



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Evaluación de técnica de etiolación con aplicación de ácido indol butírico (AIB) a distintas concentraciones en propagación de estacas de boldo (*Peumus boldus*)

MEMORIA DE TÍTULO

MARCOS DANIEL SUAZO BERRÍOS

TALCA, CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Evaluación de técnica de etiolación con aplicación de ácido indol butírico (AIB) a distintas concentraciones en propagación de estacas de boldo (*Peumus boldus*)

Por

MARCOS DANIEL SUAZO BERRÍOS

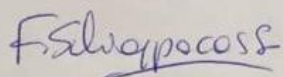
MEMORIA DE TÍTULO

Presentada a la Universidad de Talca
como parte de los requisitos para optar al título de

INGENIERO AGRÓNOMO

TALCA, 2019

Acta de aprobación:



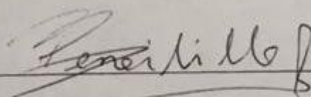
Profesor Guía:

Ing. Agr. M S.

Flavia Schiappacasse Canepa

Profesora Escuela de Agronomía

Universidad de Talca



Profesor Informante:

Lic. En Biología. Dr. En Ciencias Mención Botánica

Patricio Peñailillo Brito

Profesor Instituto de Biología y Biotecnología Vegetal

Universidad de Talca

Fecha de presentación de la defensa de Memoria: 14 de Agosto 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Profesor Patricio Peñailillo y a la profesora Flavia Schiappacasse por su tiempo, dedicación y entrega de conocimientos para la realización de este estudio, por su buena voluntad y disposición para cada una de las veces en que tuve alguna inquietud.

Al Doctor Nelson Brown, director del centro de Histopatología, quien colaboró con la prestación de sus dependencias de los laboratorios en donde se realizaron trabajos trascendentes para los resultados de esta investigación guiados por Fernando Guerrero y Nicole Cespedes quienes no dudaron en brindar su ayuda cuando se requirió.

A Osvaldo Palma, amigo y compañero de generación quien facilitó su campo en donde se pudo obtener el material vegetal utilizado, además de una buena disposición a las visitas programadas por parte mía.

A Javiera Canales y Lautaro Suazo quienes son mi motivo de superación, y por su apoyo incondicional a lo largo de este periodo, pues son quienes siempre estuvieron ahí, incluso cuando mis ganas de continuar no eran las suficientes para lograr el objetivo.

A mi familia, en especial a mi Abuela Olivia, mi madre Cecilia y mi hermano Jaime quienes siempre me brindaron su apoyo y palabras de aliento en el momento que las necesité.

Y por último a mis amigos y compañeros en especial a, Marcelo, Dino, Chamorro, Acle, Seba y Mauro que a lo largo de esta estadía en la universidad se transformaron en mi segunda familia brindando hogar en oportunidades que se necesitó y brazos de ayuda para momentos en que no creí ser capaz.

RESUMEN

Se estudió la aplicación de la técnica conocida como “Blanching” la cual ha sido desarrollada por los investigadores Brian Maynard y Nina Bassuk para especies recalcitrantes al enraizamiento, la que busca promover el desarrollo de raíces adventicias a partir de estacas tras la aplicación de AIB comercial y está en cama de enraizamiento.

El material vegetal fue recolectado el día 25 de marzo de 2019 tras una estadía de aproximadamente 5 meses con la aplicación de “Blanching” en el árbol procedente de Villa Alegre, Maule. Fue mantenido en camas de enraizamiento a partir del 25 de marzo hasta el 28 de mayo de 2019 bajo condiciones relativamente controladas de temperatura y humedad en un invernadero cubierto con polietileno sin calefacción.

El boldo es una especie nativa recalcitrante a su propagación, el objetivo de este estudio fue aplicar la técnica llamada “Blanching” y lograr altos porcentajes de estacas enraizadas para su propagación. Después de haber estado en cama de enraizamiento por dos meses, estas estacas no lograron enraizar. Algunas fueron removidas y analizadas macroscópicamente para establecer diferencias. Se definieron tres condiciones dentro del total de las repeticiones. Estas condiciones fueron estudiadas microscópicamente observando crecimiento y desarrollo de tejidos de interés como Epidermis, Córtez, Esclerénquima, Floema y Xilema secundario. Los resultados obtenidos a partir de los cortes transversales del tallo en donde fue posible ver su anatomía, mostró patrones de crecimiento los cuales nos indicaron que la utilización de “Blanching” si tuvo efecto sobre estas estacas, ya que los tallos estudiados presentaron debilitamiento de sus paredes celulares y un menor crecimiento de tejidos en comparación a cortes transversales que no recibieron la aplicación de esta técnica.

ABSTRACT

The application of the technique known as “Blanching” was studied, which has been developed by researchers Brian Maynard and Nina Bassuk for recalcitrant species to rooting, which seeks to promote the development of adventitious roots from cuttings after the application of commercial AIB and stay in rooting bed.

The plant material was collected on March 25, 2019 after a stay of approximately 5 months with the application of “Blanching” on the tree from Villa Alegre, Maule. It was kept in rooting beds from March 25 until May 28, 2019 under relatively controlled temperature and humidity conditions in a greenhouse covered with unheated polyethylene.

Boldo is a native species recalcitrant to its propagation, the objective of this study was to apply the technique called "Blanching" and achieve high percentages of cuttings rooted for propagation. After having been in rooting bed for two months, these cuttings failed to root. Some were removed and analyzed macroscopically to establish differences. Three conditions were defined within the total repetitions. These conditions were studied microscopically observing growth and development of tissues of interest such as Epidermis, Cortex, Sclerechyma, Phloem and secondary Xylem. The results obtained from the cross-sections of the stem where it was possible to see its anatomy, showed growth patterns which indicated that the use of “Blanching” did have an effect on these cuttings, since the stems studied showed weakening of their cell walls and lower tissue growth compared to cross sections that did not receive the application of this technique.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivo general.....	2
1.3 Objetivos específicos	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Antecedentes generales del boldo.....	4
2.2 Propagación del boldo.....	4
2.2.1 Propagación por semillas.....	5
2.2.2 Propagación vegetativa.....	5
2.3 Técnicas para especies difíciles de propagar	6
2.3.1 Fisiología de la etiolación de tejidos	6
2.3.2 Técnica de “Bandeado”	7
2.3.3 Técnica de “Blanching”	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Material vegetal	8
3.2 Tratamientos	8
3.3 Mediciones y obtención de datos	9
3.4 Análisis histológico en cortes transversales	9
3.5 Diseño experimental y análisis estadístico	11
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
V. CONCLUSIONES.....	25
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	26

I. INTRODUCCIÓN

El Boldo (*Peumus boldus* Molina), es un árbol de follaje perenne endémico de Chile (Montenegro, 2000). La especie se distribuye entre las regiones IV y X (Donoso, 1981), siendo en la V y VI regiones donde se encuentra la más alta densidad de la especie, seguida por la IX y X regiones (CONAF-CONAMA - BIRF, 1997). De sus hojas es posible extraer una serie de alcaloides, entre los cuales figura la boldina, cotizada desde el siglo XIX por sus propiedades medicinales (Ruegger, 1959). Además, presenta una acción digestiva, antioxidante, sedante y anti-diurética, entre otras. La potencia antioxidante del extracto acuoso del boldo se basa en compuestos como flavonoides y catequinas. (Del Valle et al., 2005).

