tesis aprobada por:

Director:

Lic. Bioquim. (Mag.) Nicolás Glison

Ing. Agr. (Mag.) Silvia Ross

Ing. Agr. (Mag.) Pablo Hernández

Fecha: 4 de agosto de 2020

Autora:

Lucía Demicheli Audi

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, en especial a mi madre, mi padre y mi hermano, por el apoyo, el aliento y el amor incondicional de todos estos años.

A mi padre, por ser la máxima inspiración de este trabajo. Por contagiarme el amor por este tema y por su generosidad al compartir sus conocimientos adquiridos durante años de investigación propia.

A los amigos de toda la vida y a los muchos que me dio la carrera, gracias por haber hecho de estos años un disfrute.

A mis tutores, Nicolás Glison, Silvia Ross, Pablo Hernández y Pablo Speranza. Gracias por haberme permitido investigar sobre un tema desconocido. En especial a Nicolás por aceptar guiarme en este trabajo y hacerlo de forma incansable. Gracias por darle una oportunidad a la Yerba y por inspirar a sus alumnos.

A los compañeros del laboratorio de Fisiología Vegetal, a Joaquín Garrido y Gervasio Krismanich. Gracias por todas las manos dadas y las horas de trabajo compartidas.

A los productores que me permitieron entrar en sus quebradas a cosechar semillas: Benedict Dupin y Álvaro Farina, así como a Andrés Berruti por guiarme en Tacuarembó. Gracias por haber conservado y mantenido las poblaciones de manera que hoy tengamos algo para estudiar y continuar conservando.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. OBJETIVOS	1
1.1.1. <u>Objetivo general</u>	1
1.1.2. <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. IMPORTANCIA CULTURAL Y ECONÓMICA	3
2.1.1. <u>Antecedentes del cultivo en Uruguay</u>	4
2.2. CARACTERÍSTICAS DE <i>Ilex paraguariensis</i>	5
2.2.1. <u>Descripción botánica</u>	5
2.2.2. <u>Distribución geográfica natural</u>	6
2.2.3. <u>Variabilidad genética y biogeografía</u>	6
2.2.4. <u>Propagación de <i>I. paraguariensis</i></u>	7
2.3. DORMICIÓN DE SEMILLAS	8
2.3.1. <u>Dormición morfofisiológica</u>	9
2.3.2. <u>Factores ambientales que afectan la dormición morfofisiológica</u> ...	10
2.3.3. <u>Evidencias sobre dormición y germinación en <i>I. paraguariensis</i></u>	12
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	14
3.1. COLECTA Y PROCESAMIENTO DE FRUTOS	14
3.2. ENSAYO DE GERMINACIÓN.....	15
3.3. CRECIMIENTO DE LOS EMBRIONES.....	15
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
3.4.1. <u>Viabilidad y germinación</u>	16
3.4.2. <u>Longitud de embriones</u>	17

4. <u>RESULTADOS</u>	18
4.1. COLECTA Y PROCESAMIENTO DE LOS FRUTOS.....	19
4.2. ENSAYO DE GERMINACIÓN.....	19
4.2.1. <u>Viabilidad</u>	19
4.2.2. <u>Germinación</u>	20
4.3. CRECIMIENTO DE LOS EMBRIONES.....	23
5. <u>DISCUSIÓN</u>	25
5.1. VIABILIDAD Y GERMINACIÓN.....	25
5.2. CRECIMIENTO DE LOS EMBRIONES.....	27
6. <u>CONCLUSIONES</u>	29
7. <u>RESUMEN</u>	30
8. <u>SUMMARY</u>	31
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	32
10. <u>ANEXOS</u>	39

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Fecha de cosecha y porcentaje de frutos cosechados en cada estado de madurez para cada individuo.....	19
2. Momentos en que se realizaron las mediciones de los embriones según el número de semanas que las semillas estuvieron en las condiciones de germinación (20/30°C), para cada población y tratamiento de estratificación.....	23
Figura No.	
1. Ubicación de las poblaciones colectadas.....	14
2. Clasificación de los estados de madurez de los frutos colectados según el color del fruto.....	18
3. Porcentaje de viabilidad de semillas luego de un año a 20/30°C para cada individuo de las tres poblaciones.....	20
4. Porcentaje de semillas germinadas luego de un año a 20/30°C en función de las semillas viables para cada individuo de las tres poblaciones.....	22
5. Boxplot con el tamaño (mm) de los embriones medidos de cada población, en cada momento de medición (1, 2 y 3), de semillas que no tuvieron estratificación.....	24

1. INTRODUCCIÓN

La yerba mate es un producto elaborado a partir de las hojas de *Ilex paraguariensis*, que se consume tradicionalmente como bebida fría o caliente en Sudamérica. En Uruguay, el consumo de yerba mate es quizás una de las costumbres más arraigadas a la cultura, tanto que es el país con mayor consumo de yerba mate per cápita del mundo. La zona central de distribución natural de *I. paraguariensis* es el Sur de Brasil, el Sureste de Paraguay y la provincia de Misiones en Argentina. Sin embargo aparece también de forma natural en determinadas áreas del territorio uruguayo, zonas de quebrada con alta riqueza específica. Existe evidencia de que estas poblaciones de *I. paraguariensis* presentan un pool génico diferente al de la distribución central de la especie, y que incluso presentan diferencias entre sí por haber estado aisladas durante mucho tiempo (Cascales et al. 2014, Hernández 2019). Debido a esto, estas poblaciones son una importante reserva de diversidad genética que es importante conocer y conservar.

Tanto para posibles programas de producción, mejoramiento genético o para la conservación de los recursos locales, es importante saber cómo reproducir la especie, ya sea de manera vegetativa o sexual. La reproducción a través de semilla es la más utilizada a nivel productivo, si bien presenta importantes limitantes, como un bajo porcentaje de germinación y un largo periodo para que comience a germinar, explicado principalmente por la clase de dormición que presenta. A nivel productivo y académico se han probado diferentes técnicas para superar dichas limitantes. Actualmente se tiene un mejor entendimiento de la dormición en general, lo que permite escoger mejor los factores relevantes para estudiar la dormición en esta especie.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad germinativa de semillas de *I. paraguariensis* de diferentes poblaciones nativas representativas del área de distribución de la especie en Uruguay.

1.1.2. Objetivos específicos

i) Comparar el comportamiento germinativo de semillas de *I. paraguariensis* provenientes de diferentes poblaciones nativas, representativas del área de distribución en Uruguay.

ii) Identificar condiciones y tratamientos que promuevan la salida de la dormición de semillas a partir de tratamientos ya utilizados en la práctica agronómica y la investigación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTANCIA CULTURAL Y ECONÓMICA

La yerba mate se consume en Sudamérica desde tiempos inmemoriales. Los primeros registros que existen son de mediados del siglo XVI. Sacerdotes y naturalistas observaron el consumo de una infusión en una calabaza a partir de hojas molidas por parte de la macroetnia Tupí-Guaraní en la región de Guairá (actual estado de Paraná, Brasil). En épocas previas a la conquista la yerba mate se habría expandido por todo el continente a través del trueque, llegando a los Mapuches y Araucanos en el Sur de Chile, o hasta los Quechuas en Bolivia y Perú. En el territorio uruguayo habitaban las macroetnias Charrúa y Tupí-Guaraní, que ante la escasez de yerbales naturales en el territorio dependían del trueque con los guaraníes de regiones del Norte. Los conquistadores apreciaron la acción estimulante de la bebida y su consumo se extendió rápidamente, lo que llevó en un principio a la explotación de yerbales naturales y posteriormente a la implantación de yerbales en zonas próximas a las misiones. La importación de este producto en Uruguay continuó con los conquistadores, que ya habían incorporado el hábito del consumo de yerba mate (Ricca, 2003).

En la actualidad las zonas productoras de yerba mate son los estados de Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul en Brasil (Tormen, 1995), las provincias de Misiones y Corrientes en Argentina (Navajas, 1995), y el departamento de Itapúa, en el Sureste de Paraguay. Argentina es actualmente el mayor productor y exportador de este producto, pero hasta la década de 1920 su producción era escasa y se importaba la totalidad de la yerba mate consumida. El cambio se dio con la creación de la actual Estación Experimental Agropecuaria de Cerro Azul del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, donde se concentró la investigación y promoción de tecnología sobre la yerba mate. Hoy en día en Argentina prácticamente no quedan poblaciones naturales y el 100% de la producción se da en yerbales implantados, manejados de manera intensiva con mucha aplicación de tecnología. Por otro lado en Brasil, el segundo país productor, el 90% de la yerba mate producida proviene de montes nativos, con menor incorporación de tecnología, lo cual en ocasiones resulta en un manejo deficiente de los montes (Daniel, 2009).

Uruguay siempre ha sido importador de este producto. Se importan aproximadamente 31.000 ton de yerba elaborada por año, lo que implica alrededor de U\$S 70.000.000 (MEF. DNA, 2018). Del volumen total importado, 95% proviene de Brasil, mientras que el 5% restante se importa desde Argentina y Paraguay. Se estima que 8 de cada 10 uruguayos toman mate, y se consumen

alrededor de 9 Kg per cápita por año, lo que corresponde al mayor nivel de consumo del mundo (Dutour, 2013).

2.1.1. Antecedentes del cultivo en Uruguay

La existencia de árboles de yerba mate en el territorio uruguayo fue registrada en el siglo XIX por naturalistas y botánicos como Dámaso Antonio Larrañaga, Aimé Bonpland y José Arechavaleta. Tradicionalmente, propietarios y vecinos explotaron durante décadas estos yerbales para su autoconsumo (Tomé 1952, Uruguay tiene...., 1965). Hace al menos 100 años que se debate la viabilidad de la producción de yerba mate en Uruguay (Posibilidades de...., 1965), sin embargo, los esfuerzos que se han hecho para la investigación o producción de este producto han sido aislados y de poca relevancia. En 1963, el entonces diputado Julio C. da Rosa pronunció en la cámara de representantes un extenso discurso en el que explicó las posibilidades de cultivo y explotación de yerbales en el país, en especial en el departamento de Treinta y Tres. También presentó un proyecto de ley que no se aprobó, el cual proponía que “se declare de interés nacional el cultivo y aprovechamiento de la especie *Ilex paraguariensis* y la fabricación de yerba mate”, así como medidas para facilitar la producción, investigación y extensión del rubro. En 1965 la Junta Honoraria Forestal creó una comisión para estudiar y promover la producción de yerba mate, presidida por el botánico Atilio Lombardo, pero no hay registros de que haya cumplido sus objetivos.

En la década de los 60 se dieron discusiones muy parecidas a las que se dan actualmente en la sociedad, y en ambas ocasiones los disparadores fueron el aumento del precio y la dependencia del mercado brasileño para el abastecimiento (Uruguay tiene...., 1995). Recientemente este debate se dio en el año 2013 cuando el precio aumentó un 46% en un año (Dutour, 2013). En ambas ocasiones, se introdujo en el debate la existencia de árboles de yerba mate nativos y se discutió sobre si sería o no viable su explotación comercial. Los argumentos mayoritarios son desalentadores como que el clima o el suelo no serían propicios, que el sabor del producto final no sería el mismo, o que no sería viable económicamente. Sin embargo en ninguna de las dos oportunidades se llegó a alguna conclusión sobre la posibilidad de producir yerba mate en Uruguay.

Actualmente, en los departamentos de Treinta y Tres y Rocha existen productores que llevan a cabo proyectos de multiplicación y producción de plantas de yerba mate bajo el sistema de agrofloresta de manera exitosa. El emprendimiento de Treinta y Tres comenzó en el año 2006 y cuenta con árboles

de 4 a 6 metros de altura.¹ A nivel institucional, INIA Tacuarembó tiene una línea de investigación de especies forestales nativas de interés, en el que se incluye a *Ilex paraguariensis* (Bennadji et al., 2017), y en la Facultad de Agronomía se estudió la estructuración geográfica de la variabilidad genética de las poblaciones naturales de Uruguay (Hernández, 2019), y la capacidad de propagación sexual y asexual (Ross, 2017).

2.2. CARACTERÍSTICAS DE *Ilex paraguariensis*

2.2.1. Descripción botánica

Ilex paraguariensis pertenece a la familia Aquifoliaceae que está constituida por cuatro géneros, entre los cuales *Ilex* es el de mayor relevancia económica y en cantidad de especies. Este género presenta una distribución cosmopolita, con una mayor concentración en los trópicos que se extiende hacia regiones templadas. Se estima que hay más de 600 especies de *Ilex* en el mundo, de las cuales alrededor de 200 se encuentran en América Central y Sudamérica, una cantidad similar en China y el Sudeste asiático (Giberti, 1995), y algunas pocas especies en Europa, África y Australia tropical (Manen et al., 2002).

