

DOS SUSTITUTOS INUSUALES DE LA YERBA MATE (*Ilex pseudobuxus* E *I. taubertiana*): MORFOLOGÍA, FLAVONOIDES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

[Two unusual maté substitutes (*Ilex pseudobuxus* and *I. taubertiana*): morphology, flavonoids and geographical distribution]

RAFAEL A. RICCO^{1*}, GUSTAVO C. GIBERTI^{2,3*}, MARCELO L. WAGNER¹ & ALBERTO A. GURNI¹

¹Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956 4^{to} Piso, (1113). Buenos Aires, República Argentina.

²Museo de Farmacobotánica “Juan A. Dominguez”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956 1er Piso, (1113). Buenos Aires, República Argentina

³IQUIMEFA (CONICET).

*E-mails: raricco@ffyb.uba.ar, giberti@uolsinetis.com.ar

RESUMEN: *Ilex pseudobuxus* e *I. taubertiana* fueron considerados sustituyentes menores del árbol de la yerba mate genuina (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae), una especie cuyas áreas de distribución natural y producción son semejantes aunque no son idénticas a la corología de los taxa precedentes. Dichas especies eran consideradas presuntamente muy emparentadas sistemáticamente (ambas pertenecen a la subsección *laxae* Loes.), ya que comparten algunos caracteres morfológicos. Aquí se presenta un estudio morfológico y fitoquímico (flavonoides) de este grupo, sustentados por nuestras propias colecciones a campo de estas especies y por observaciones realizadas *in situ*, todo acompañado por una revisión de la literatura disponible sobre la exomorfología, anatomía vegetal, citología, fitoquímica y metabolómica del grupo. Adicionalmente, como sus áreas de distribución geográfica no coinciden exactamente con aquella perteneciente a la yerba mate genuina, expresamos que ambas especies no pertenecen al grupo de los principales adulterantes de la yerba mate.

Palabras clave: yerba mate, sustitutos cogenéricos, flavonoides, morfología.

SUMMARY: *Ilex pseudobuxus* and *I. taubertiana* were considered as minor substitutes of the true maté's tree (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae), a species whose wild distribution and production areas are allied but not identical to the chorology of the former taxa. The two species were considered as presumably close on Systematics grounds (both belong to subsection *laxae* Loes.) as they share few exomorphological traits. A morphological and flavonoid study approach, based on our own wild field collections and *in situ* observations is attempted here, accompanied by a review of the existing literature on exomorphology, plant anatomy, cytology, phytochemistry and metabolomics of the group. We conclude that both species are not so closely related as it was presumed, and that they are also quite different from *Ilex paraguariensis*. Additionally, as their geographical distribution areas differ to that of the genuine maté, we believe that they are not in *Ilex paraguariensis* mayor cogenetic substitutes group.

Key words: maté, cogenetic substitutes, morphology, flavonoids.

*Manuscrito recibido: 27 de setiembre de 2013.
Manuscrito aceptado: 30 de octubre de 2013.*

INTRODUCCIÓN

El árbol de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae), utilizado como materia prima para la elaboración de una infusión muy difundida en Argentina, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil es nativo de estos países. Adicionalmente, estas naciones constituyen la única región del mundo donde el cultivo y explotación de esta cosecha exhibe el mayor potencial (Navajas Artaza, 1995; Tormen, 1995).

Entre las aproximadamente 200 especies nativas sudamericanas del género *Ilex* que existen, unas cuantas han sido frecuentemente consideradas ya sea adulterantes o sustitutos de la especie arbórea productora de la yerba mate genuina, (*Ilex paraguariensis*), entre ellas *I. pseudobuxus* Reissek e *I. taubertiana* Loes. En términos estrictamente sistemáticos, tal situación todavía es algo confusa, quizás debido al hecho que *Ilex* L. es un taxón dioico, leñoso, tropi a subtropical con alrededor de 400 (Giberti, 1994) 600 especies de ambos hemisferios (Loizeau *et al.*, 2005). Este género todavía aguarda un tratamiento sistemático infragenérico moderno: su enfoque taxonómico más completo a nivel mundial data de principios del siglo XX (Loesener, 1901, 1908). Dicho sistema de Loesener se concibió con criterios inclusive bastante más antiguos, fundándose principalmente en caracteres morfológicos (su tratamiento sistemático infragenérico original se resumió en 1942, pero con pocas actualizaciones a la luz de los avances en Biología de la cuarta década del siglo XX Loesener, 1942). Desde esa época, el sistema loeseneriano para las Aquifoliaceae fue ampliamente criticado (Baas, 1975; Giberti, 1979; Nicolson *et al.*, 1991; Loizeau & Spichiger, 1992; Cuénoud *et al.* 2000; Manen *et al.*, 2002; Gottlieb *et al.*, 2005), en paralelo con la aparición de diferentes clases de caracteres con importancia sistemática y con la descripción de especies nuevas de *Ilex*. Dicha evidencia novel con frecuencia se halla en abierta contradicción con los criterios premendelianos de Loesener sobre la taxonomía de las Aquifoliaceae.