Del boldo no sólo podemos encontrar beneficios para la salud del ser humano, sino que también nos entrega sombra debido a su altitud, que alcanza los 3 a 6 metros de altura y a su denso follaje. Es una especie dioica, de copa globosa, las hojas son ovaladas duras, muy aromáticas, y sus flores son unisexuadas, de color blanco-amarillento, de 5 a 10 mm de diámetro que crecen en forma de racimo (Botti y Cabello, 1990).

Hoffmann y Alliende (1984) establecen que el boldo presenta diferencias de ritmos de crecimiento, esto se debe a que existen individuos macho y hembra, que difieren en tiempos de desarrollo en cuanto a gineceo y androceo se refiere. Existe poca regeneración de la especie en poblaciones naturales, lo que puede ser afectado por factores ambientales adversos, como la exposición a prolongados periodos secos o al pastoreo y, por la dificultad que presentan las semillas en la germinación, las que en general requieren un largo período para que puedan emerger como plántulas (San Martín y Doll, 1998). Las semillas de boldo presentan un mecanismo de latencia que se asocia a la presencia de condiciones ambientales desfavorables durante el período de su diseminación (Figueroa et al., 1996). Esta dificultad en la germinación es provocada fundamentalmente por la presencia de aceites esenciales (terpinol y eugenol) que causan un efecto inhibitor del pericarpio que incide en el escaso porcentaje de semillas que germinan en forma natural y artificial mediante viverización (Rodríguez et al., 1983, cit. por Durán, 2005).

En general, en terreno la regeneración de la especie es mayoritariamente vegetativa, compuesta por retoños de árboles explotados para el autoconsumo de leña y carbón, venta de hojas, así como

también para destinar tierras al establecimiento de plantaciones forestales (Labbé, 1989; Rodríguez, 1997).

Los escasos antecedentes sobre propagación por estacas confirman que la reproducción de boldo mediante esta técnica es igualmente complicada (Santelices y Bobadilla, 1997), y sería importante contar con una técnica exitosa para el caso de desear multiplicar individuos superiores.

Bassuk y Maynard (1987) desarrollaron técnicas de propagación por estacas para especies difíciles de enraizar, tanto en ejemplares de hoja caduca y hoja perenne. Estas técnicas principalmente se basan en promover la etiolación de los tejidos donde se espera la emergencia de las futuras raíces. La etiolación según Maynard y Bassuk (1987) hace referencia al crecimiento y desarrollo de tejidos en ausencia de luz y al crecimiento de plantas en sombra intensa, por lo que aumenta considerablemente la sensibilidad del tallo a la acción de auxinas, a la vez que debilita y disminuye el desarrollo de paredes y membranas. La aplicación de estas técnicas propuestas podrían ser favorables para desarrollar ejemplares de boldo a partir de individuos superiores, con caracteres de interés definidos.

A continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente trabajo:

1.1 Hipótesis

La técnica de etiolación aplicada a esquejes de boldo (*Peumus boldus*), con posterior aplicación de auxina comercial (AIB) favorece el desarrollo de raíces.

1.2 Objetivo general

Evaluar la efectividad de la técnica conocida como “blanching” en la propagación de Boldo por estacas.

1.3 Objetivos específicos

- i. Evaluar el efecto de la aplicación de ácido indol butírico (AIB) en distintas concentraciones sobre el enraizamiento de estacas de boldo de dos individuos diferentes tomadas de un ambiente natural en Villa Alegre, región de Maule y sometidas a “blanching”.
- ii. Determinar diferencias a nivel histológico en cortes transversales de las estacas de boldo de las zonas con y sin “blanching”, antes de poner a enraizar y al cabo de dos meses en cama de enraizamiento.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales del boldo

El boldo (*Peumus boldus*) puede alcanzar hasta los 20 m de altura, pero en general su tamaño varía entre 3 y 6 m. Se presenta frecuentemente con un hábito arbustivo. Debido a cortas persistentes e incendios presenta una densa ramificación y un tronco más bien corto, que puede llegar a alcanzar 1 m de diámetro. Sus hojas son opuestas duras y asperas, de color verde claro en la cara inferior (Montenegro, 2000).

Respecto a los requerimientos hídricos podemos decir que no es una especie que demande una alta cantidad de agua para su óptimo desarrollo, el cual puede tener lugar con diversas condiciones. Schneeberger (2001) cita a Homann y Matte (1967) para hacer referencia que el boldo es poco resistente a las heladas. Montenegro (2000) indica que su condición semixerófito le permite adecuarse a períodos largos de sequía en provincias de la zona central de Chile, donde puede llegar a crecer en zonas pobres en cuanto a humedad y suelos.

San Martín y Doll (1998) establecen que esta especie crece con una temperatura media anual de 13,7°C y 10,5°C en el área norte y sur de su distribución, respectivamente, y en cuanto a las precipitaciones, indican que éstas varían a lo largo de su distribución, presentando un rango entre los 200 y 1200 mm.

2.2 Propagación del boldo

El boldo tiene exigencias y requerimientos para su reproducción natural por semillas. La propagación por semillas se ve favorecida por la sincronización de la floración entre los individuos masculinos y femeninos y la polinización por insectos generalistas (Hoffmann, 1981). Montenegro (2000) da a conocer al escaso porcentaje de germinación natural en áreas silvestres de las semillas de la especie y menciona que en la cepa de los boldos se observa la presencia de yemas subterráneas en receso vegetativo ubicadas en los denominados lignotúberes, que permiten una regeneración vigorosa natural, ante algún tipo de perturbación del ecosistema como un incendio, o cuando es talado para ser usado como fuente de madera para combustible.

2.2.1 Propagación por semillas

La propagación de esta especie naturalmente es desarrollada por semillas mediante polinización cruzada, principalmente por medio de insectos de la familia Syrphidae y algunos coleópteros (Hoffmann, 1981), lo que es afectado por factores ambientales. Otro factor no menos importante es el largo periodo que requiere la semilla para germinar. Esta presenta concentraciones de aceites esenciales como Terpeneol y Eugenol, las cuales tienen un efecto inhibitorio por sobre las semillas. La baja proporción de semillas germinadas es debido a que presentan un tipo de latencia combinada provocada por la disminución de las concentraciones de ácido giberélico (GA₃) durante el periodo de almacenamiento. Rodríguez (1997) cita a Muñoz (1986) para indicar que cuando la semilla recién ha sido cosechada las cantidades del ácido parecen ser las adecuadas, sin embargo, estas cantidades podrían disminuir en los periodos de almacenamiento, dado esto es necesario realizar aplicaciones externas de giberelinas para lograr germinar la semilla por lo que obtener ejemplares de Boldo mediante su propagación natural es dificultoso y de alta variabilidad genética.

2.2.2 Propagación vegetativa

Mayoritariamente la regeneración natural del Boldo es vegetativa, la cual se presenta de forma natural en ejemplares longevos o sometidos a catástrofes naturales, o a la tala para el autoconsumo como leña y/o carbón, venta de hojas, así como también para destinar tierras a la agricultura y/o al establecimiento de plantaciones forestales (Labbé, 1989; Rodríguez, 1997). El árbol dañado es capaz de generar numerosos retoños debido a los lignotúberes presentes en la cepa.

Por su parte, Vogel et al. (2005), establecen la importancia de reproducir vegetativamente el boldo, para establecer material homogéneo de individuos con características deseables como gran vigorosidad, crecimiento y desarrollo.

Santelices y Bobadilla (1997) experimentaron que la propagación vegetativa procedente de rebrotes de tocón de Boldo tomadas durante los primeros días de septiembre, tras aplicaciones de concentraciones de 0-20000 ppm de auxinas exógenas y cama de enraizamiento es posible, sin embargo, tiene bajos porcentajes de estacas enraizadas que comprenden de 10-15%, no encontrando diferencias significativas entre diferentes concentraciones de AIB utilizadas.