Ilex paraguariensis es un árbol que alcanza alturas de 15 a 18 m y diámetros de hasta 80 cm. Su tronco presenta corteza pardo-grisácea que se desprende en escamas. De copa globosa y follaje persistente, presenta hojas simples, alternas, glabras, coriáceas, obovadas a largamente obovadas, con margen aserrado (Giberti 1994, Brussa y Grela 2007). Son árboles dioicos, las flores femeninas con ovario globoso, con 4 a 5 óvulos. La floración ocurre de octubre a diciembre. El inicio de la fructificación se da desde fines de octubre hasta fines de diciembre, mientras que la maduración ocurre de febrero a mayo (Sousa et al. 2003, Pires et al. 2014). El fruto es una baya roja a violeta oscura al madurar, de 0,4 a 0,55 cm de diámetro, con el mesocarpo carnosos y el endocarpo endurecido. Cada fruto contiene 4 a 5 pirenos, formados por la semilla botánica más el endocarpo leñoso, y miden aproximadamente 4mm de longitud y 3 mm de ancho (Heuser et al. 1993, de Araújo Mariath et al. 1995).

¹Demicheli, A. 2016. Com. personal.

2.2.2. Distribución geográfica natural

El área de distribución de *Ilex paraguariensis* se extiende desde el Sur de Minas Gerais (Brasil), hasta zonas aisladas del departamento de Maldonado (Uruguay) como límite Sur. Al Este el límite es la Sierra do Mar (Brasil), mientras que al Oeste llega a la provincia de Misiones (Argentina), a la zona Este de Paraguay y Sureste de Matto Grosso en Brasil (Grondona, 1954). Los límites del área central de distribución se establecen entre 21° y 30°S de latitud, y 48° y 56°W de longitud (Malheiros de Oliveira y Rotta 1985, Aranda 1986). Por fuera de esta área aparece en lugares aislados, como el caso de las poblaciones de Uruguay, que se encuentran entre las latitudes 31°38' y 34°15'S y longitudes 54°25' y 56°02'W (Cascales et al., 2014).

El territorio uruguayo se encuentra dentro de la provincia fitogeográfica de la Pampa, la cual se caracteriza por presentar “campos” o pastizales con abundancia de especies gramíneas y ausencia de árboles (Cabrera y Willink, 1973). Sin embargo, la presencia de especies arbóreas y arbustivas es notoria en algunas zonas del país que pueden diferenciarse en dos zonas fitogeográficas diferentes: la flora oriental y la flora occidental. Las especies arbóreas de la flora oriental se caracterizan por pertenecer en su mayoría a la provincia fitogeográfica paranaense, la flora del Sur de Brasil. En Uruguay, *Ilex paraguariensis* se encuentra en toda la zona oriental, que se conforma a su vez por dos áreas disjuntas: el Noreste de Tacuarembó y Rivera por un lado, y un arco que va desde las Sierras de Aceguá hasta las Sierras de la Ballena y de las Ánimas, pasando por Treinta y Tres, Lavalleja y Rocha. Se trata de áreas geomorfológicas complejas, compuestas por montes de quebrada y serranías, que ocupan en general zonas bajas y húmedas, abrigadas por las laderas y se consideran núcleos de alta riqueza específica (Grela, 2004).

2.2.3. Variabilidad genética y biogeografía

La biogeografía estudia la distribución espacial y temporal de las especies mediante varios enfoques. Uno de los factores que considera son los cambios climáticos a los que estuvieron expuestas las especies. Ante un cambio climático las especies suelen retraer su distribución, y en los límites de esta retracción pueden quedar relictos o refugios: poblaciones que persisten en enclaves aislados con clima adecuado, rodeados por áreas con condiciones que no permiten la existencia de la especie (Hampe y Jump, 2011). El aislamiento implica que hay barreras tanto físicas como biológicas que impiden el flujo génico durante un largo periodo de tiempo, por lo que estas poblaciones suelen presentar una fuerte estructuración genética intrapoblacional y fuertes diferencias

genéticas entre ellas (Hampe y Petit, 2005). Estos refugios son importantes reservas de diversidad genética por la adaptación a las condiciones locales, así como también pueden ser una importante fuente de información sobre el comportamiento de las especies ante el inminente cambio climático (Hampe y Petit, 2005).

En Uruguay se ha encontrado en especies herbáceas una fuerte estructuración dentro de las poblaciones que sugiere la existencia de refugios en las serranías del Este (Cerro Largo, Treinta y Tres, Lavalleja y Maldonado) y en el extremo Norte de la Cuchilla de Haedo (Salto, Tacuarembó y Rivera) (Vaio 2000, Speranza 2005, Speranza et al. 2007, Turchetto et al. 2014). En cuanto a especies leñosas, también se ha detectado estructuración de la variabilidad genética de las poblaciones naturales de *Eugenia uniflora* (Jolochin, 2017), cuya distribución es muy similar a la de *I. paraguariensis*.

La variabilidad genética dentro de las poblaciones de *I. paraguariensis* en la región central de distribución es alta, pero las diferencias entre poblaciones son bajas (Gauer y Cavalli-Molina, 1999). En las poblaciones de Uruguay la diversidad genética respecto a dicha región es menor, pero presentan alelos que no están presentes en la región central (Cascales et al., 2014). Recientemente se ha demostrado que existe una fuerte estructuración de la variabilidad haplotípica de estas poblaciones, que poseen haplotipos que no están presentes en las poblaciones estudiadas de la región central de distribución (Hernández, 2019). Dentro de las poblaciones de *I. paraguariensis* de Uruguay existen tres acervos genéticos diferentes en el germoplasma uruguayo: las poblaciones de Tacuarembó por un lado, las de Maldonado y Lavalleja juntos, y las de Treinta y Tres por otro lado (Cascales et al., 2014). Esto hace de las poblaciones uruguayas una importante fuente de variación genética para posibles programas de mejoramiento, y justifica la realización de esfuerzos para su conservación. Es probable que el germoplasma local se encuentre adaptado a las condiciones del ambiente (suelo, temperatura, régimen de precipitaciones), que difieren considerablemente de las de la región central de distribución.

2.2.4. Propagación de *I. paraguariensis*

Para pensar en un sistema de producción de *I. paraguariensis*, un programa de mejoramiento, o incluso para asegurar la conservación de los recursos genéticos locales, es necesario tener la capacidad de propagar la especie. A nivel productivo se utiliza principalmente la propagación por semilla, que conlleva menores costos y mayor facilidad de manejo respecto a la propagación vegetativa (Daniel, 2009). La reproducción a través de semilla produce individuos que son diferentes genotípicamente y fenotípicamente, lo cual

brinda una mayor capacidad de adaptación de la población a alteraciones bióticas y abióticas y asegura el mantenimiento de la diversidad genética de las poblaciones. Por otro lado, *I. paraguariensis* también se puede reproducir vegetativamente mediante esquejes, miniestacas, o por propagación *in vitro*. Este tipo de reproducción tiene como ventaja la reproducción de individuos seleccionados, que tengan una mayor productividad, uniformidad de crecimiento y calidad, y reduzcan el tiempo de crecimiento de los plantines. Estas técnicas no se encuentran tan expandidas productivamente debido a que no se encuentran suficientemente ajustadas para superar limitantes como el enraizamiento o la sobrevivencia de los plantines (Brondani et al. 2007, Wendling et al. 2013, Tronco et al. 2015). El Instituto Nacional de la Yerba Mate (Argentina) recientemente ha impulsado la propagación clonal de yerba mate mediante macropropagación por minicepas y miniestacas (Rocha et al., 2019).

La obtención de semillas de buena calidad genética, física y sanitaria es una de las principales limitantes para la producción (Zanon, 1988). Los problemas en la calidad genética refieren a que suele utilizarse semilla de origen desconocido o con escaso mejoramiento genético. Por otro lado la calidad física y sanitaria alude a la frecuencia con la que se encuentran semillas vacías, deterioradas o parasitadas, que si bien varía entre lotes, en general es alta (De Souza et al., 2017). Por otro lado, la reproducción mediante semilla presenta otros problemas como el bajo porcentaje de germinación, la desuniformidad y la demora en la germinación, que se atribuyen al tipo de dormición que presenta la especie.

2.3. DORMICIÓN DE SEMILLAS

Las semillas sin dormición germinan cuando se cumplen las condiciones requeridas por la especie, como temperatura, humedad y concentración de oxígeno adecuada. En cambio, las semillas que presentan dormición no podrán germinar aunque estén expuestas a condiciones favorables para su germinación. De esta manera, la germinación ocurre cuando hay una mayor probabilidad de que las condiciones para el establecimiento de una nueva generación de plantas sean las más convenientes (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), y evita que la semilla germine cuando se dan condiciones favorables a la germinación en momentos del año en los que no es esperable que la descendencia pueda sobrevivir (Vleeshouwers et al., 1995).

La dormición es una característica cuantitativa heredable, determinada genéticamente por varios loci. Esto posibilita que haya variabilidad en la dormición entre poblaciones de la misma especie, dando una característica

capaz de generar adaptación a los ambientes donde crecen según latitud, altitud, temperatura, precipitaciones y características del suelo (Baskin y Baskin, 2000). Por otra parte, existe variabilidad intrapoblacional en la dormición por el ambiente durante el desarrollo de la semilla, donde la temperatura es un factor determinante (Gualano y Benech-Arnold, 2009), y por efectos de la posición de las semillas sobre la planta madre (diferentes inflorescencias, partes de una inflorescencia o posiciones dentro de un mismo fruto). Para un individuo puede haber variaciones interanuales de la dormición de sus semillas por diferencias estacionales del ambiente. Esta variación intrapoblacional en la dormición permite maximizar la chance de éxito en establecer un nuevo plantín (Fenner y Thompson, 2005).

Las diferentes especies vegetales del mundo presentan diversos mecanismos de dormición como resultado de procesos evolutivos y de adaptación a los ambientes en que se desarrollan. Baskin y Baskin (2000) proponen una clasificación jerarquizada, que tiene en cuenta el tipo de semilla y de embrión, aspectos fisiológicos, morfológicos, químicos y ecológicos. Definen básicamente cinco clases de dormición: fisiológica, morfológica, física, y dos casos combinados como morfofisiológica y física + fisiológica. Las semillas de *Ilex paraguariensis* presentaría dormición morfofisiológica al igual que otras especies del género (Hu 1975, Tsang y Corlett 2005, Chien et al. 2011, Tezuka et al. 2013), ya que presenta embriones no desarrollados y largos períodos de tiempo para germinar (Niklas 1987, Heuser et al. 1993, Cuquel et al. 1994).

2.3.1. Dormición morfofisiológica

Las semillas con esta clase de dormición presentan al mismo tiempo factores morfológicos y fisiológicos que impiden la germinación. Es posible comprender esta clase compleja de dormición conociendo por separado sus dos componentes (Baskin y Baskin, 2000).

La dormición morfológica ocurre en semillas que presentan embriones de tipo rudimentario o lineal. Al momento de dispersión de la semilla, el embrión no ha terminado de desarrollarse y para poder germinar debe pasar por las distintas etapas de la embriogénesis, que en dicotiledóneas se clasifica por la forma que tiene el embrión: globular, corazón, pos-corazón, torpedo y embrión maduro (Niklas 1987, Heuser et al. 1993). Lo más frecuente es encontrar embriones en estado globular o corazón, pero hay reportes de encontrar con baja frecuencia embriones más desarrollados. Esto puede influir en la tasa de germinación ya que los embriones en estado maduro pueden germinar mucho antes que embriones en estado corazón (Niklas, 1987).

La dormición fisiológica es la clase más frecuente entre las especies que presentan dormición. En este caso los embriones están completamente desarrollados y los impedimentos para la germinación pueden tener básicamente dos orígenes: i) impuesta por las cubiertas (endosperma, testa y otras cubiertas) que pueden resultar en limitantes mecánicas, en la presencia de inhibidores de la germinación o en evitar el adecuado intercambio gaseoso, o ii) la dormición es impuesta por el propio embrión, mediante control genético y hormonal (Bewley et al., 2013).