Sin embargo, algunos grupos de especies de *Ilex* considerados como tales en el complicado sistema infragenérico de Loesener no son completamente inútiles desde una perspectiva sistemática

contemporánea: a veces esta situación es particularmente notable cuando algunos taxones morfológicamente similares y presumiblemente muy emparentados son considerados. Por ejemplo, la sección *megalae* Loes., que pertenece al subgénero *euilex* Loes. propuesto por el mismo autor, incluye especies muy relacionadas como *Ilex theezans*, *I. brasiliensis* e *I. integerrima*, cuyos caracteres morfológicos, fitoquímicos y moleculares respaldan un parentesco muy estrecho (Gottlieb *et al.*, 2005; Giberti, 1998; Selbach-Schnadelbach *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). Una situación de esta índole se presumía originariamente para *Ilex pseudobuxus* (nombre vernáculo “caúna da praia”) e *I. taubertiana* (“caúna nebular”), las dos especies tratadas en el presente estudio, las cuales, de acuerdo con Loesener (1901), pertenecen a la subsección *laxae* Loes. incluida en la sección *excelsae* Loes.; la que a su vez figura dentro de la serie *lioprinus* Loes. del subgénero *euilex* Loes.* Ambas especies son nativas del sur de Brasil, y su

**Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Asimismo está incluida, de acuerdo con Loesener, dentro del subgénero *euilex* Loes., pero, a diferencia de *I. pseudobuxus* e *I. taubertiana*, la yerba mate genuina pertenece a la serie *aquifolium* (Tournefort) Maxim. emend. Loes., sección *microdontae* Loes., subsección *repandae* Loes.

distribución geográfica natural apenas puede asimilarse con la nativa de la yerba mate genuina y/o con su área de aprovechamiento (Fig. 1). Como se mencionara previamente, ambas especies han sido señaladas como sustitutos menores de la yerba mate genuina (Giberti, 1989; Taketa & Schenkel, 1994; Brieger, 1995; Schenkel *et al.*, 1997).

En la presente contribución, sus respectivos patrones cromatográficos son comparados con datos morfológicos y ecológicos obtenidos *in situ*; adicionalmente, nuestros resultados se compararon con registros bibliográficos, ya fueran de naturaleza organográfica (Brieger, 1995; Coelho, 1995; Coelho & Mariath, 1996; Giberti & Gurni, 2008; González & Tarragó, 2009), citológica (Greizerstein *et al.*, 2004), molecular (Cuénoud *et al.*, 2000; Manen *et al.*, 2002; Gottlieb *et al.*, 2005), ambiental (Leal & Lorscheitter, 2007), o en ámbitos fitoquímicos – metabolómicos (Kim *et al.*, 2010; Taketa & Schenkel, 1994; Schenkel *et al.*, 1997).



Fig. 1.- Distribución geográfica de *Ilex paraguariensis* y localización de los especímenes analizados para *I. pseudobuxus* e *I. taubertiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nuestros estudios fitoquímicos se llevaron a cabo ya sea sobre muestras obtenidas directamente a campo, coleccionadas sobre materiales silvestres (ejemplares señalados con un asterisco -*), o a partir de fragmentos separados de aquellos ejemplares de herbario cuya abundancia lo permitió (marcados**). De tal forma, para el presente trabajo no fueron examinadas muestras obtenidas de especímenes vivos cultivados *ex situ*, por lo cual entendemos que nuestros resultados reflejan mejor directamente distintas condiciones ambientales diferentes en la naturaleza.