Hartmann y Kester (1990) señalan que, en los casos de especies cuya germinación es escasa, o que presentan largos períodos para este proceso, se prefiere una propagación asexual mediante estacas para conseguir individuos juveniles de importancia productiva. Al respecto, Santelices y Bobadilla (1997) sostienen que el boldo se puede propagar por estacas incluso sin aplicación de auxinas; sin embargo, el tiempo de arraigamiento es más de 6 meses, lo cual sobrepasa el tiempo máximo de enraizamiento de tres meses de la mayoría de las especies arbóreas (Wright, 1964). El efecto del AIB en dosis de 0,5-2% no fue claro en el enraizamiento y los autores piensan que dosis más bajas a las utilizadas por ellos serían más adecuadas.

2.3 Técnicas para especies difíciles de propagar

La propagación vegetativa tiene efectos favorables para la reproducción de una especie que presenta dificultades de propagación natural tal y como ocurre con el boldo. Podemos encontrar diversas técnicas que son aplicadas para poder obtener efectos positivos en esta tarea de propagar una especie, dentro de las cuales podemos encontrar las técnicas de sombreado, etiolación, bandeado y “blanching”.

2.3.1 Fisiología de la etiolación de tejidos

La etiolación de los tejidos es una respuesta de desarrollo y crecimiento natural de la planta cuando ésta crece en carencia de un factor clave como es la luz, ya que la luz juega un rol de fuente de energía, calor e información, por lo que su crecimiento en su ausencia proporciona cambios a niveles anatómicos y morfológicos tales como alargamiento de tallos, debilitamiento de membranas y paredes celulares tanto en tallos como en hojas. Chory et al. (1989) y Deng et al. (1991) convienen que la etiolación es un proceso en el cual el patrón de desarrollo normal se encuentra reprimido, lo que indica que se trata de un crecimiento diferente al normalmente conocido bajo condiciones climáticas y de luz estándar. Según Bassuk y Maynard (1987) la etiolación se refiere al crecimiento de las plantas en ausencia de luz y además al crecimiento de éstas en sombreado intenso, esto causa que ocurra un considerable aumento de la sensibilidad del tallo a las auxinas, las cuales promueven el crecimiento y desarrollo de raíces adventicias.

Maynard y Bassuk (1996) establecen que los grosores de xilema secundario y floema vistos en un corte transversal de tallo, son inversamente proporcional al potencial de enraizamiento de

una estaca, dado que, si éstos son de menor envergadura, mayor es el porcentaje y grado de enraizamiento debido a que se presenta una menor resistencia a la emergencia de primordios radicales que crecen desde el interior del tallo. La exclusión de luz provoca una menor producción de lignina, de este modo en lugar de producir lignina los metabolitos fenólicos son aprovechados para promover la iniciación de raíces (Bassuk y Maynard, 1991). La etiolación de tejidos incide en la baja producción de lignina y baja formación de esclereidas, factores que al verse disminuidos son favorables para el desarrollo de raíces adventicias a partir de un tallo, debido a que estas estructuras son barreras anatómicas para que los primordios radicales emerjan al exterior con facilidad (Maynard y Bassuk, 1996).

2.3.2 Técnica de “Bandeado”

Al cubrir una planta de hoja caduca en receso con una tela opaca, la cual no permite el paso de la luz, se deja crecer sus brotes hasta que tengan una longitud de 5-7 cm, luego se procede a cubrir cada brote con bandas negras autoadhesivas de velcro en su base, la futura base de corte de las estacas (Hartmann et al., 1997). Posteriormente se retira la tela, aumentando gradualmente el paso de la luz y se procede a cortar las estacas “bandeadas” justo en la base donde se colocó la banda adhesiva de velcro. Finalmente, las bandas son retiradas de las estacas y éstas son puestas a enraizar.

2.3.3 Técnica de “Blanching”

Los investigadores Maynard y Bassuk (1987) se dieron cuenta que no era requisito que algunas plantas estuvieran cubiertas con una tela sombreadora, la cual no permite el paso de la luz, bastando solo el bandeo o “Blanching” en una porción de la planta. La técnica denominada como “Blanching” ha sido utilizada para referirse a la colocación de bandas de velcro en tallos de crecimiento expuestos a la luz (especialmente indicado para plantas de hoja perenne), donde se busca promover la etiolación de los tejidos en una porción determinada del tallo. Este crecimiento en ausencia de luz limita el desarrollo de esclereidas en la porción bandeada del tallo, disminuyendo así las barreras anatómicas a la emergencia de raíces adventicias y favoreciendo la posterior absorción de AIB externo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

El material utilizado en este experimento provino de dos individuos diferentes ubicados en la provincia de Linares, comuna de Villa Alegre. 35°39'19''S 71°44'23''W. Las condiciones de crecimiento de los individuos eran del tipo silvestre, ya que no recibieron ningún tipo de fertilización ni riego. Para la obtención de las estacas fueron seleccionados 100 brotes de crecimiento nuevo, color verde claro, pertenecientes al árbol 1 de pleno sol, el día 9 de octubre de 2018. Los brotes medían entre 4 a 7 cm de largo. En otro individuo (árbol 2 de semi sombra) se seleccionaron 100 brotes de igual características de desarrollo en cuanto a longitud y coloración del brote, el día 30 de octubre de 2018. Ambos árboles utilizados corresponden a especies hembra. A los brotes de los dos árboles ese día respectivo se les instaló una banda de velcro de 2 x 3 cm en la porción basal del brote, previa remoción de las hojas presentes en esa porción. Ambos árboles se encontraban en aparentes sanas condiciones sin presencia de alguna plaga o enfermedad. Las estacas, al cabo de aproximadamente 5 meses, con fecha 25 de marzo de 2019, fueron removidas del árbol para posteriormente trasladarlas a laboratorio en bolsas con humedad y temperatura fresca, dentro de una hielera para ser procesadas el mismo día. En todo momento las estacas fueron humectadas con un aspersor manual para prevenir su deshidratación.

3.2 Tratamientos

Los tratamientos consistieron en la aplicación de diferentes concentraciones de ácido indol butírico (AIB) a la base de la estaca post remoción del velcro e inflorescencias y recorte de una mínima porción de la base (3-5 mm) por inmersión durante 5 segundos. Los tratamientos fueron definidos por 3 concentraciones diferentes, sumado a un testigo para los dos individuos con un total de 160 estacas. Los tratamientos para el árbol 1 fueron: 0 ppm de AIB; 3000 ppm; 5000 ppm y 7000 ppm. Para el árbol 2 fueron definidos: 0 ppm de AIB; 6000 ppm; 8000 ppm y 10000 ppm. Estas concentraciones fueron preparadas en el laboratorio a partir de ácido indol butírico (AIB) de Distribuidora Yates, de una concentración de 10000 ppm disuelto en solución hidroalcohólica, disolviendo en alcohol isopropílico hasta llegar a la concentración requerida. Posteriormente se procedió a trasladar las estacas a la estación experimental en Panguilemo, a uno de los invernaderos con cobertura de polietileno que no cuenta con calefacción ambiental, lugar en donde

se encuentra un sistema de cama con caliente con temperatura basal de 18-22°C y aplicaciones de riego intermitente, el cual variaba su frecuencia entre 25 y 30 min entre riegos con un tiempo de 8 a 14 segundos de tiempo de riego. La frecuencia variaba según las condiciones ambientales dentro del invernadero, controlado por un sistema de riego automático de marca Mist a matic.