La dormición fisiológica de una especie es variable y puede presentar cualquier nivel de dormición entre un máximo y un mínimo característico de cada especie. El nivel de dormición determina la amplitud del rango de condiciones en que las semillas pueden germinar. A mayor nivel de dormición, el rango de temperaturas o de disponibilidad hídrica en donde las semillas germinan es menor, mientras que para un menor nivel de dormición estos rangos se ensanchan (Vleeshouwers et al., 1995). Los cambios en el nivel de dormición están regulados genética y hormonalmente. Las hormonas que tienen mayor relevancia son el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GA). El ABA está involucrado en la inducción y mantenimiento de la dormición, mientras que las GA participan en la promoción de la germinación (Bewley, 1997). Cuando el nivel de dormición es alto, hay una alta síntesis *in situ* y sensibilidad al ABA, a la vez que es alta la degradación y baja la síntesis y la sensibilidad de las GA. Por otro lado, a medida que disminuye la dormición, aumenta la síntesis y la sensibilidad de GA, mientras que disminuye la sensibilidad al ABA y aumenta su degradación. El agregado exógeno de GA promueve la germinación cuando el nivel de dormición es bajo (Finch-Savage y Leubner-Mezger, 2006).

2.3.2. Factores ambientales que afectan la dormición morfofisiológica

Para que una semilla con dormición morfofisiológica germine, la dormición fisiológica debe disminuir lo suficiente y luego el embrión debe crecer y desarrollarse, o sea superar la dormición morfológica (Baskin y Baskin, 2000). Las condiciones ambientales deben ser adecuadas para superar cada componente de esta dormición dual durante suficiente cantidad de tiempo. El principal factor ambiental que provoca cambios en la dormición (tanto morfológica como fisiológica) es la temperatura del suelo, modulada por el contenido de humedad. Sin embargo es posible que cada componente de la dormición requiera diferentes niveles de estos factores para superarlos (Benech-Arnold et al. 2000, Baskin y Baskin 2000).

En especies con dormición fisiológica, la disminución de su nivel es gradual. Al momento de la dispersión las semillas tienen determinado nivel de

dormición impuesto sobre la planta madre, conocido como dormición primaria. Una vez dispersadas, las condiciones ambientales en el suelo, principalmente temperatura y humedad del suelo, hacen variar la dormición a niveles mayores o menores. Por ejemplo, semillas de especies anuales estivales que son dispersadas con dormición en otoño y pasan el invierno en el suelo, donde las bajas temperaturas y el alto contenido de agua disminuyen su dormición. Durante la primavera presentan baja dormición por lo que tienden a germinar. Sin embargo, la fracción de la población que no germina, vuelve a entrar en una dormición mayor inducida por las temperaturas altas del verano. Esta dormición inducida fuera de la planta madre se conoce como dormición secundaria (Benech-Arnold et al., 2000).

Una vez que el nivel de dormición ha disminuido lo suficiente, las semillas presentan mayor sensibilidad a factores ambientales que terminan la dormición, como la alternancia de temperatura, la calidad y cantidad de luz, la presencia de nitrato y la concentración de gases como oxígeno, dióxido de carbono y etileno, que remueven las últimas restricciones para la germinación (Benech-Arnold et al., 2000). Estos factores le brindan información a la semilla sobre la profundidad en el suelo y la competencia con otras plantas, factores que son cruciales para la posterior sobrevivencia de la plántula.

En especies con dormición morfofisiológica cuando el componente fisiológico ya no es una limitante, el embrión es capaz de retomar su desarrollo (superar dormición morfológica) cuando encuentra la temperatura y humedad del suelo adecuadas. Las condiciones más favorables para el crecimiento del embrión pueden ser temperaturas cálidas o frías, según la especie (Baskin y Baskin, 2000). Otros factores como la presencia de luz también pueden ser importantes para superar dormición morfológica en algunas especies (Baskin y Baskin, 2000). Una manera de analizar si la dormición morfológica está cediendo es medir periódicamente el tamaño del embrión, y a partir de esto, se puede inferir qué condiciones favorecen el crecimiento.

A nivel de laboratorio o de campo, para disminuir el nivel de dormición y adelantar u homogeneizar la germinación, se pueden realizar tratamientos que emulen las condiciones que se dan en los ambientes en que son dispersadas las semillas. Los tratamientos más utilizados para reducir la dormición fisiológica son la estratificación, la posmaduración en seco y la escarificación. La estratificación consiste en la exposición de las semillas hidratadas a temperaturas cálidas o frías durante una determinada cantidad de semanas o meses. En la posmaduración en seco, en cambio, se exponen las semillas con un bajo contenido de humedad (< 12%) a temperaturas cálidas durante algunos meses (Benech-Arnold et al., 2000). Por otro lado, la escarificación consiste en un deterioro menor de las cubiertas de forma química o mecánica, que promueve un mayor intercambio

gaseoso y la degradación de inhibidores, por lo que es útil para semillas con dormición fisiológica provocada por las cubiertas (Bewley y Black, 1994).

2.3.3. Evidencias sobre dormición y germinación en *I. paraguariensis*

Las características más destacables del comportamiento germinativo de *I. paraguariensis* es la muy alta dormición que presentan las semillas, que se mantiene durante un largo período hasta que comienzan a germinar, con baja sincronía y bajo porcentaje de germinación final. En condiciones naturales, sembrando las semillas luego de la cosecha sin ningún tratamiento previo, el tiempo hasta que germina la primera semilla duró entre 90 y 120 días, y la germinación continuó durante más de 270 días (Medeiros 1998, Daniel 2009). En estas mismas condiciones el porcentaje de germinación también fue variable entre 5 y 35% (Sturion 1988, Burtnik 2006, da Croce y Floss, citados por Daniel 2009). El MAPA (2009) recomienda para esta especie colocar las semillas en arena a temperaturas alternantes de 20/30°C, contar el número de germinadas a partir de los 45 días y culminarlo luego de un año.

La búsqueda de adelantar y mejorar la germinación ha llevado a probar diferentes tratamientos. Debido al desconocimiento de los mecanismos de dormición de las semillas, los tratamientos utilizados fueron aquellos que funcionaron empíricamente para esta u otra especie de *Ilex*, o basados en las condiciones naturales donde ocurre el reclutamiento de nuevos plantines. El fruto de *I. paraguariensis* madura al final del verano, pasa el invierno en el suelo, expuesto a temperaturas frías, y comenzaría a germinar en primavera (Catapan, 1998). El frecuente uso de la estratificación en frío para disminuir la dormición en esta especie se basa en que se pretende emular las condiciones de temperatura y humedad durante el invierno (Zanon, 1988). Sin embargo, los resultados varían según el lote de acuerdo a los distintos autores. Hay evidencias de resultados contrastantes utilizando condiciones y tiempos de estratificación muy similares (Cuquel et al. 1994, Catapan 1998). Sin embargo, hay coincidencias en que la exposición de las semillas a alternancia de luz y temperatura luego de la estratificación logra resultados de germinación significativamente mayores que con temperaturas constantes (Heuser et al. 1993, Catapan 1998).

La adición de nitrato de potasio o de ácido giberélico a la solución puede promover la germinación, al remover las últimas restricciones del componente fisiológico de la dormición (Cuquel et al. 1994, Montesdeoca 2002). Por otro lado, se ha utilizado la escarificación química (distintas concentraciones de ácido sulfúrico) o mecánica (lijado de las semillas) en algunos trabajos para debilitar las cubiertas endurecidas de la semilla y así permitir la entrada de agua (Arévalo 1998, Montesdeoca 2002). Sin embargo, Mello, citado por Medeiros (1998) comprobó que las cubiertas endurecidas de las semillas de *I. paraguariensis* no

son impermeables al agua, sino que sólo retrasan su entrada a la semilla. Por tanto, el efecto de la escarificación, si existe, estaría asociado al deterioro de las cubiertas externas o internas, lo cual en otras especies promueve la germinación por la degradación de inhibidores o el aumento del intercambio gaseoso (Glison et al., 2017).

Hubo varias otras técnicas que se probaron para mejorar la germinación de semillas de yerba mate, sin resultados satisfactorios. Entre algunos tratamientos curiosos, se puede mencionar el someter a las semillas a un shock térmico: 30 minutos sumergidas en agua caliente (50 o 100°C), o un día de frío con las semillas no humedecidas (5 o -5°C, Schiaparini y Viecelli, 2011). También se ha probado con remojos prolongados (Montesdeoca, 2002), donde se espera que, bajo agua corriente, las semillas laven inhibidores de la germinación (Bewley y Black, 1994), e incluso se ha probado con estimulantes biológicos como sumergir las semillas en agua de coco por 24 horas (Schiaparini y Viecelli, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COLECTA Y PROCESAMIENTO DE FRUTOS

Se seleccionaron para la colecta tres zonas representativas de la distribución de *I. paraguariensis* en el país, en los departamentos de Tacuarembó, Treinta y Tres y Maldonado. La colecta en Tacuarembó se realizó en la Gruta de los Helechos en marzo de 2016. A principios del mes de mayo del mismo año se realizaron las colectas en una población próxima a la Quebrada de los Cuervos en Treinta y Tres y en una zona cercana a Aiguá en Maldonado (Figura 1).

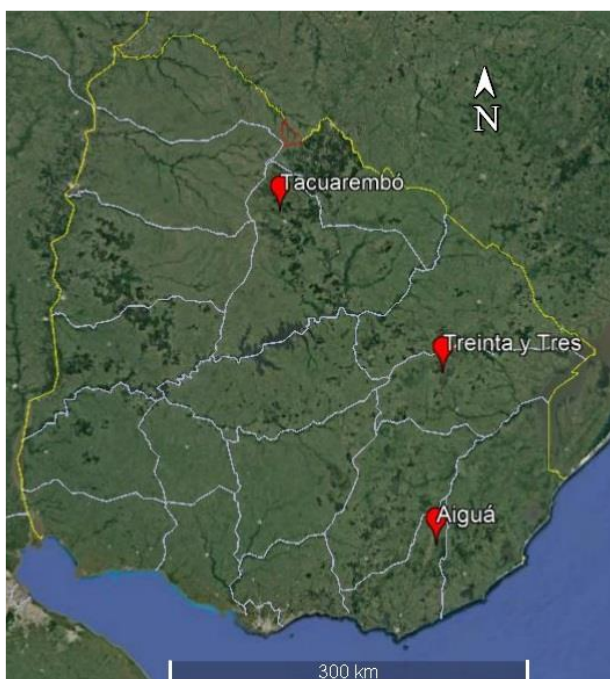


Figura 1. Ubicación de las poblaciones colectadas

De cada población se seleccionaron tres árboles al azar y se colectaron 200 frutos de cada uno, que se colocaron en bolsas de plástico cerradas y se mantuvieron en la heladera hasta su procesamiento. Los frutos se machacaron y se apartaron las semillas con pinzas, colocándolas en papel absorbente húmedo para evitar su deshidratación.

3.2. ENSAYO DE GERMINACIÓN

Se realizó un ensayo de germinación con un diseño factorial completo. Para las semillas de cada uno de los tres individuos de las tres poblaciones se realizaron tres tratamientos de estratificación: sin estratificación, dos meses y cuatro meses de estratificación en frío. Además, al momento de ponerlas en condiciones de germinación, se probaron dos soluciones: agua destilada o 1000 ppm giberelinas (GA_3 , Sigma-Aldrich), concentración dentro del rango usado para promover germinación en otras especies de *Ilex* (Chien et al., 2011). Los tratamientos de estratificación se realizaron en bandejas de plástico con 4 cm de arena dulce, donde se colocaron las semillas y se cubrieron con un centímetro de arena. Esto se humedeció con agua destilada hasta un punto cercano a la capacidad de campo. Se cerró la bandeja, se envolvió en plástico negro opaco para impedir el pasaje de luz y se colocó en la heladera a 9°C.

Las semillas se colocaron en condiciones de germinación una vez cumplido el tiempo de estratificación, y para semillas sin estratificación, al inicio de las actividades. Se tomaron cuatro réplicas de 30 semillas por tratamiento de estratificación, individuo y solución de germinación. Cada réplica se colocó en placas de Petri de 10 cm con 60g de arena dulce, humedecidas a capacidad de campo con la solución de germinación correspondiente. Se envolvieron en nylon film y se colocaron en una cámara con alternancia de temperatura a 20/30°C y de luz y oscuridad 12/12 horas.