Exsiccata

Ilex pseudobuxus Reissek

BRASIL. Paraná, Pontal do Sul, cercano Centro Distribuidor Petrobras, zona baja a orillas de arroyuelo (litoral), *leg.* S. D. Prat Kricun, L. D. Belingheri, J. M. da Silva y A. Dieguez Brisolla 113* (BAF). **Rio Grande do Sul,** Campo Bon, zona Cuatro Colonias, orillas de arroyuelo, *leg.* S. D. Prat Kricun, L. D. Belingheri & G. Ceni Coelho 223* (BAF); Campo Bon, alrededores del pueblo, Cuatro Colonias, en un bajo en un campo dematado, aproximadamente 29° 37' S, 51° 00' W, *leg.* G. C. Giberti, S. D. Prat Kricun & G. Ceni Coelho 376 (BAF), 377 (BAF); Torres, a 8 km al sur de la ciudad por la rodovía costera, zona baja localizada a 300 m del mar, *leg.* S. D. Prat Kricun, L. D. Belingheri & G. Ceni Coelho 238* (BAF); Torres a aproximadamente 4 km al N, en camino hacia los médanos desde la ruta costera, en bosquecillo de restinga, aproximadamente 29° 20' S, 49° 43' W, *leg.* G. C. Giberti, S. D. Prat Kricun & G. Ceni Coelho 368 (BAF), 369 (BAF); Tramandaí, a orillas Lagoa Emboava, en zona inundable, *leg.* S. D. Prat Kricun, L. D. Belingheri & G. Ceni Coelho 239 (BAF). Tramandaí, margem da Lagoa Emboaba, mato paludoso, solo preto, *leg.* G. Ceni Coelho 40** (BAF); Estrada do Mar, aproximadamente a 9 km de Tramandaí, en monte bajo rodeando a la lagoa Emboaba, suelo anegadizo, aproximadamente 29° 59' S, 50° 07' W, *leg.* G. C. Giberti, S. D. Prat Kricun & G. Ceni Coelho 372 (BAF), 373 (BAF), 374* (BAF). **Santa Catarina,** pastagem pantanosa na beira da lagoa atrás do Morro dos Conventos zona c/arbusto, *leg.* J. C. Lindeman s. No., ICN 9141** (BAF); Municipio São Francisco do Sul, Ilha de São Francisco, a 500 m del camino entre Enseada y São Francisco do Sul, en bañado litoral con *Ficus* y helechos, *leg.* G. C. Giberti & S. D. Prat Kricun 484 (BAF); Praia Itajubá, en camino de tierra transversal, campo anegadizo, *leg.* G. C. Giberti & S. D. Prat Kricun 492 (BAF).

Ilex taubertiana Loes.

BRASIL. Paraná, Municipio Quatro Barras, Parque Marumbi, en ladera del Morro Sete, a la vera de Estrada da Graciosa, *leg.* G. C. Giberti, J. M. da Silva, S. D. Prat Kricun & J. F. Picheth 267* (BAF); *ibid.*, *leg.* S. D. Prat Kricun, L. D. Belingheri, J. M. da Silva & A. Dieguez Brisolla 109 (BAF). **Rio Grande do Sul,** Municipio São Francisco de Paula, camino a Taquara, a 7 km del pueblo, *leg.* G. C. Giberti, S. D. Prat Kricun & G. Ceni Coelho 361 (BAF); *ibid.*, a 2 km de la ciudad, *leg.* S. D. Prat Kricun, L. D. Belingheri & G. Ceni Coelho 232 (BAF); Municipio Cambará, Faxinal do

Itaimbezinho, 10 km sede do Parque Aparados da Serra, leg. G. C. Giberti, S. D. Prat Kricun & G. Ceni Coelho 365* (BAF); Parque Nacional Aparados da Serra, leg. S. D. Prat Kricun, L. D. Belingheri & G. C. Coelho 234 (BAF).

MÉTODOS

-Estudios de flavonoles

Se extrajeron 5 gramos de hojas secas molidas con metanol 80% en un extractor Soxhlet. El extracto se secó en evaporador rotatorio a presión reducida a 40 °C y los residuos se almacenaron a -20 °C en oscuridad.