3.3 Mediciones y obtención de datos

Las mediciones que se realizaron en este experimento fueron análisis macroscópico de los distintos tratamientos observando presencia o ausencia de raíz, en caso de existir raíz se esperaba medir el grado de enraizamiento, aspecto interno y externo de la porción del tallo tratado obteniendo muestras de diferentes niveles de desarrollo para luego identificar diferencias a nivel histológico.

Se hicieron mediciones proporcionales de Epidermis + Córtez, Esclerénquima, Floema y Xilema secundario, respecto al radio de cada tallo. Las mediciones corresponden a 4 tallos diferentes, los cuales fueron definidos como:

- i. Corresponde a un tallo tomado el día 25 de marzo de 2019, en donde se analizó una porción de tallo con y sin bandeado, además de no haber sido puestas en cama caliente ni recibir aplicaciones externas de AIB.
- ii. Muestra tomada el día 28 de mayo de 2019 perteneciente al árbol 2 en condición 01-V, definido como un tallo sin mayores cambios morfológicos aparentes tras la aplicación de “blanching”, 6000 ppm de AIB y dos meses en cama de enraizamiento.
- iii. Muestra tomada el día 28 de mayo de 2019 perteneciente al árbol 2 en condición 02-H, el cual presenta un engrosamiento en la base tras la aplicación de “blanching”, 8000 ppm y dos meses en cama de enraizamiento.
- iv. Muestra tomada el día 28 de mayo de 2019 perteneciente al árbol 1 en estado 03-N, la que se identifica con una coloración basal negra presente tras la aplicación de “blanching”, 3000 ppm y dos meses en cama de enraizamiento.

3.4 Análisis histológico en cortes transversales

La preparación de muestras histológicas de cortes transversales de tallo de boldo se realizó en el Laboratorio de Histopatología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca.

El día 25 de marzo de 2019 fueron seleccionados dos tallos de material sobrante, los cuales no recibieron ningún tipo de tratamiento posterior al blanching. Estos tallos fueron inmersos en un líquido fijador vegetal compuesto por 50 ml de Etanol, 5 ml de ácido acético glacial, 10 ml de formalina y 35 ml de agua destilada (FAA) hasta el día 30 de mayo.

Con fecha 28 de mayo de 2019 se procedió a seleccionar 2 estacas provenientes y representativas de las 3 condiciones definidas. Las estacas fueron cortadas en porciones de 40-46 mm de tallo para ser inmersas en FAA durante 48 horas, luego las muestras se describieron macroscópicamente para efectos de orden y reconocimiento. Las pequeñas porciones de tallo con las que se procedió a trabajar pasaron por un procesador automático de tejidos de marca Leica, modelo TP-1020 en donde las muestras se deshidrataron sumergiendo los tejidos en soluciones de alcohol desde baja graduación hasta llegar a un estado absoluto, aclaración por medio de Xilol pasando por 3 contenedores y finalmente se sometieron a un proceso de impregnación en parafina líquida a 60°C. Después las muestras se llevaron a procesos de inclusión en el cual se confeccionan bloques de parafina utilizando el equipo llamado centro de inclusión de marca Leica, modelo EG-1150-H y una placa refrigerada de marca Leica, modelo EG 1150-C, donde se otorga una orientación específica al tejido y se rotula para confeccionar el bloque (taco) con un molde metálico de un tamaño determinado. Una vez terminado el bloque de parafina se realizó una limpieza del exceso de parafina ya solidificada para poder cortar en el Micrótopo de rotación manual de marca Leica, modelo RM-2235 en donde se obtuvo una fina película de parafina sólida con la muestra para ser puestas en un baño de flotación para cortes histológicos de marca Leica, modelo HI-1210, en donde la fina película de parafina flota y se estira para luego ser tomada con un portaobjeto rotulado previamente. Finalmente, las muestras fueron teñidas con el colorante azul de toluidina y posteriormente cubiertas con un cubreobjeto, el que fue adherido con resina sintética de marca Pertexx, para luego realizar análisis microscópicos.

Las observaciones microscópicas fueron realizadas en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad de Talca, utilizando un microscopio marca Motic, modelo BA-310 el cual cuenta con una cámara interna de marca Moticam, modelo 3, propiciando imágenes de alta calidad gracias a la utilización del programa Motic Image Plus 2.0.

Para la medición de tejidos internos del tallo como xilema secundario, floema secundario, esclerénquima, epidermis + córtex y diámetro del tallo se realizaron varias mediciones con el

programa Motic Image Plus 2.0, obteniendo rangos en micrómetros (μm). Posteriormente para poder realizar comparaciones entre tallos y sus tejidos se utilizó un promedio entre el rango de cada una y el radio para poder llevarlo a un número porcentual.

3.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Las estacas procedentes de cada árbol fueron consideradas como experimentos por separado. Cada tratamiento consistió en la aplicación de diferentes concentraciones de AIB, en las que por tratamiento se contó con 20 estacas, separadas en 4 repeticiones de 5 estacas cada una. El diseño experimental fue un diseño completamente al azar, con un solo factor definido como las diferentes concentraciones de AIB aplicadas a las estacas, con 4 niveles.

No se aplicó un análisis estadístico debido a que todos los resultados obtenidos de este experimento fueron 0, dado que no hubo enraizamiento.

Los valores de mediciones de estructuras internas del tallo no fueron comparadas estadísticamente debido al bajo número de muestras de estacas analizadas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha reportado que el Boldo es una especie con baja capacidad de enraizamiento. Al aplicar a estacas de Boldo concentraciones de 0,5-2% de AIB se obtuvieron porcentajes de enraizamiento que fluctuaron entre 5-15%, y el control sin AIB también arrojó 15% (Santelices y Bobadilla, 1997). En este estudio al cabo de dos meses en cama de enraizamiento no se observó desarrollo de raíz en ninguna de las estacas extraídas de dos individuos de Boldo en condiciones de hábitat distintas, sometidas al método de bandeado y tratados posteriormente con tratamiento exógeno de AIB. Este resultado tan diferente al de Santelices y Bobadilla (1997) podría deberse al tiempo que se mantuvieron las estacas en invernadero, 7 meses en los autores mencionados y dos en nuestro ensayo. Dado que el enraizamiento del Boldo supera a los 3 meses considerados normales para la mayoría de las especies leñosas (Wright, 1964), esta especie debe ser considerada como recalcitrante al enraizamiento.

Por otra parte, aunque no hubo enraizamiento, fue posible visualizar macroscópicamente diferencias en las estacas sometidas a distintas concentraciones y de árboles distintos. Así, se observaron estacas de color pardo consideradas como vivas 01-V (Fig. 4.1), estacas con la base del tallo con aumento en su diámetro consideradas como engrosadas 02-H (Fig. 4.2) y estacas con la base del tallo de color negra 03-N (Fig. 4.3). Las estacas del árbol 1 presentaron un 95% de las estacas en condición 03-N, en cambio las estacas provenientes del árbol 2 presentaron sólo un 11,25% (cuadro 4.1 y 4.2). La explicación más probable para estas diferencias podría ser el tiempo en que estuvieron cubiertas las estacas por un trozo de velcro, el cual crearía microambientes distintos para ambos árboles ya que el árbol 1 se encontraba a pleno sol y el árbol 2 a semisombra.



Figura 4.1 Condición 01-V: Tallo de boldo procedente del árbol 2 al cual se le aplicó 6000 ppm de AIB, de consistencia normal, presencia y color de hojas característico de la especie, ausencia de raíces adventicias después de 65 días en cama de enraizamiento.



Figura 4.2 Condición 02-H: Tallo de boldo procedente del árbol 2 al cual se le aplicó 8000 ppm de AIB, con engrosamiento de su parte basal, presencia y color de hojas característico de la especie, ausencia de raíces adventicias después de 65 días en cama de enraizamiento.