Cada 15 días, en tres de las cuatro réplicas, se contabilizó el número de semillas germinadas y se agregó agua destilada cuando fue necesario (1 a 2 ml). Se consideraron germinadas aquellas semillas que presentaron la emergencia de la radícula. Se midió durante 52 semanas (1 año), y luego de finalizado este tiempo se evaluó la viabilidad de las semillas no germinadas mediante un test de tetrazolio. Para esto se realizaron cortes transversales y laterales para asegurar que el reactivo tome contacto con el embrión. Se utilizó una concentración de tetrazolio al 0,5% y se colocó cubriendo las semillas en un recipiente oscuro a 30°C por 24 horas (Baskin y Baskin, 2000). La viabilidad se comprobó evidenciando a los embriones teñidos de color rosado. El número de semillas viables se estimó como el número de germinadas sumadas a el número de no germinadas viables.

3.3. CRECIMIENTO DE LOS EMBRIONES

La longitud de los embriones se midió por individuo, tratamiento de estratificación y solución de germinación utilizada. El primer momento de

medición fue previo al inicio de los ensayos de germinación, para obtener un valor inicial sin el efecto de los tratamientos. Durante la incubación de la germinación, para cada momento de medición, se muestreó de forma aleatoria 10 semillas de la cuarta replica generada para cada combinación de tratamientos e individuos, por lo que estaban expuestas a la misma combinación de tratamientos planteados en el ensayo de germinación. A cada semilla se la sometió al test de tetrazolio, como se describió anteriormente. Los embriones se apartaron y se observaron en un microscopio óptico con un aumento de 4x. Se ajustó la escala y se midió la longitud del eje mayor de los embriones mediante el programa DinoCapture 2.0 para Windows.

El marco de tiempo para los momentos de medición posteriores al inicio de los tratamientos se basó en Chien et al. (2011). Para el tratamiento sin estratificación la primera medida se realizó a las 7, la segunda a las 14 y la tercera a las 19 semanas. Para los tratamientos con estratificación se asumió que el crecimiento de los embriones puede ocurrir más temprano, por lo que los tres momentos de medida se programaron para las semanas 5, 8 y 12 luego de entrar en las condiciones de germinación. Se consideró la posibilidad de cambiar los momentos de medición una vez comenzado el ensayo, con el objetivo de detectar el crecimiento de los embriones.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.4.1. Viabilidad y germinación

Los datos de viabilidad y germinación final se analizaron mediante un modelo lineal generalizado (con distribución binomial y función logit) con un factorial completo de individuo (o población), tratamiento de estratificación y presencia de giberelinas.

$$G_{ijkl} = \mu + I_i + T_j + GA_k + (I \times T)_{ij} + (I \times GA)_{ik} + (T \times GA)_{jk} + (I \times T \times GA)_{ijk} + \xi_l$$

donde G = germinación, μ = intercepto (media general), I_i = individuo con 9 niveles o población con 3 niveles T_j = tratamiento de estratificación con 3 niveles, GA_k = solución de germinación con 2 niveles, $I \times T_{ij}$ = interacción entre individuo y tratamiento con 27 niveles, $I \times GA_{ik}$ = interacción entre individuo y solución de germinación con 18 niveles, $T \times GA_{jk}$ = interacción entre tratamiento y solución de germinación con 6 niveles, $I \times T \times GA_{ijk}$ = triple interacción entre individuo, tratamiento y solución de germinación con 54 niveles y ξ_l = error residual.

Se realizó un análisis de devianza con la función *glm* del paquete stat del programa R para detectar diferencias significativas entre los factores y sus

interacciones. Se estimaron las medias ajustadas y los intervalos de confianza para cada combinación de tratamientos. Para analizar las diferencias entre distintos niveles de un factor, se construyeron contrastes ortogonales y las diferencias se analizaron con el test de Tukey ($\alpha = 0,05$). Todo lo anterior con funciones del paquete `lsmeans` del programa R.

Se contempló la posibilidad de realizar los análisis para un sub-conjunto de datos que incluya algunos niveles de poblaciones, o tratamientos, para evitar el análisis con datos sin casos de éxito (sin germinación) o con baja viabilidad que podría acarrear alta variabilidad en residuales.

3.4.2. Crecimiento de embriones

Para el análisis de la primera medición de la longitud de los embriones, previa a los tratamientos, se utilizó un modelo lineal general con individuo como único factor. Para los restantes momentos de medición se utilizó un modelo lineal general con un factorial completo de los 4 factores (individuo, estratificación, solución de germinación y momento de medición) y sus interacciones. El efecto de los factores y sus interacciones se analizó mediante un ANAVA con la función `lm` del paquete `stats` en el programa R. Dado que es posible que algunos muestreos presenten muy baja viabilidad, y por tanto, alta variabilidad dentro de cada muestreo, también se evaluó la posibilidad de realizar los análisis con un sub-conjunto de datos con una adecuada viabilidad.

4. RESULTADOS

4.1. COLECTA Y PROCESAMIENTO DE LOS FRUTOS

Los frutos de Tacuarembó se cosecharon en marzo, mientras que las colectas en Treinta y Tres y Aiguá se realizaron dos meses después. En abril se realizó una visita a la población de Treinta y Tres y se observó una gran proporción de frutos inmaduros, por lo que se decidió aplazar estas colectas hasta la primera quincena de mayo. Los frutos cosechados presentaron diferentes estados de madurez, por lo que se realizó una clasificación cualitativa según el color del fruto para registrar las diferencias (Figura 2). La proporción de los distintos estados de madurez de los frutos entre y dentro de las poblaciones fue diferente (Cuadro 1). Si se considera como fruto maduro a partir de la categoría 4, los tres individuos de Tacuarembó presentaron el 100% de los frutos maduros, mientras que apenas un 15% de la totalidad de los frutos cosechados en Treinta y Tres se encontraron maduros. Por otro lado, solamente dos de los tres individuos de Aiguá presentaron la mayor parte de los frutos maduros.



Figura 2. Clasificación de los estados de madurez de los frutos colectados según el color del fruto

Durante la disección de los frutos de Treinta y Tres se encontraron numerosas semillas con orificios, posiblemente provocados por algún insecto. Posteriormente, durante la disección de las semillas para llevar a cabo el test de tetrazolio se detectó dentro de algunas semillas la presencia de insectos que si bien no se identificaron, tenían apariencia de pequeños himenópteros.

Cuadro 1. Fecha de cosecha y porcentaje de frutos cosechados en cada estado de madurez para cada individuo

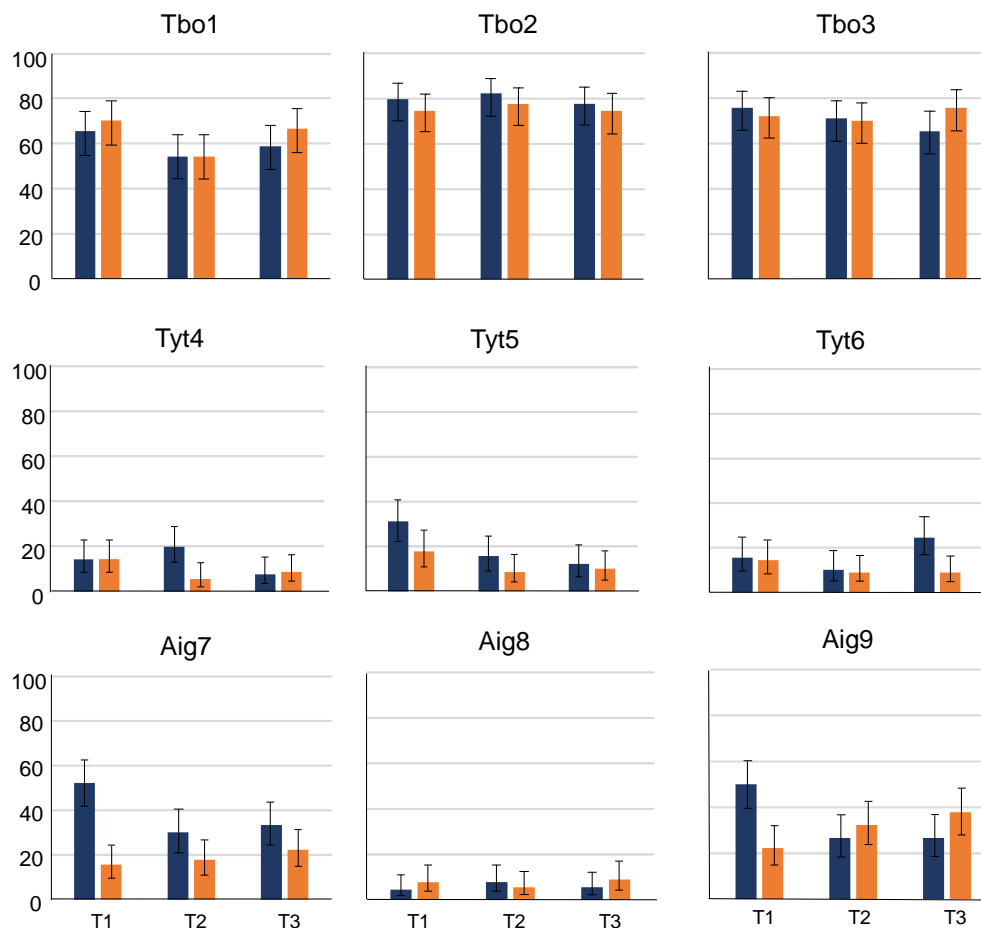
Población	Individuo	Fecha de cosecha	Estado de madurez*					
			1	2	3	4	5	6
Tacuarembó	Tbo1	08/03/2016	0	0	0	100	0	0
	Tbo2	08/03/2016	0	0	0	0	100	0
	Tbo3	08/03/2016	0	0	0	0	0	100
Treinta y Tres	Tyt4	03/05/2016	0	67	0	0	33	0
	Tyt5	03/05/2016	0	95	0	5	0	0
	Tyt6	03/05/2016	0	94	0	6	0	0
Aiguá	Aig7	10/05/2016	0	0	0	0	0	100
	Aig8	10/05/2016	0	0	78	0	22	0
	Aig9	10/05/2016	0	0	15	0	85	0

* Según la clasificación de la Figura 2

4.2. ENSAYO DE GERMINACIÓN

4.2.1. Viabilidad

Hubo diferencias entre poblaciones en la viabilidad de las semillas ($P < 0,001$). Los individuos de Tacuarembó presentaron un rango entre 54% y 82% de semillas viables (valores promedio por individuo). Mientras que el rango de la población de Treinta y Tres estuvo entre 5 y 31%, y el de la población de Aiguá estuvo entre 4 y 50% (Figura 3). También se registraron diferencias significativas entre tratamientos de estratificación y entre la solución de germinación utilizada ($P < 0,001$). Para la condición sin estratificación la viabilidad media fue de 34%, mientras que los tratamientos con 2 y 4 meses de estratificación presentaron 28% y 29% respectivamente. A su vez la viabilidad cuando se utilizó agua destilada fue en promedio mayor a la viabilidad cuando se utilizó GA, 33% y 28% respectivamente. Hubo interacción individuo \times solución de germinación ($P < 0,001$). Solo en el individuo Aig7 se encontró mayor viabilidad para todos los tratamientos de estratificación cuando la solución fue agua destilada que cuando fue con giberelinas. Además, se detectó interacción triple ($P = 0,008$), que se explica porque se registraron diferencias entre los niveles de un factor en algunas combinaciones de los restantes factores. Por ejemplo, hubo diferencias en viabilidad entre agua y giberelinas en algunos individuos para el tratamiento sin estratificación (Aig7 y Aig9), para otro individuo en el tratamiento con 2 meses de estratificación (Tyt4) y para otro diferente en el tratamiento con 4 meses de estratificación (Tyt6).



T1 corresponde a semillas sin estratificación, T2 a semillas con 2 meses de estratificación, y T3 a semillas con 4 meses de estratificación. En azul semillas con agua destilada y en anaranjado semillas con solución de giberelinas. Las poblaciones están ordenadas por filas de gráficos: arriba los individuos de Tacuarembó, al medio los de Treinta y Tres y abajo los de Aigua. Las líneas verticales corresponden al límite de confianza de 95%.

Figura 3. Porcentaje de viabilidad de semillas luego de un año a 20/30°C para cada individuo de las tres poblaciones

4.2.2. Germinación

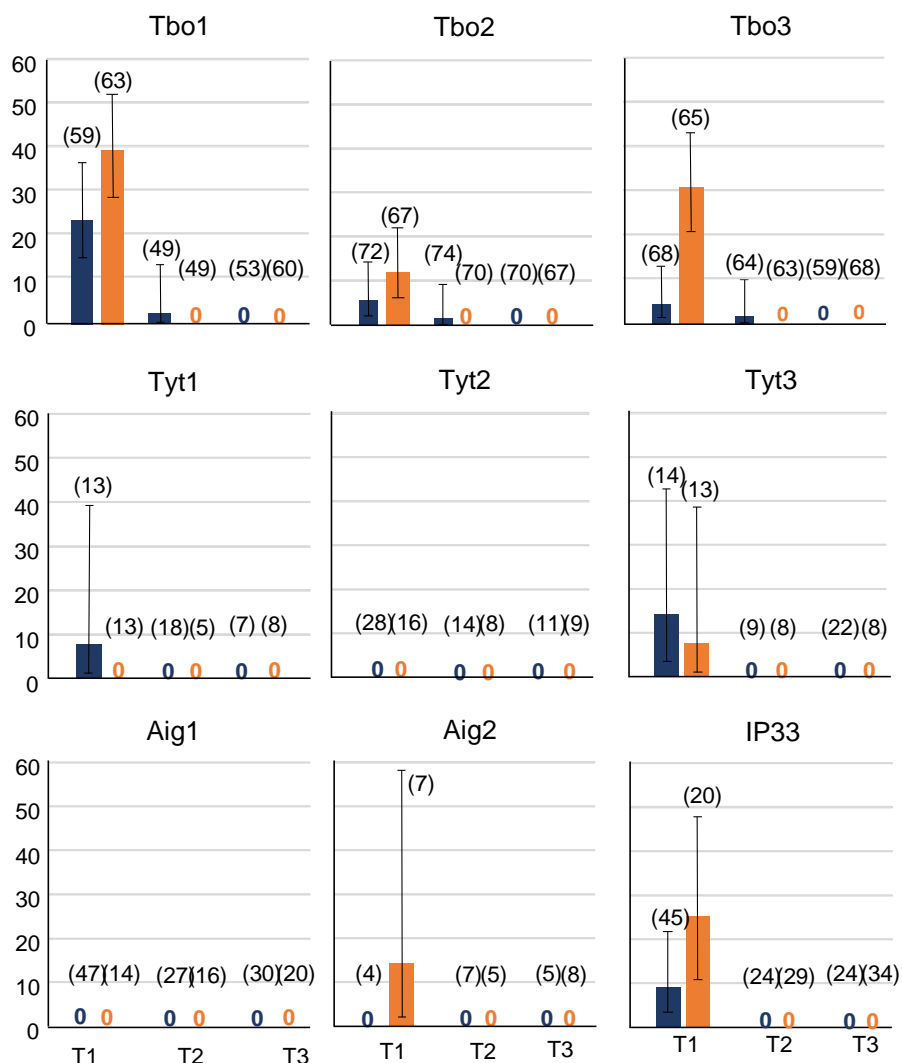
La germinación fue nula en 134 de 162 réplicas, y en las que hubo se dio de forma irregular durante la evaluación. El tiempo requerido para la germinación de la primera semilla fue de 24 semanas de incubación. Las tres poblaciones comenzaron a germinar entre la semana 24 y 26. El fin de la evaluación (52

semanas) se tomó arbitrariamente, por lo que el porcentaje de germinación podría ser mayor si se evaluara durante más tiempo.

El efecto más evidente sobre la germinación fue el del tratamiento de estratificación ($P < 0,001$). Salvo excepciones (3 semillas), no hubo germinación en los tratamientos con estratificación, pero si hubo germinación para semillas sin estratificación (Figura 4). El análisis con el modelo completo no logró converger por el alto número de casos con germinación nula.

Para responder si hubo diferencias entre poblaciones y entre la solución de germinación utilizada, se ajustó un modelo reducido con sólo los datos del tratamiento sin estratificación (T1). Se registraron diferencias entre las poblaciones ($P = 0,001$), donde Tacuarembó presentó la mayor germinación (17%), mientras que Aiguá y Treinta y Tres presentaron los valores más bajos (10% y 7%, respectivamente). El efecto del agregado de giberelinas también resultó significativo ($P < 0,001$). Sin embargo, dentro del sub-set de datos analizados, sigue habiendo combinaciones de individuo \times giberelinas sin germinación que dificultan la correcta estimación por parte del modelo. Por tanto, se ajustó un modelo lineal para los datos de semillas sin estratificación de la población de Tacuarembó. Los factores considerados fueron los tres individuos y el agregado o no de giberelinas. De este análisis se desprende que persiste el efecto del agregado de giberelinas, que alcanza 27% de germinación en promedio, mientras que 11% germinaron con agua destilada.

Se registró una alta variabilidad de residuales que se refleja en el rango obtenido para los límites de confianza al 95% (Figura 4). Se obtuvo alta variabilidad en aquellos casos donde hubo germinación pero el número de semillas viables fue bajo (≤ 20 semillas viables de 90 sembradas), como en Tyt4, Tyt6, Aig8 e Aig9 (Figura 4). Por ejemplo, en el caso de Aig8, en el tratamiento sin estratificación con giberelinas, el número de semillas viables fue 7, y germinó una sola. El modelo en este caso devolvió un límite superior para el intervalo de confianza de 58% e inferior de 2%.



T1 corresponde a semillas sin estratificación, T2 a semillas con 2 meses de estratificación, y T3 a semillas con 4 meses de estratificación. En azul semillas con agua destilada, en anaranjado semillas con solución de giberelinas. El número entre paréntesis corresponde al número de semillas viables de un total de 90 semillas (30 por réplica). Las poblaciones están ordenadas por filas de gráficos: arriba los individuos de Tacuarembó, al medio los de Treinta y Tres y abajo los de Aiguá. En los casos en que no hubo germinación se colocó un cero. Las líneas verticales corresponden al límite de confianza de 95%.

Figura 4. Porcentaje de semillas germinadas luego de un año a 20/30°C en función de las semillas viables para cada individuo de las tres poblaciones

4.3. CRECIMIENTO DE LOS EMBRIONES

Para los datos de longitud inicial de los embriones, no se encontró diferencias significativas entre las poblaciones ($P = 0,226$), pero si hubo diferencias entre individuos ($P < 0,001$). Aig9 fue el individuo que presentó la mayor longitud de embriones (0.40 mm), mientras que Tyt6 presentó la menor longitud (0.23 mm). Cabe destacar que para Tyt6 y para Aig9 el número de casos registrados fue bajo (4 y 2 respectivamente), ya que la mayor parte de sus semillas no presentaron un embrión viable.

En cuanto a las mediciones posteriores al inicio de los tratamientos, los embriones de la población de Tacuarembó fueron los primeros en ser medidos. Como no se registró una mayor frecuencia de embriones de mayor tamaño en los momentos de medición seleccionados, se resolvió incrementar el tiempo entre momentos de medición para las poblaciones de Treinta y Tres y Aiguá (Cuadro 2). Sin embargo, tampoco se logró observar una mayor frecuencia de embriones más grandes (Figura 5). En general, se observaron embriones en estado globular y corazón, y algunos casos puntuales de embriones más grandes en estado pos-corazón o torpedo, independientemente del individuo, tratamiento o momento de medición (Figura 6 en Anexos).

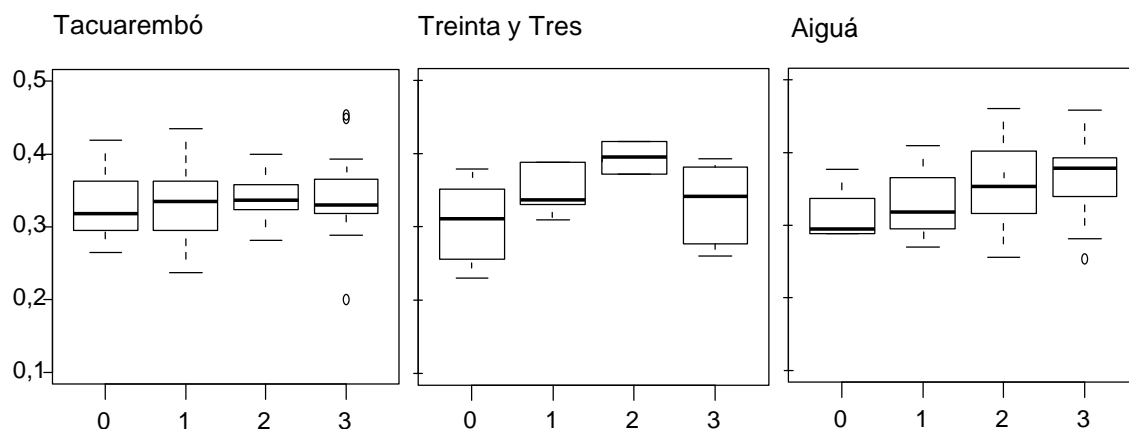
Cuadro 2. Momentos en que se realizaron las mediciones de los embriones según el número de semanas que las semillas estuvieron en las condiciones de germinación (20/30°C), para cada población y tratamiento de estratificación

Tratamiento	Población	Semanas en condiciones de germinación										
		2	4	7	11	12	14	18	19	23	32	36
T1	Tbo			1			2		3			
T1	Tyt y Aig			1					2			3
T2	Tbo		1	2	3							
T2	Tyt y Aig					1		2			3	
T3	Tbo	1		2	3							
T3	Tyt y Aig			1	2					3		

En amarillo se indican las primeras mediciones, en anaranjado las segundas, y en rojo las terceras mediciones de cada población y tratamiento.

Para ajustar el modelo lineal factorial, no se incluyeron los datos del tercer momento de medición para el tratamiento con 4 meses de estratificación de la población de Tacuarembó, ya que se detectaron problemas con la medición. Hubo diferencias significativas en la longitud de embriones entre individuos, momento de medición y la triple interacción individuo \times solución \times momento ($P < 0,01$). No se detectaron diferencias entre tratamientos de estratificación ($P > 0,05$). La triple interacción se explica porque las diferencias entre los momentos

de medición se encontraron en algunos individuos cuando la solución contenía giberelinas, pero para otros, se encontraron cuando la solución era agua destilada. En algunos casos, los resultados obtenidos se generaron con muy bajo número de casos, principalmente para los tres individuos de Treinta y Tres y para el individuo Aig8 de Aiguá (Cuadros 3, 4, 5 y 6 en Anexos). El individuo Aig9, que tuvo un número significativo de casos, presentó una mayor longitud de embriones con respecto a cualquiera de los individuos de Tacuarembó para el segundo y tercer momento de corte ($P < 0,05$).



Los datos corresponden a las semillas que no tuvieron estratificación. El momento 0 corresponde a la medición inicial, previa a los tratamientos.

Figura 5. Boxplot con el tamaño (mm) de los embriones medidos de cada población, en cada momento de medición (1, 2 y 3), de semillas que no tuvieron estratificación

Dado el muy bajo número de embriones medidos en las poblaciones de Treinta y Tres y Aiguá, se resolvió ajustar un modelo lineal factorial reducido con los datos de los individuos de Tacuarembó, los que presentaron en casi todos los casos más de 5 datos. En este modelo, no se detectó ninguna diferencia para ninguno de los factores (individuo, tratamiento de estratificación, giberelinas y momento de medición) ni sus interacciones.

5. DISCUSIÓN

5.1. VIABILIDAD Y GERMINACIÓN

La viabilidad de las semillas de las poblaciones de *I. paraguariensis* no es un tema que se mencione con frecuencia en los trabajos publicados sobre la especie. Galindez et al. (2018) observaron una viabilidad de 40%, similar a la de algunos individuos de Aiguá, mayor a la de la población de Treinta y Tres y menor a la de Tacuarembó. Las diferencias entre poblaciones en la viabilidad de las semillas fueron significativas, pero no se puede concluir que se deban solo a factores genéticos. Las condiciones ambientales durante el desarrollo de las semillas deben haber sido muy dispares, tanto por los sitios como por las fechas de cosecha.

La polinización puede ser de las principales limitantes para obtener mayor viabilidad de semillas. Para que la polinización sea exitosa en una especie dioica es necesario que exista una distancia y una proporción adecuada (1:1) entre árboles con flores masculinas y con flores femeninas (Floss 1994, Sousa et al. 2003). Es posible que la baja densidad de estas poblaciones disminuya la chance de la polinización, así como también pueden influir la sincronía entre la liberación del polen y la receptividad del estigma (Sousa et al., 2003). También la temperatura y la humedad del aire pueden afectar la viabilidad del polen, además de la presencia y actividad de insectos polinizadores (Daniel, 2009). Por otro lado, la incidencia de plagas también puede afectar el número de semillas viables. Se ha reportado para *I. paraguariensis* la incidencia de un insecto de la familia Torymidae que se alimenta del endosperma y embrión de la semilla y luego sale realizando un orificio que puede ser observado a simple vista en las semillas (De Souza et al., 2017).