Figura 4.3 Condición 03-N: Tallo de boldo procedente del árbol 1 al cual se le aplico 3000 ppm de AIB, sin cambios morfológicos en cuanto a largo y diámetro, presencia de coloración negra en su parte basal después de 65 días en cama de enraizamiento.

Cuadro 4.1 Evaluación realizada el día 28 de mayo de 2019 a estacas tomadas de árbol 1, de pleno sol, situado en la comuna de Villa Alegre, con tratamiento de bandeado aplicado el día 9 de octubre de 2018 y posterior aplicación de soluciones de AIB por 5 segundos, 65 días después de establecimiento en cama de enraizamiento.

Concentraciones de AIB aplicadas a las estacas				
	0 ppm	3000 ppm	5000 ppm	7000 ppm
R1	N	N	N	N
R1	N	N	N	V
R1	N	N	N	N
R1	N	V	N	N
R1	N	N	N	N
R2	N	N	N	N
R2	N	N	N	N
R2	N	N	N	N
R2	N	N	V	N
R2	N	N	N	N
R3	N	N	N	N
R3	N	N	N	N
R3	N	N	N	N
R3	N	N	N	N
R3	N	N	N	N
R4	N	N	N	N
R4	N	N	N	N
R4	N	N	N	N
R4	N	V	N	N
R4	N	N	N	N

N= Tejido en negro la parte basal

V= Tejido en la parte basal Verde

Cuadro 4.2 Evaluación realizada el día 28 de mayo de 2019 a estacas tomadas de árbol 2 de semi sombra, situado en la comuna de Villa Alegre, con tratamiento de bandeado aplicado el día 30 de octubre de 2018 y posterior aplicación de soluciones de AIB por 5 segundos, 65 días después de establecimiento en cama de enraizamiento.

Concentraciones de AIB aplicadas a las estacas				
	0 ppm	6000 ppm	8000 ppm	10000 ppm
R1	N	V	V	V
R1	V	V	V	V
R1	V	V	N	V
R1	V	N	V	V
R1	V	V	N	V
R2	V	V	V	H
R2	V	V	V	V
R2	V	V	H	V
R2	V	V	V	V
R2	N	V	V	V
R3	V	V	V	V
R3	V	H	V	V
R3	N	V	V	V
R3	V	N	V	V
R3	V	V	V	V
R4	V	V	V	V
R4	V	V	H	V
R4	N	V	V	N
R4	V	V	V	V
R4	V	V	V	V

N= Tejido necrótico en la parte basal del tallo

V= Tejido verde en la parte basal del tallo

H= Tejido engrosado en la parte basal del tallo

A nivel microscópico, los tallos de las estacas presentaron diferencias anatómicas en las tres condiciones definidas anteriormente. Estas diferencias fueron comparadas con porciones de tallo del área con y sin bandeado procedente de estacas sobrantes del experimento que no contaba con ningún tipo de tratamiento, pertenecientes al árbol 2, las cuales fueron usadas como testigo.

La figura 4.4.A muestra un corte transversal de tallo de una estaca bandeada, que de afuera hacia adentro presenta una epidermis uniestratificada con pelos glandulares y tectores estrellados, un córtex bien desarrollado donde se observan masas de células blanquecinas bajo la epidermis y células secretoras esféricas con contenido claro, el floema secundario está rodeado por una banda más o menos continua de esclerénquima y el xilema secundario ocupa una parte importante del tallo. La porción de tallo no bandeada considerada como testigo sigue el mismo patrón histológico descrito para la porción bandeada (Fig 4.4.B). Sin embargo, el grosor del tejido vascular aumentó en la parte del tallo bandeada, lo mismo que la epidermis + córtex, en cambio, el crecimiento de la banda de esclerénquima perifloemática fue poco notorio con relación a la porción de tallo no bandeada (Cuadro 4.3).

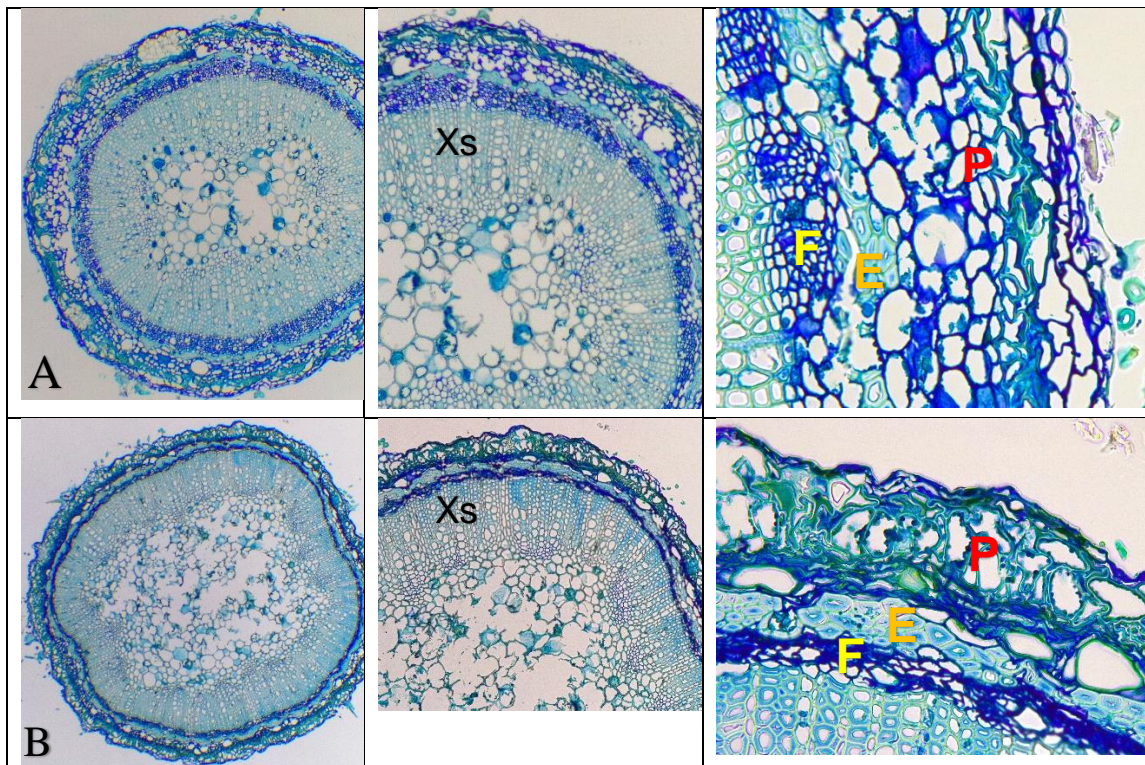


Figura 4.4 Cortes trasversales de tallo de Boldo tomadas el 25 de marzo de 2019, pertenecientes al árbol 2. A: porción de tallo bandeada y B: porción de tallo sin bandeado. P: Epidermis + Córtex; E: Esclerénquima perifloemático; F: Floema secundario; Xs: Xilema secundario.

Cuadro 4.3 Comparación anatómica entre porción de tallo bandeado y no bandeado de estacas de Boldo, tomadas el 25 de marzo de 2019, sin aplicación de AIB ni cama de enraizamiento.