Hubo diferencias entre poblaciones en la respuesta germinativa de las semillas. Esto no es sorprendente, ya que se ha registrado en muchas especies, y en muchos casos las diferencias se asocian al sitio de origen de las poblaciones (Wagmann et al. 2012, Sales et al. 2013). En *Ilex maximowicziana*, se encontraron diferencias en la dormición de semillas asociadas al sitio de origen de cada población (Chien et al., 2011). Las diferencias en la germinación entre las poblaciones nativas de *I. paraguariensis* fue resultado de la expresión del nivel de dormición de cada individuo. Esta característica tiene componentes genéticos y ambientales (efecto materno). Sin embargo, al igual que la viabilidad, no es posible atribuir las diferencias encontradas a ninguno de los dos componentes, dadas las diferencias en el momento y lugar de las cosechas. Por otro lado, los diferentes estados de maduración en que se colectaron los frutos no sería un factor influyente sobre el porcentaje de semillas germinadas (Fontana

et al., citados por Daniel, 2009) ya que la dormición se impondría cuando los frutos son inmaduros (Flowler y Sturion, 2000).

En semillas con estratificación, no se registró prácticamente eventos de germinación. Este efecto fue consistente, independientemente del individuo o la solución de germinación. La estratificación en frío se ha propuesto para disminuir la dormición en especies con dormición fisiológica de crecimiento estival (Batlla y Benech-Arnold, 2010), por lo que mediante este tratamiento, se esperaba obtener un mayor porcentaje de germinación y un menor periodo para que comenzara la germinación. Esta nula germinación significa que el tratamiento de estratificación en frío escogido afectó la dormición de las semillas, ya que las semillas sin estratificación lograron germinar en las mismas condiciones. Además, no hubo grandes variaciones en la viabilidad de las semillas en estratificación con respecto a las no estratificadas. Todo esto permite sugerir que las semillas con estratificación en frío adquirieron dormición secundaria. Una posible causa es la cantidad de agua en el sustrato que pudo provocar la falta de oxígeno, uno de los factores que puede aumentar el nivel de dormición (Baskin y Baskin, 2000).

El efecto del agregado de giberelinas suele ser, al igual que la estratificación en frío, positivo para adelantar y aumentar la germinación en especies con dormición fisiológica (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Si bien otros trabajos en germinación de *I. paraguariensis* no muestran un efecto significativo de las giberelinas (Cuquel et al. 1994, Montesdeoca 2002), el efecto observado en los resultados del ensayo evidencia el carácter fisiológico de la dormición de *I. paraguariensis*.

Las especies con dormición morfofisiológica a menudo requieren diferentes estímulos del ambiente para la superación del componente fisiológico y para el crecimiento del embrión (componente morfológico). Estos requerimientos son variables dentro del género *Ilex*; Galindez et al. (2018) demostraron diferentes requerimientos para seis especies de *Ilex* de la región subtropical de Argentina, entre ellas *I. paraguariensis*. La estratificación fría no alcanzó en ningún caso una germinación mayor a 2% para *I. paraguariensis*, mientras que para otras especies superó al control sin estratificación. Tampoco observaron un efecto de las giberelinas en la germinación de *I. paraguariensis*. A partir de estas observaciones, los autores concluyen que el mejor tratamiento para la superación de la dormición de esta especie es la estratificación cálida. Esto contradice el tratamiento que se realiza tradicionalmente para yerba, incluso lo que se recomienda en manuales de producción, y se mantiene la incógnita de si la estratificación cálida es útil para reducir la dormición para las poblaciones de Uruguay.

En resumen, los efectos observados en los tratamientos de estratificación y agregado de giberelinas permiten confirmar el componente fisiológico de la dormición de las semillas de *I. paraguariensis* que ya fue sugerido por Galindez et al. (2018). Es decir que además de presentar embriones no desarrollados presenta bloqueos fisiológicos que responden a factores ambientales que los agudizan o alivian.

5.2. CRECIMIENTO DE LOS EMBRIONES

Las poblaciones no presentaron diferencias significativas en cuanto al tamaño inicial de los embriones, si bien se detectaron algunos casos puntuales de tamaños muy por encima o muy por debajo de la media. La variabilidad entre individuos en esta característica es esperable; de acuerdo a algunos autores, las semillas que al madurar tienen embriones más grandes germinan antes, y esto explica en parte el amplio periodo de germinación registrado (Niklas 1987, Heuser et al. 1993). El origen de esta variación puede ser por el ambiente durante el desarrollo de las semillas (efecto materno). Se ha registrado diferencias en el tiempo para que comience la germinación entre poblaciones de distintas regiones de Brasil asociado con el tamaño de los embriones y el sitio de producción; las más al Norte presentaron embriones más desarrollados que las del Sur. Se han propuesto factores como la temperatura media anual y la cantidad de horas de luz durante el desarrollo del embrión para explicar el fenómeno (Fowler et al., 2010).

Mediante las sucesivas mediciones de los embriones se esperaba detectar el crecimiento de los mismos, que evidencia el momento en que la dormición fisiológica ha disminuido lo suficiente y comienza a disminuir la morfológica (Baskin y Baskin, 2000). Sin embargo, no se logró detectar crecimiento significativo durante todo el periodo en que se midió (hasta 36 semanas). La germinación comenzó a las 24 semanas y se dio de forma irregular hasta el fin de la evaluación, revelando una alta variabilidad intrapoblacional en el nivel de dormición que no hizo posible detectar una tendencia general en el crecimiento de los embriones. Esta variabilidad se puede explicar por la presencia de algunos embriones de tamaño inicial por encima de la media (variabilidad en dormición morfológica), pero también por niveles de dormición fisiológica diferentes. Por otro lado Galindez et al. (2018) afirman que el crecimiento del embrión de *I. paraguariensis* es notablemente más lento que el de otras especies de *Ilex*, ya que demoró 12 semanas en duplicar de 0,1 a 0,2 el ratio embrión:semilla y 12 semanas más en volver a duplicarlo de 0,2 a 0,4 bajo condiciones de 15/25°C. Bajo otras condiciones de temperatura, entre ellas 20/30°C, el crecimiento fue más lento aún.

La diferencia en viabilidad con la que se comenzó el ensayo no permite ser contundente en las conclusiones. Por tanto, se sugiere que previamente se enriquezca el lote mediante algún método, como flotación de las semillas, para asegurar una mayor proporción de semillas viables y disminuir el error, tanto para medir germinación como para medir embriones (Cunha y Ferreira 1987, Burtnik 2003). Sería también importante evaluar el método de muestreo, que en este trabajo se realizó totalmente al azar. Se sugiere para futuros ensayos que se utilice una menor cantidad de agua al momento de realizar una estratificación.

6. CONCLUSIONES

Este trabajo presenta evidencias sobre el comportamiento germinativo de las poblaciones nativas de yerba mate en Uruguay. Los resultados sustentan la existencia de ambos componentes de la dormición morfofisiológica de *I. paraguariensis*; la fisiológica, por la respuesta a las giberelinas y a la estratificación en frío, y la morfológica por el desarrollo de los embriones. Esto es relevante, ya que en la mayor parte de los trabajos sobre germinación de la especie se suele considerar únicamente el componente morfológico de esta clase de dormición. A partir de esto, se podría pensar en probar otros factores que afectan la dormición fisiológica, como el agregado de nitrato o la estratificación cálida (con menor humedad), que podrían tener un efecto sobre la germinación de esta especie.

No se pudo ser concluyente sobre la existencia de variabilidad en la dormición entre poblaciones debido a la alta variabilidad intrapoblacional y la baja viabilidad observada, principalmente en la población de Treinta y Tres. No se conocen las causas de la baja viabilidad, y podría ser un problema para la conservación de esta población, por lo que sería importante investigar más sobre este aspecto. Se recomienda para futuras evaluaciones descartar previamente las semillas muertas.

7. RESUMEN

Ilex paraguariensis es un árbol con cuyas hojas se produce la yerba mate, bebida de gran importancia cultural y económica en Sudamérica. En Uruguay existen poblaciones nativas que corresponden a la zona más austral de la distribución natural de la especie. Existen evidencias de que estas poblaciones de *I. paraguariensis* son genéticamente diferentes, y diferentes a las de la zona central de distribución, por lo que constituyen un valioso recurso genético. Estas poblaciones han sido muy poco estudiadas hasta la actualidad. La reproducción a través de semillas presenta limitantes como un periodo muy extenso para que comience la germinación, bajo porcentaje de germinación, y germinación poco uniforme, ya que poseen dormición morfofisiológica. Se estudió el comportamiento germinativo de tres poblaciones nativas provenientes de Tacuarembó, Treinta y Tres y Aiguá, utilizando tratamientos de estratificación en frío factorializado con el agregado o no de giberelinas, con el objetivo de detectar si algún tratamiento lograba adelantar la germinación o aumentar el porcentaje de germinación. No se obtuvo diferencias en el porcentaje de germinación entre poblaciones, pero si en la viabilidad de las semillas, donde la población de Tacuarembó presentó una viabilidad significativamente mayor a las otras poblaciones. En los tratamientos de estratificación en frío se colocó un alto volumen de agua, que habría inducido a las semillas a una dormición secundaria, ya que no germinaron pero permanecieron viables. El agregado de giberelinas tuvo un efecto positivo en el porcentaje de germinación. También se realizó mediciones de la longitud de los embriones expuestos en tres momentos durante la incubación para intentar captar el momento en que comienzan a crecer. No se consiguió dicho objetivo, lo que sugiere que, durante la mayor parte del tiempo de incubación, las semillas no lograron disminuir lo suficiente el componente fisiológico de la dormición que impide que el embrión comience su desarrollo. Estos resultados permiten sustentar la existencia de ambos componentes de la dormición morfofisiológica de la especie, y plantean la necesidad de mayor investigación acerca de las poblaciones nativas de Uruguay.

Palabras clave: Dormición morfofisiológica; Estratificación en frío; Giberelinas; Viabilidad de semillas; Yerba mate.

8. SUMMARY

Ilex paraguariensis is a tree species whose leaves are used to produce yerba mate, a beverage with high economic and cultural importance in South America. The native populations in Uruguay are the southernmost of the species natural distribution. There is evidence that these *I. paraguariensis* populations are genetically different among them, and also different from those at the central area of distribution, which makes them a valuable genetic resource. These populations have not been studied much until today. The reproduction through seeds presents limitations, as very long germination timing, and a low germination percentage, due to they have the morphophysiological dormancy class. The germination behavior was studied through three native populations from Tacuarembó, Treinta y Tres and Aiguá, using cold stratification treatments factorialized with or without addition of gibberelic acid, to find out if any treatment could decrease germination timing or increase its percentage. No differences were found in germination between populations, but there were differences in seed viability, where Tacuarembó population showed significantly higher values. Cold stratification treatments were carried out with a high water volume, which would have induced the seeds into a secondary dormancy, as these seeds did not germinate but remained viable. The addition of gibberelic acid had a positive effect on the germination percentage for non-stratified seeds. Embryo length measurements were made in three moments, to determine when they start growing during germination. That objective was not achieved, which suggests that during the most part of incubation the seeds were not able to reduce enough the physiological component of seed dormancy, which prevent morphological component release (embryo growth and development). These results allow to sustain the existence of both components (physiological and morphological) of *I. paraguariensis* seed dormancy, and discuss the relevance of increasing investigation on Uruguayan native populations.