	Tallo con bandeado		Tallo sin bandeado		Diferencia*
	Grosor		Grosor		
Tejidos	µm	%	µm	%	%
Xilema secundario	100-220	26,06	85-210	16,26	9,79
Floema	26-40	5,37	18-35	2,97	2,41
Esclerénquima	17-30	3,91	23-44	3,74	0,17
Epidermis + CórTEX	88-106	15,80	85-145	12,64	3,16
Radio de tallo	583-644	-	893-927	-	-

*Diferencia entre valores de grosor de tejidos de estacas tomadas el 25 de marzo de 2019 con y sin bandeado, sin aplicación de AIB y sin estadía en cama de enraizamiento.

La figura 4.5A representa a un tallo de boldo bandeado tratado con AIB. se observa que su micro-morfología sigue el mismo patrón de un tallo bandeado, sin AIB ni cama de enraizamiento (Fig. 4.4A), pero existe una leve disminución del grosor del xilema secundario y de la banda de esclerénquima perifloemática y un leve crecimiento del floema y de la epidermis + córtex (cuadro 4.4A).

Maynard y Bassuk (1996) tras la aplicación de bandeado y etiolación de tejidos y posterior aplicación de AIB comercial, observaron que a menor desarrollo de xilema secundario y floema se produce un mayor porcentaje de enraizamiento.

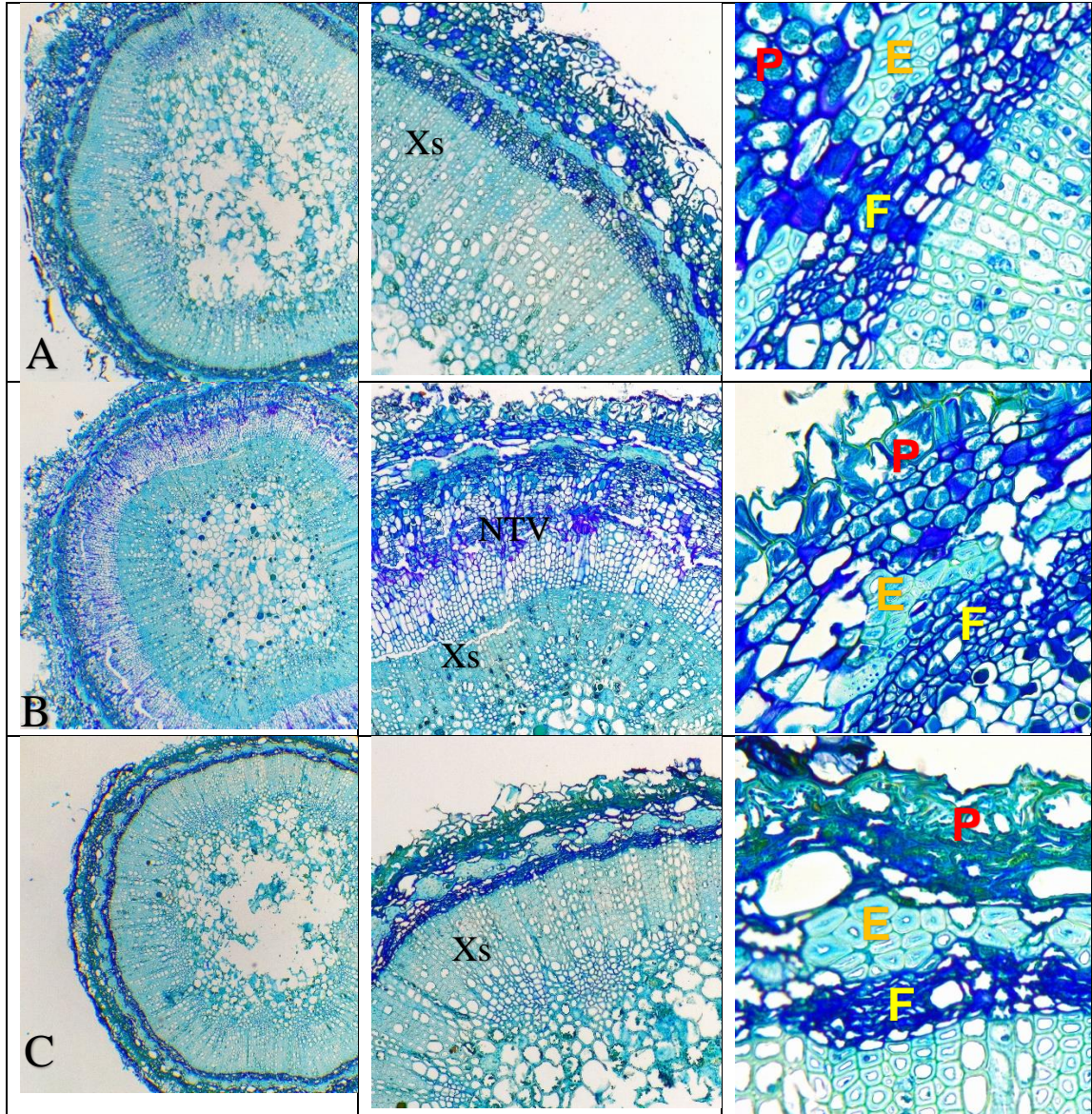


Figura 4.5 Cortes transversales de tallo de Boldo tomadas el 25 de marzo de 2019. A: porción de tallo bandeada, con aplicación de 6000 ppm en condición 01-V; B: porción tallo bandeada, con aplicación de 8000 ppm en condición 02-H; C: porción de tallo bandeada, con aplicación de 3000 ppm en condición 03-N. P: Epidermis + Córte; E: Esclerénquima; F: Floema; Xs: Xilema secundario; NTV: Nuevo tejido vascular.

La muestra de la condición 01-V (Figura 4.5 A) fue comparada estructuralmente con las imágenes proporcionadas desde el corte de tallo que no recibió tratamientos posteriores al blanching (Figura 4.4 A), en donde se puede observar un menor grosor de xilema secundario y esclerénquima con una diferencia porcentual de -1,61% y -1,39% respectivamente (Cuadro 4.4 A). Por otra parte, la comparación de porcentajes de grosor de los tejidos de la muestra en condición 01-V respecto al tallo tomado el 25 de marzo de 2019, presentó un menor desarrollo en porcentaje del xilema secundario y floema con un aumento de 8,2% y 4,3%, respectivamente (Cuadro 4.4 B). Sin embargo, no se observan signos de iniciación de raíces adventicias para esta condición (01-V).

Cuadro 4.3 A Comparación del grosor de tejidos entre tallo tomado el 25 de marzo 2019 y que recibió bandeado sin aplicación de AIB ni cama de enraizamiento, respecto a un tallo tomado el día 28 de mayo de 2019 con aplicación externa de AIB, bandeado y dos meses en cama de enraizamiento en condición 01-V.

Tejidos	Tallo con bandeado		Tallo en condición 01-V		Diferencia*
	Grosor		Grosor		
	µm	%	µm	%	%
Xilema secundario	100-220	26,06	270-370	24,45	-1,61
Floema	26-40	5,37	80-110	7,26	1,88
Esclerénquima	17-30	3,91	25-40	2,52	-1,39
Epidermis + CórTEX	88-106	15,80	156-320	18,18	2,38
Radio de tallo	583-644	-	1232-1386	-	-

*Diferencia entre valores de grosor de tejidos de estacas con bandeado sin aplicación de AIB y sin estadía en cama de enraizamiento, y valores de estructuras de estacas con aplicación de 6000 ppm de AIB, al cabo de 2 meses de haber sido puestas a enraizar.

Cuadro 4.4 B Comparación del grosor de tejidos entre tallo tomado el 25 de marzo 2019 que no recibió bandeado ni aplicación de AIB, ni cama de enraizamiento, respecto a un tallo tomado el día 28 de mayo de 2019 con aplicación externa de AIB, bandeado y dos meses en cama de enraizamiento en condición 01-V.

Tejidos	Tallo sin bandeado		Tallo en condición 01-V		Diferencia*
	Grosor		Grosor		
	µm	%	µm	%	%
Xilema secundario	85-210	16,26	270-370	24,45	8,18
Floema	18-35	2,97	80-110	7,26	4,29
Esclerénquima	23-44	3,74	25-40	2,60	-1,14
Epidermis + CórTEX	85-145	12,64	156-320	8,79	-3,85
Radio de tallo	893-927	-	1232-1386	-	-

*Diferencia entre valores de grosor de tejidos de estacas sin bandeado, sin aplicación de AIB y sin estadía en cama de enraizamiento, y valores de estructuras de estacas con aplicación de 6000 ppm de AIB, al cabo de 2 meses de haber sido puestas a enraizar.

En la condición definida como 02-H, es posible observar un menor crecimiento del porcentaje del grosor de xilema secundario con 10 puntos porcentuales respecto al tallo que no fue sometido a aplicaciones exógenas de AIB (Cuadro 4.5 A). Esto podría ser considerado como favorable en cuanto al desarrollo de raíces adventicias, ya que, como lo experimentaron Maynard y Bassuk (1996) en *Carpinus betulus*, un menor desarrollo de xilema secundario y floema favoreció el porcentaje de enraizamiento de estacas leñosas en esa especie. Por otra parte, se observa el desarrollo de nuevo tejido vascular tanto de floema como xilema secundario pero de células más alargadas y paredes menos engrosadas (Fig. 4.5 B).

Cuadro 4.5 A Comparación del grosor de tejidos entre tallo tomado el 25 de marzo 2019 y que recibió bandeado sin aplicación de AIB ni cama de enraizamiento, respecto a un tallo tomado el día 28 de mayo de 2019 con aplicación externa de AIB, bandeado y dos meses en cama de enraizamiento en condición 02-H.

Tejido	Tallo con bandeado		Tallo en condición 02-H		diferencia
	Grosor		Grosor		
	rango μm	%	rango μm	%	% *
Xilema secundario	100-220	26,06	171-284	16,1	-10,0
Floema	26-40	5,37	46-72	4,2	-1,2
Nuevo tejido vascular	-	-	250-340	20,8	-
Esclerénquima	17-30	3,91	35-58	3,3	-0,6
Epidermis + CórTEX	88-106	15,80	117-173	10	-5,6
Radio de tallo	583-644	-	1393-1447	-	-

*Diferencia entre valores de grosor de tejidos de estacas con bandeado sin aplicación de AIB y sin estadía en cama de enraizamiento, y valores de estructuras de estacas con aplicación de 8000 ppm de AIB, al cabo de 2 meses de haber sido puestas a enraizar.

Cuadro 4.5 B Comparación del grosor de tejidos entre tallo tomado el 25 de marzo 2019 que no recibió bandeado ni aplicación de AIB, ni cama de enraizamiento, respecto a un tallo tomado el día 28 de mayo de 2019 con aplicación externa de AIB, bandeado y dos meses en cama de enraizamiento en condición 02-H.

Tejidos	Tallo sin bandeado		Tallo en condición 02-H		Diferencia*
	Grosor		Grosor		
	μm	%	μm	%	%
Xilema secundario	85-210	16,26	171-284	16,1	-0,21
Floema	18-35	2,97	46-72	4,2	1,19
Esclerénquima	23-44	3,74	35-58	3,3	-0,43
Epidermis + CórTEX	85-145	12,64	117-173	10	-2,43
Radio de tallo	893-927	-	1393-1447	-	-

*Diferencia entre valores de grosor de tejidos de estacas sin bandeado sin aplicación de AIB y sin estadía en cama de enraizamiento, y valores de estructuras de estacas con aplicación de 8000 ppm de AIB, al cabo de 2 meses de haber sido puestas a enraizar.

En la condición 03-N que fue definida como tallo con base de coloración negra, se pueden observar células amorfas en el perímetro, lo cual puede ser un efecto en técnica. Histológicamente este tallo tuvo una disminución en cuanto al desarrollo de sus estructuras respecto al tallo que no se le aplicó AIB ni estuvo en cama de enraizamiento, por lo que podría ser indicador de que el bandeado sí hizo efecto, ya que al igual que Maynard y Bassuk (1996) observaron un desarrollo limitado de haces conductores del tallo. El efecto del blanching causó una disminución porcentual de 4,45 en xilema secundario, y de 1,51 en floema (Cuadro 4.6 A). Por su parte el grosor de la epidermis + córtex aumentó por el tiempo que se le otorgó temperatura y riego intermitente en cama de enraizamiento, permitiendo así su desarrollo.

Cuadro 4.6 A Comparación del área de desarrollo de tejidos entre tallo tomado el 25 de marzo 2019 y que recibió bandeado sin aplicación de AIB ni cama de enraizamiento, respecto a un tallo tomado el día 28 de mayo de 2019 con aplicación externa de AIB, bandeado y dos meses en cama de enraizamiento en estado 03-N.

Tejidos	Tallo con bandeado		Tallo en condición 03-N		Diferencia*
	Grosor		Grosor		
	µm	%	µm	%	
Xilema secundario	100-220	26,06	195-330	21,61	-4,45
Floema	26-40	5,37	35-59	3,86	-1,51
Esclerénquima	17-30	3,91	26-60	3,53	-0,38
Epidermis + Córtex	88-106	15,80	154-270	17,42	1,62
Radio de tallo	583-644	-	1194-1239	-	-

*Diferencia entre valores de grosor de tejidos de estacas con bandeado sin aplicación de AIB y sin estadía en cama de enraizamiento, y valores de estructuras de estacas con aplicación de 3000 ppm de AIB, al cabo de 2 meses de haber sido puestas a enraizar.

Cuadro 4.6 B Comparación entre desarrollo de tejidos entre tallo tomado el 25 de marzo 2019 que no recibió bandeado ni aplicación de AIB, ni cama de enraizamiento, respecto a un tallo tomado el día 28 de mayo de 2019 con aplicación externa de AIB, bandeado y dos meses en cama de enraizamiento en estado 03-N.

Tejidos	Tallo sin bandeado		Tallo en condición 03-N		Diferencia*
	Grosor		Grosor		
	µm	%	µm	%	
Xilema secundario	85-210	16,26	195-330	21,61	5,35
Floema	18-35	2,97	35-59	3,86	0,89
Esclerénquima	23-44	3,74	26-60	3,53	-0,20
Epidermis + Córtex	85-145	12,64	154-270	17,42	4,78
Radio de tallo	893-927	-	1194-1239	-	-

*Diferencia entre valores de grosor de tejidos de estacas sin bandeado sin aplicación de AIB y sin estadía en cama de enraizamiento, y valores de estructuras de estacas con aplicación de 3000 ppm de AIB, al cabo de 2 meses de haber sido puestas a enraizar.

Es posible realizar una estimación de que las estacas que presentaron la condición 02-H, podrían ser potencialmente estacas que tendrán éxito, ya que presentan una disminución de xilema secundario y floema, tal y como le ocurrió a Maynard y Bassuk (1996) cuando analizaron los componentes estructurales de tallo de *Carpinus betulus* que tienen relación directa con el desarrollo de raíces adventicias, en donde establecieron que a menor desarrollo de xilema secundario y floema, aumentan los niveles y grado de enraizamiento. Los tallos excluidos de la luz debieron provocar una menor producción de lignina y en su lugar, los metabolitos secundarios ser aprovechados para la iniciación de desarrollo radical (Maynard y Bassuk, 1991).