Key words: Morphophysiological dormancy; Cold stratification; Gibberellins; Seed viability; Yerba mate.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aranda, D. 1986. Área de distribución natural de la yerba mate. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Misiones. Miscelánea no. 14. 17 p.
2. Arévalo, J. 1998. Tratamientos para mejorar la germinación de semillas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y algarrobo (*Prosopis* spp.). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. Universidad Zamorano. 43 p.
3. Baskin, J. M.; Baskin, C. C. 2000. Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego, Academic Press. 666 p.
4. Batlla, D.; Benech-Arnold, R. L. 2010. Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Molecular Biology*. 73:3-13.
5. Benech-Arnold, R.; Sanchez, R.; Forcella, F.; Kruk, B.; Ghersa, M. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*. 67:105-122.
6. Bennadji, Z.; Alfonso, M.; Mello, S.; Núñez, P.; Rodríguez, F.; González, W. 2017. Enfoques y avances en domesticación y diversificación de especies forestales de alto valor en INIA. In: Jornada Técnica Domesticación y Diversificación de Especies Forestales de Alto Valor (2017, Tacuarembó). Resúmenes. Montevideo, INIA. p. 5 (Actividades de Difusión no. 774).
7. Bewley, J.; Black, M. 1994. Seeds. Physiology of development and germination. 2nd. ed. New York, Plenum. 445 p.
8. _____. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9(7):1055-1066.
9. _____.; Bradford, K. J.; Hilhorst, H.; Nonogaki, H. 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3rd. ed. New York, Springer. 392 p.
10. Brondani, G.; Wendling, I.; Santin, D.; Benedetti, E.; Roveda, L.; Orrutea, A. 2007. Ambiente de enraizamiento e substratos na miniestaquia de erva-mate. *Scientia Agraria*. 8(3):257-267.
11. Brussa, C.; Grela, I. 2007. Flora arbórea del Uruguay: con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Montevideo, COFUSA. 544 p.
12. Burtnik, O. 2003. Manual del pequeño yerbatero correntino. Santo Tomé, INTA. 58 p.

13. _____. 2006. Yerba mate: manual de producción. 3a. ed. Santo Tomé, INTA. 52 p.
14. Cabrera, A.; Willink, A. 1973. Biogeografía de América Latina. Washington, D. C., OEA. 120 p. (Monografía no. 13).
15. Cascales, J.; Bracco, M.; Poggio, L.; Gottlieb, A. M. 2014. Genetic diversity of wild germoplasm of “yerba mate” (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. *Genetica*. no. 142:563-573.
16. Catapan, M. 1998. Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Tesis MSc. en Ciencias Forestales. Paraná, Brasil. Universidad Federal de Paraná. 97 p.
17. Chien, C. T.; Chen, S. Y.; Chien, T. Y.; Baskin, J. M.; Baskin, C. C. 2011. Nondeep simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex maximowicziana* from northern (subtropical) and southern (tropical) Taiwan. *The Ecological Society of Japan*. 26:163-171.
18. Cunha, G.; Ferreira, A. 1987. Viabilidade das sementes de erva-mate. *Ciência e Cultura*. 39(10):954-656.
19. Cuquel, F. L.; De Carvalho, M. L. M.; Chamma, H. M. C. P. 1994. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. *Scientia Agricola*. 51(3):451-421.
20. Daniel, O. 2009. Erva-mate. Sistema de produção e processamento industrial. Dourados, MS, Universidade Federal da Grande Dourados. 288 p.
21. De Araujo Mariath, J. E.; Coelho, G.; dos Santos, R.; Heuser, E.; Ayub, D.; Cocucci, A. 1995. Aspectos anatômicos e embriológicos em espécies do gênero *Ilex*. In: Winge, H.; Gui Ferreira, A.; De Araujo Mariath, J. E.; Tarasconi, L. C. eds. Erva-mate, biologia e cultura no cone Sul. Porto Alegre, RS, UFRGS. pp. 263-280.
22. De Souza, A.; de Oliveira, L.; Souza, G.; Pulchale, L.; Schossler, S.; Liesch, P.; Sá, A. 2017. Qualidades física e sanitária de sementes de *Ilex paraguariensis*. In: Congreso Sul-Americano da Erva-Mate (7°. , 2017, Erechim, RS). Trabalhos apresentados. Erechim, Brasil, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. pp. 114-119.
23. Dutour, P. 2013. Sin espacio para el oro verde. (en línea). El Observador, Montevideo, UY, set. 20:s.p. Consultado 27 may.

2017. Disponible en <https://www.elobservador.com.uy/nota/sin-espacio-para-el-oro-verde-201392019590>

24. Fenner, M.; Thompson, K. 2005. The ecology of seeds. Cambridge, Cambridge University. 250 p.
25. Finch-Savage, W. E.; Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*. 171:501-523.
26. Floss, P. A. 1994. Variações genéticas entre populações naturais de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) avaliadas em Chapecó-SC e Três Barras-SC. Tesis MSc. Ciências Florestais. Piracicaba, Brasil. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 94 p.
27. Fowler, J.; Sturion, J. 2000. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. EMBRAPA. Comunicado técnico. no. 45:1-5.
28. _____.; _____.; Zuffellato-Ribas, K. 2010. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. *Pesquisa Florestal Brasileira*. 54:105-108.
29. Galindez, G.; Ceccato, D.; Bubbillo, R.; Lindow-López, L.; Malagrina, G.; Ortega-Baes, P.; Baskin, C. 2018. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. *Seed Science Research*. abr. 2018:1-9.
30. Gauer, L.; Cavalli-Molina, S. 1999. Genetic variation in natural populations of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity*. 84:647-656.
31. Giberti, G. 1994. Aquifoliaceae. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. *Flora del Paraguay*. 24:1-34.
32. _____. 1995. Aspectos oscuros de la corología de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: Winge, H.; Gui Ferreira, A.; De Araujo Mariath, J. E.; Tarasconi, L. C. eds. *Erva-mate, biología e cultura no cone Sul*. Porto Alegre, RS, UFRGS. pp. 289-300.
33. Glison, N.; Viega, L.; Speranza, P. 2017. Differential incidence of the lemma on seed germination among different *Paspalum dilatatum* genotypes. *Journal of Seed Science*. 39(2):133-141.
34. Grela, I. 2004. Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Tesis de Maestría

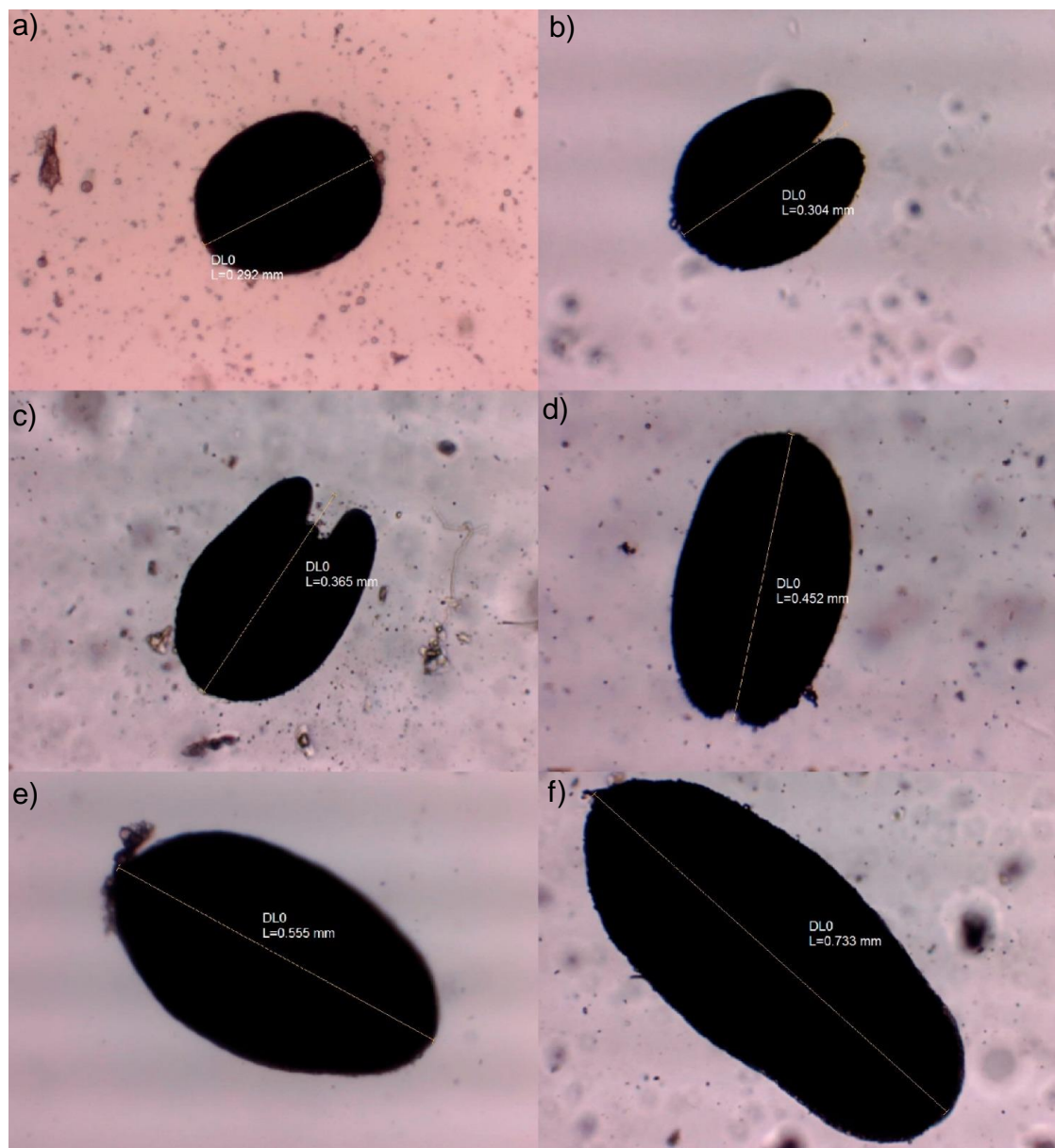
- en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 97 p.
35. Grondona, E. 1954. Historia de la yerba mate. II. Sinonimia, cariología y distribución geográfica. *Revista Argentina de Agronomía*. 21(1):9-24.
 36. Gualano N.; Benech-Arnold, R. 2009. Predicting pre-harvest sprouting susceptibility in barley: looking for “sensitivity windows” to temperature throughout grain filling in various commercial cultivars. *Field Crop Research*. 114:35-44.
 37. Hampe, A.; Petit, R. 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*. 8:461-467.
 38. _____; Jump, A. 2011. Climate Relicts: past, present, future. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 42:313-333.
 39. Hernández, P. 2019. Estructuración geográfica de la variabilidad genética de *Ilex paraguariensis* St. Hil. en el Uruguay. Tesis MSc. en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 59 p.
 40. Heuser, E. D.; Ferreira, A. G.; Matiath, J. E. 1993. *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 29(1-2):39-48.
 41. Hu, C. Y. 1975. In vitro culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 100(3):221-225.
 42. Jolochin, G. 2016 Análisis biogeográfico de la variabilidad genética de *Eugenia uniflora* L. en Uruguay. Tesis MSc. en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 45p.
 43. Malheiros de Olivera, Y. M.; Rotta, E. 1985. Área de distribuição natural de Erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). EMBRAPA. Documentos no. 15:17-35.
 44. Manen, J. F.; Boulter, M. C.; Naciri-Graven, Y. 2002. The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data. *Plant Systematics and Evolution*. 235:79-98.

45. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, BR). 2009. Regras para análise de sementes. Brasília, Assessoria de Comunicação Social. 399 p.
46. Medeiros, A. C. 1998. Dormencia en sementes de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). EMBRAPA. Documentos. no. 36:1-25.
47. MEF. DNA (Ministerio de Economía y Finanzas. Dirección Nacional de Aduanas, UY). 2018. Público por Arancel. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado may. 2018. Disponible en <https://aplicaciones.aduanas.gub.uy/LuciapubX/PUBLICACION.Publico.HCN1Publico.aspx>
48. Montesdeoca, S. J. 2002. Tratamientos para mejorar la germinación de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. Universidad de Zamorano. 24 p.
49. Navajas, A. 1995. La economía yerbatera argentina. In: Winge, H.; Gui Ferreira, A.; De Araujo Mariath, J. E.; Tarasconi, L. C. eds. Erva-mate, biología e cultura no cone Sul. Porto Alegre, RS, UFRGS. pp. 23-26.
50. Niklas, C. O. 1987. Estudios embriológicos y citológicos en la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Bomplandia. 6(1):45-56.
51. Pires, E.; Stedille, L.; Machado, S.; Mantovani, A.; Bortoluzzi, R. 2014. Biología reproductiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. Revista de Ciências Agroveterinárias. 13(2):171-180.
52. Posibilidades de cultivar la yerba mate en nuestros suelos. 1965. El Día, Montevideo, UY. set. 3:s.p.
53. Ricca, J. 2003. El mate. Los secretos de la infusión desde la cultura nativa hasta nuestros días. 2ª. ed. Montevideo, Mandinga. 360 p.
54. Rocha, P.; Niella, F.; Duarte, E.; Gortari, F.; Morales, V. 2019. Manual de procedimientos para la propagación clonal de yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St Hil.). Misiones, Instituto Nacional de la Yerba Mate. 12 p.
55. Ross, S. 2017. Enfoques y avances en propagación de especies leñosas nativas desarrollados en FAgro-UDELAR. In: Jornada Técnica Domesticación y Diversificación de Especies Forestales de Alto Valor (2017, Tacuarembó). Resúmenes. Montevideo, INIA. p. 10 (Actividades de Difusión no. 774).