Es recomendable que para repetir este estudio y obtener posibles resultados positivos, sería necesario contar con plantas madre que no se encuentren bajo estrés hídrico, y tal vez que cuenten con niveles de radiación adecuados. Sin embargo, también se recomienda realizar otro cambio: probar con 2, 3 y 4 meses de bandeado de las estacas.

Luego de haberse cumplido 4 meses desde que fueron instaladas las estacas en la cama de enraizamiento, con fecha 25 de julio de 2019 (datos no presentados) se logró observar que un alto porcentaje de las estacas presentaba engrosamiento en su parte basal y en algunos casos contaba con la presencia de callo. Del total de las estacas observadas (157) fue posible encontrar una con el desarrollo de raicilla emergente, la cual pertenecía al árbol 2 y tratamiento de 6000 ppm de AIB; teniendo en cuenta esto, es posible que el enraizamiento de estacas de boldo tratadas con la aplicación de la técnica blanching y tras la posterior aplicación de AIB, requiera mayor tiempo en cama de enraizamiento, por lo que se puede concluir que el tiempo de estudio de este trabajo no fue suficiente, ya que se realizaron mediciones a los dos meses en este sistema de cama de enraizamiento.

V. CONCLUSIONES

En estacas de boldo, bajo las condiciones del experimento la efectividad de la técnica conocida como “Blanching” aplicada por 5 meses, posterior a ello, 2 meses en cama de enraizamiento no presentó enraizamiento.

Dado que los resultados fueron nulos en cuanto al porcentaje de estacas enraizadas, no fue posible evaluar el efecto de las distintas concentraciones de AIB.

Histológicamente no se observó ni iniciación ni desarrollo de raíces adventicias, sin embargo, de los análisis realizados a ese nivel fue posible determinar que los tejidos etiolados, bajo las bandas de velcro, tuvieron un menor grosor y paredes más delgadas identificadas por la coloración de la tinción en estructuras como xilema secundario, floema, esclerénquima y epidermis + córtex en comparación a los tejidos que no se les aplicó bandeado.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Botti, C. y Cabello, A. 1990. Anatomía y desarrollo de flores, frutos y semillas de boldo (*Peumus boldus* Mol.). Ciencia e Investigación Forestal 4 (1): 49-60.
2. Bassuk, N. and Maynard, B. 1987. Stock Plant Etiolation. HortScience 22. 749-750.
3. CONAF- CONAMA – BIRF. 1997. Informe Nacional del Proyecto Catastro y Evaluación de los Recursos Vegetacionales Nativos de Chile. 87 p.
4. Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., and Ausubel, F. 1989. *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. Cell 58: 991-999.
5. Del Valle, J. M., Rogalinski, T., Zetzl, C. and Brunner, G. 2005. Extraction of boldo (*Peumus boldus* Mol.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water. Food Research International 38: 203-213.
6. Deng, X. W., Caspar, T., and Quail, P. H. 1991. A regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. Genes & Development 5 (1): 172-182.
7. Doll, U., Aedo, D. y López Carrera, P. 2005. Caracterización morfológica de tres procedencias de boldo (*Peumus boldus*) en una plantación joven de 6 años. Bosque (Valdivia) 26 (3): 45-54
8. Donoso, C. 1981. Tipos Forestales de los Bosques Nativos de Chile Documento de Trabajo N° 38. Santiago. FAO/PNt.:D/CONAF (Fo: DP/CHI/76003) 82 p.
9. Durán, L. 2005. /Evaluación de la producción y productividad en biomasa aérea de boldo (*Peumus boldus* Mol.) en un bosque esclerófilo de la comuna de María Pinto, Provincia de Melipilla, Región Metropolitana. Tesis. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 65 p.
10. Figueroa, J.; Armesto, J. y Hernández, J., 1996. Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile. Revista Chilena de Historia Natural 69: 243-251.
11. Hartmann, H. and Kester, D., 1997. Plant propagation. Principles and practices. N. J: Prentice Hall Career, Englewood Cliffs. 647 p.
12. Labbé, S., 1989. Estudio fitosociológico estadístico de los bosques de Boldo de la cuenca del río Bueno (Chile). Tesis Ing. Forestal. Univ. Austral de Chile. Fac. de Cs. Forestales. Valdivia, Chile. 94 p.
13. Hoffmann, A., 1981. Seasonal growth rhythms in *Peumus boldus*, a dioecious tree of the Chilean Mediterranean vegetation. Acta Oecológica/Oecológica Plantarum 2 (16): 31-39.

14. Hoffmann, A. and Alliende, M. 1984. Interactions in the patterns of vegetative growth and reproduction in woody dioecious plants. *Oecologia* 61: 109-114.
15. Labbé, S., 1989. Estudio fitosociológico estadístico de los bosques de Boldo de la cuenca del río Bueno (Chile). Tesis Ingeniería Forestal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Valdivia, Chile. 94 p.
16. Maynard, B., Bassuk, N. 1991. Stock plant etiolation and stem banding effect on the auxin dose-response of rooting in stem cuttings of *Carpinus betulus* L. 'Fastigiata'. *Plant Growth Regulation* 10: 305-311.
17. Maynard, B. and Bassuk, N. 1996. Effects of Stock Plant Etiolation, Shading, Banding, and Shoot Development on Histology and Cutting Propagation of *Carpinus betulus* L. fastigiata. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 853-860.
18. Montenegro, G. 2000. Chile: nuestra flora útil. Guía para uso apícola, medicinal, folclórica, artesanal y ornamental. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 267 p.
19. Montes, M. y Wilkomirsky, T. 1987. Medicina tradicional chilena. Editorial Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
20. Navas, L. 1976. Flora de la cuenca de Santiago. Tomo I. Editorial Andrés Bello. Santiago. Chile. 301 p.
21. Rodríguez, C. y Vergara, D. 2004. El boldo: un recurso forestal no maderero en las plantaciones de *Pinus radiata* de la precordillera andina de la región del Maule. En: Aguilera, M. y García, E. (Eds). Investigación y desarrollo forestal en la pequeña propiedad, Volumen 2. INFOR-Fundación Chile.
22. Rodríguez, M., 1997. Efecto del ácido giberélico (GA₃) y tiempo de remojo sobre la germinación de semillas de Boldo (*Peumus boldus* Mol.). Tesis de Grado. Escuela de Ingeniería Forestal. Universidad de Talca (Chile). 87 p.
23. Rügger, A. 1959. Neue Alkaloide aus *Peumus boldus* Mol. *Helvetica Chimica Acta* 42: 754-762.
24. Santelices R. y Bobadilla, C. 1997. Arraigamiento de estacas de *Quillaja saponaria* Mol. y *Peumus boldus* Mol. *Bosque*. 18: 77-85.
25. San Martín, J. y Doll, U., 1998. *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae, Magnoliopsida) una especie silvestre promisorio de Chile. *Studia Botanica*. 17: 109-118
26. Vogel, H., Razmilic, I., San Martín, J., Doll, U. y González, B. 2005. Boldo. En: Plantas medicinales chilenas. Experiencias de domesticación y cultivo de boldo, matico, bailahuén, canelo, peumo y maqui. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. pp: 23-54.

27. Schneeberger, R., Vogel, H., & Schiappacasse, F. 2001. Efecto de poda invernal e intensidad de luz sobre el crecimiento y concentración de principios activos en boldo (*Peumus boldus Mol*) bajo cultivo. Tesis de grado. Escuela de Agronomía. Universidad de Talca (Chile). 54 p.
28. Wright, J. 1964. Mejoramiento genético de los árboles forestales. Estudios de Silvicultura y Productos Forestales N° 16. FAO, 436 p.