56. Sales, M. N.; Pérez-García, F.; Silveira, F. A. O. 2013. Consistent variation in seed germination across an environmental gradient in a Neotropical savanna. *South African Journal of Botany*. 87:129-133.
57. Schaparini, P.; Viecelli, C. 2011. Superação de dormência de sementes de erva mate. *Cultivando o Saber*. 4(4):163-170.
58. Sousa, V. A.; Daros, T. L.; Sturion, J. A. 2003. Fenología reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Congreso Forestal Estatal de Rio Grande do Sul (2003, Nova Prata). Trabajos presentados. Nova Prata, INTA. pp. 1-8.
59. Speranza, P. 2005. Los desafíos de la exploración de los recursos genéticos en plantas apomícticas: lecciones del caso de *Paspalum dilatatum*. *Agrociencia (Uruguay)*. 4(1-2):73-76.
60. _____; Seijo, J. G.; Grela, I. A.; Solís Neffa, V. G. 2007. Chloroplast DNA variation in the *Turnera sioides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *Journal of Biogeography*. 34(3):427-436.
61. Sturion, J. A. 1988. Produção de mudas e implantação de povoamentos com Erva mate. EMBRAPA. Circular técnica no. 17. 10 p.
62. Tezuka, T.; Yokoyama, H.; Tanaka, H.; Shiozaki, S.; Oda, M. 2013. Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. *HortScience*. 48(3):352-356.
63. Tomé, E. 1952. La yerba mate. *Almanaque del Banco de Seguros del Estado 1952*:85-88.
64. Tormen, M. J. 1995. Economía ervateira brasileira. In: Winge, H.; Gui Ferreira, A.; De Araujo Mariath, J. E.; Tarasconi, L. C. eds. *Erva-mate, biologia e cultura no cone Sul*. Porto Alegre, RS, UFRGS. pp. 27-40.
65. Tronco, K.; Bisognin, D.; Fleig, F.; Horbach, M. 2015. Enraizamiento ex vitro e aclimatação de microestacas de *Ilex paraguariensis* A. St Hil. *Cerne*. 21(3):371-378.
66. Tsang, A.; Corlett, R. 2005. Reproductive biology of the *Ilex* species (Aquifoliaceae) in Hong Kong, China. *Canadian Journal of Botany*. 83:1645-1654.
67. Turchetto, C.; Fagundes, N.; Segatto, A.; Kuhlemeier, C.; Solís Neffa, V.; Speranza, P.; Bonatto, S.; Freitas, L. 2014. Diversification in the

South American Pampas: The genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology*. 23(2):374-389.

68. Uruguay tiene en sus manos el autoabastecimiento de yerba mate. 1965. La Mañana, Montevideo, UY, oct. 25:s.p.
69. Vaio, M. 2000. Análisis citogenético de ocho accesiones de *Paspalum quadrifarium* Lam. (Gramineae). Tesis de grado Licenciatura en Biología. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 49 p.
70. Vleeshouwers, L. M.; Bouwmeester, H. J.; Karssen, C. M., 1995. Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology*. 83:1031-1037.
71. Wagmann, K.; Hautekèete, N.; Meunier, C.; Schmitt, E.; Van Dijk, H. 2012. Seed dormancy distribution: explanatory ecological factors. *Annals of Botany*. 110:1205-1219.
72. Wendling, I.; Brondani, G.; Biassio, A.; Ferreira, L. 2013. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. *Acta Scientiarum (Agronomy)*. 35(1):117-125.
73. Zanon, A. 1988. Produção de sementes da erva-mate. EMBRAPA. Circular técnica no. 16. 8 p.

10. ANEXOS

Los embriones correspondientes a a), b), y c) se encuentran en el estadio de corazón, d) y e) en el estadio de pos-corazón y f) en el estadio de torpedo (Heuser et al., 1993).

Figura 6. Fotos de embriones en las distintas etapas de desarrollo tomadas durante las mediciones

Cuadro 3. Medias ajustadas y error estándar del tamaño inicial de embriones medidos por individuo para las semillas sin tratamientos

Población	Individuo	Longitud (mm)
Tacuarembó	Tbo1	0,36 ± 0,02 (7)
	Tbo2	0,30 ± 0,02 (6)
	Tbo3	0,32 ± 0,01 (10)
Treinta y Tres	Tyt4	0,30 ± 0,03 (5)
	Tyt5	0,35 ± 0,03 (7)
	Tyt6	0,23 ± 0,03 (4)
Aiguá	Aig7	0,33 ± 0,02 (9)
	Aig8	0,30 ± 0,02 (6)
	Aig9	0,40 ± 0,04 (2)

* Entre paréntesis se muestra el número de semillas cuyo embrión pudo ser medido, las restantes (de un total de 10) no contenían un embrión viable.

Cuadro 4. Medias ajustadas y error estándar del tamaño de embriones en los tres momentos de medición, por individuo y agregado de giberelinas (GA) o agua destilada, para las semillas que no fueron sometidas a estratificación

Población	Individuo	Medición 1		Medición 2		Medición 3	
		Agua	GA	Agua	GA	Agua	GA
Tacuarembó	Tbo1	0,29 ± 0,02 (8)	0,37 ± 0,02 (7)	0,33 ± 0,01 (10)	0,32 ± 0,02 (6)	0,37 ± 0,02 (5)	0,33 ± 0,02 (5)
	Tbo2	0,33 ± 0,02 (7)	0,35 ± 0,02 (7)	0,31 ± 0,02 (8)	0,31 ± 0,02 (7)	0,33 ± 0,02 (9)	0,34 ± 0,02 (8)
	Tbo3	0,32 ± 0,02 (4)	0,34 ± 0,02 (6)	0,33 ± 0,02 (7)	0,36 ± 0,02 (6)	0,37 ± 0,02 (8)	0,33 ± 0,02 (7)
Treinta y Tres	Tyt4	0,35 ± 0,04 (2)	0,39 ± 0,04 (2)	0,35 ± 0,06 (1)	0,42 ± 0,06 (1)	0,42 ± 0,06 (1)	0,26 ± 0,06 (1)
	Tyt5	0,31 ± 0,06 (1)	0,37 ± 0,04 (2)	NA	0,40 ± 0,06 (1)	0,47 ± 0,04 (2)	0,40 ± 0,04 (2)
	Tyt6	0,33 ± 0,04 (2)	NA	0,37 ± 0,06 (1)	NA	0,34 ± 0,03 (4)	NA
Aiguá	Aig7	0,34 ± 0,02 (7)	0,31 ± 0,03 (4)	0,31 ± 0,03 (5)	0,45 ± 0,04 (2)	0,31 ± 0,02 (6)	0,37 ± 0,03 (4)
	Aig8	NA	0,30 ± 0,04 (2)	0,40 ± 0,06 (1)	0,34 ± 0,04 (2)	0,29 ± 0,06 (1)	NA
	Aig9	0,37 ± 0,03 (4)	0,37 ± 0,03 (5)	0,39 ± 0,03 (5)	0,42 ± 0,03 (4)	0,41 ± 0,02 (8)	0,44 ± 0,03 (3)

Entre paréntesis se muestra el número de semillas cuyo embrión pudo ser medido, las restantes (de un total de 10) no contenían un embrión viable. NA: ninguna de las 10 semillas presentó un embrión viable.

Cuadro 5. Medias ajustadas y error estándar del tamaño de embriones en los tres momentos de medición por individuo y agregado de giberelinas (GA) o agua destilada, para las semillas que fueron sometidas a dos meses de estratificación

Población	Individuo	Medición 1		Medición 2		Medición 3	
		Agua	GA	Agua	GA	Agua	GA
Tacuarembó	Tbo1	0,32 ± 0,02 (4)	0,36 ± 0,02 (9)	0,34 ± 0,02 (5)	0,34 ± 0,02 (7)	0,34 ± 0,02 (6)	0,34 ± 0,02 (8)
	Tbo2	0,35 ± 0,02 (9)	0,33 ± 0,02 (8)	0,35 ± 0,02 (5)	0,34 ± 0,02 (6)	0,35 ± 0,02 (6)	0,36 ± 0,02 (7)
	Tbo3	0,31 ± 0,02 (7)	0,32 ± 0,02 (7)	0,31 ± 0,02 (6)	0,34 ± 0,02 (6)	0,32 ± 0,02 (8)	0,33 ± 0,02 (6)
Treinta y Tres	Tyt4	NA	0,37 ± 0,06 (1)	0,28 ± 0,06 (1)	0,54 ± 0,04 (1)	0,38 ± 0,06 (2)	NA
	Tyt5	0,34 ± 0,04 (3)	0,33 ± 0,03 (4)	0,41 ± 0,06 (1)	0,36 ± 0,06 (1)	0,34 ± 0,04 (3)	0,43 ± 0,04 (2)
	Tyt6	0,29 ± 0,04 (2)	0,35 ± 0,04 (2)	NA	0,45 ± 0,06 (1)	0,40 ± 0,4 (2)	0,28 ± 0,04 (2)
Aiguá	Aig7	0,33 ± 0,03 (5)	0,30 ± 0,03 (4)	0,31 ± 0,04 (2)	0,33 ± 0,03 (3)	0,33 ± 0,04 (2)	NA
	Aig8	0,31 ± 0,06 (1)	NA	NA	NA	NA	NA
	Aig9	0,38 ± 0,03 (4)	0,40 ± 0,02 (6)	0,40 ± 0,03 (3)	0,44 ± 0,04 (2)	NA	0,32 ± 0,04 (2)

Entre paréntesis se muestra el número de semillas cuyo embrión pudo ser medido, las restantes (de un total de 10) no contenían un embrión viable. NA: ninguna de las 10 semillas presentó un embrión viable.

Cuadro 6. Medias ajustadas y error estándar del tamaño de embriones en los tres momentos de medición por individuo y agregado de giberelinas (GA) o agua destilada, para las semillas que fueron sometidas a cuatro meses de estratificación

Población	Individuo	Medición 1		Medición 2		Medición 3	
		Agua	GA	Agua	GA	Agua	GA
Tacuarembó	Tbo1	0,36 ± 0,02 (5)	0,34 ± 0,02 (5)	0,34 ± 0,02 (4)	0,33 ± 0,02 (4)*	0,26 ± 0,02 (5)*	0,28 ± 0,02 (4)*
	Tbo2	0,32 ± 0,02 (6)	0,34 ± 0,02 (9)	0,36 ± 0,02 (8)	0,35 ± 0,02 (8)*	0,21 ± 0,02 (4)*	0,24 ± 0,02 (9)*
	Tbo3	0,34 ± 0,02 (9)	0,33 ± 0,02 (8)	0,37 ± 0,02 (7)	0,31 ± 0,02 (9)*	0,26 ± 0,02 (9)*	0,21 ± 0,02 (4)*
Treinta y Tres	Tyt4	0,40 ± 0,06 (1)	0,36 ± 0,06 (1)	0,35 ± 0,06 (1)	0,42 ± 0,06 (1)	0,44 ± 0,06 (1)	0,42 ± 0,06 (1)
	Tyt5	0,34 ± 0,04 (2)	0,32 ± 0,03 (4)	0,42 ± 0,06 (1)	NA	0,35 ± 0,04 (2)	0,44 ± 0,06 (1)
	Tyt6	0,32 ± 0,06 (1)	0,39 ± 0,06 (1)	NA	NA	NA	NA
Aiguá	Aig7	0,33 ± 0,03 (4)	0,32 ± 0,04 (2)	0,38 ± 0,06 (1)	0,39 ± 0,04 (2)	0,36 ± 0,04 (2)	0,35 ± 0,02 (6)
	Aig8	NA	NA	0,35 ± 0,06 (1)	NA	NA	NA
	Aig9	0,39 ± 0,03 (4)	0,38 ± 0,03 (5)	0,40 ± 0,02 (7)	0,46 ± 0,03 (3)	0,48 ± 0,03 (4)	0,42 ± 0,02 (7)

Entre paréntesis se muestra el número de semillas cuyo embrión pudo ser medido, las restantes (de un total de 10) no contenían un embrión viable. NA: ninguna de las 10 semillas presentó un embrión viable. *Valores con error de medición por problema en la cámara.