Los residuos fueron redissueltos en 10 ml de metanol. El aislamiento y la purificación se llevaron a cabo por cromatografía en papel (PC), cromatografía en capa delgada (TLC) y cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC); los solventes fueron BAA (butanol – ácido acético - agua, 6:1:2), TBA (ter-butanol – ácido acético - agua, 3:1:1), 15% AcOH y agua.

Las estructuras de los compuestos se dilucidaron por métodos espectroscópicos y comparación de estos datos con sustancias de referencia y registros bibliográficos.

-Estudios de proantocianidinas

Con los propósitos de aislamiento y purificación, se utilizaron 2 ml de cada extracto metanólico. Ellos se trataron con 5 ml de HCl 2N a 100 °C durante una hora, con este método, las proantocianidinas incoloras son transformadas en antocianidinas totalmente coloreadas, las que subsecuentemente fueron extraídas por partición con alcohol amílico.

Se efectuaron cromatografías en TLC celulósica y HPTLC sobre las fracciones amílicas, utilizando los sistemas de solventes Forestal (ácido acético-ácido clorhídrico-agua 30:3:10) y Fórmico (ácido fórmico-ácido clorhídrico-agua 9:2:3)

Los pigmentos aislados de esta forma se eluyeron con una solución metanólica-clorhídrica al 0,1% (V/V).

La identificación de los compuestos se llevó a cabo a través de mediciones de sus valores de R_f y por métodos espectroscópicos con sustancias de referencia.

Anatomía vegetal

Se fijaron botones florales en FAA, se los lavó en agua y se los deshidrató a través de una serie de alcoholes de graduación creciente. Luego los mismos fueron pasados a través de un gradiente alcohol absoluto – xilol, para ser finalmente embebidos en parafina dentro de una estufa de cultivo (Locquin & Langeron, 1985). Después se obtuvieron transecciones y secciones longitudinales de 15 µm de espesor con la ayuda de un micrótopo. Esos cortes, luego de ser dispuesto sobre portaobjetos, se colorearon con safranina-Alcian blue y finalmente se los destinó a ser preparados permanentes usando bálsamo de Canadá como medio de montaje.

RESULTADOS

- Exomorfología

A pesar que este concepto fue a veces soslayado por el mismo Th. Loesener, su sistema de clasificación infragnérica para *Ilex* (Loesener, 1901, 1908, 1942), resalta la

importancia de la morfología de las inflorescencias. Estas ideas fueron originariamente expuestas en los primeros trabajos de este autor (Loesener, 1891). Consecuentemente, y a partir de este trabajo (Loesener, 1891), la posición, cantidad, patrón de ramificaciones, tamaño y grado de pubescencia de los ejes que portan las flores, son considerados entre otros, como los caracteres más importantes para reconocer los grupos afines de especies del género *Ilex*. Dicha presunción es todavía parcialmente válida más de un siglo después, aún cuando nuevas interpretaciones morfológicas, ontogenéticas y filogenéticas de las inflorescencias del género ya han sido propuestas (Loizeau & Spichiger, 1992; Coelho, 1995; Coelho & Mariath, 1996). Sin embargo, todavía seguimos aquí un criterio morfológico para las inflorescencias (Giberti, 1994), derivado de aquellas propuestas de Loesener. Considerando la importancia sistemática del patrón de inflorescencias (*e.g.* dicasios solitarios en axilas de hojas ya fueran estas hojas normales o brácteas, la notable longitud de los ejes de esas inflorescencias, la textura frecuentemente coriácea de las hojas y la ausencia de puntos negros en la epidermis abaxial foliar, la subsección *laxae* Loes. parece ser un grupo relativamente homogéneo de especies dentro del género *Ilex*. Particularmente, la presencia de largos (mayores de 2 cm) y gráciles pedúnculos florales (**Fig. 2**), es compartida por *I. pseudobuxus* e *I. taubertiana*. Dicho carácter también separa nítidamente ambas especies de otras pertenecientes al mismo género, sin importar si las mismas están geográfica o sistemáticamente cercanas (a esta subsección *laxae* Loes. pertenecen otras 2 especies brasileras de *Ilex*, *I. sellowii* Loes. e *I. sapatifolia* Reissek, cuyos pedúnculos son más cortos que en las especies que tratamos). Las diferencias exomorfológicas entre ambos taxa aquí estudiados se resumen en la clave siguiente:

A Árboles bajos o arbustos con láminas foliares coriáceas, éstas con un color verde brillante adaxialmente y de un verde más apagado en el envés, obovado - espatuladas o raro de forma elíptica, con ápice redondeado terminando en un corto mucrón, margen foliar entero o escasamente aserrado cerca del ápice. Pecíolos cortos (3-9 mm). Pirenos con superficie dorsal generalmente lisa.....*Ilex pseudobuxus* Reissek

AA Árboles medianos, raro arbustos, con láminas foliares concolores, cartáceas, ovadas, ovado -elípticas o lanceoladas, ápices foliares conspicuamente acuminados, margen foliar completamente aserrado. Pecíolos gráciles, largos (10 - 20 mm). Pirenos siempre estriados en el dorso.....*Ilex taubertiana* Loes.

En consecuencia, la morfología externa de ambas especies es contrastante, imposibilitando confundirlas entre sí. Asimismo, ambas especies poseen groseras diferencias exomorfológicas con *Ilex paraguariensis*, cuyo complejo patrón de inflorescencias difiere mucho del de las especies aquí consideradas.

- Anatomía floral

Ilex pseudobuxus e *I. taubertiana* exhiben un diseño del anatomía floral compartido con muchas otras especies sudamericanas de *Ilex*. Además, ambas especies comparten una



Fig. 2.- Ramitas floríferas de *Ilex pseudobuxus* coleccionadas en Campo Bon, Rio Grande do Sul, Brasil. Notar los largos, gráciles pedúnculos de los dicasios solitarios axilares, carácter morfológico compartido con *I. taubertiana*, una condición bien diferente a lo que sucede con las inflorescencias fasciculadas de *Ilex paraguariensis*.

distribución de papilas epidérmicas en pétalos, pistilodios, estambres, estaminodios, etc. si bien difieren en la estivación de pétalos dentro del botón floral y en la distribución de cristales presentes en tejidos florales (Giberti & Gurni, 2008).

- Flavonoides

Los resultados del estudio fitoquímico de flavonoides se exhiben en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Flavonoides detectados en las dos especies estudiadas.

Especies	Compuesto					
	Kaemp.	Quer.	K-3-Glu.	Q-3-Glu.	Rutin	PA.
<i>I. pseudobuxus</i>	+	+	+	+	+	(+)
<i>I. taubertiana</i>	-	+	-	+	+	-

Referencias:

+: presente.

(+): detectado solamente en algunas muestras.

- : no detectado.

Kaemp.: Kaempferol.

Quer.: Quercetina.

K-3-Glu.: Kaempferol-3-O-Glucósido.

Q-3-Glu.: Quercetina-3-O- Glucósido.

Rutin: Quercetin-3-O-Rhamnosilglucósido.

PA.: Proantocianidinas (luego de la hidrólisis ácida de estos compuestos se obtuvo **cianidina**).

DISCUSIÓN

- Distribución geográfica y datos ambientales

De acuerdo con todos los datos disponibles, *Ilex pseudobuxus* Reissek es la especie de mayor distribución geográfica y la de mayor tolerancia para diferentes ambientes. Crece en todos los estados litorales brasileiros desde Bahia hasta Rio Grande do Sul: Bahia, Espirito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul. Es una especie bastante frecuente en las costas atlánticas del sur de Brasil (Reitz *et al.*, 1983), abundando en suelos arenosos –«vegetação da Restinga» (Edwin & Reitz, 1967), y asimismo crece en las selvas tropicales litorales. Es más escasa en los bordes orientales del planalto de Santa Catarina (el cual es una variante de la típica selva subtropical de *Araucaria* que abunda en el centro del mismo estado donde, como es bien conocido, *Ilex paraguariensis* es una sumamente abundante especie nativa). Es aún mucho más rara (*vide* Andrews) en los “campos rupestres” del estado de Bahia (Andrews, 1985). Uno de los autores del presente trabajo ha tenido la oportunidad de coleccionar *Ilex pseudobuxus* en un área inundable con suelos arenosos alrededor de lagunas litorales (dentro de comunidades vegetales donde abundan *Ficus organensis*, *Myrsine*, *Monster*, y *Tillandsia usneoides*), y asimismo en orillas bajas de arroyos de las colinas cubiertas por vegetación tropical atlántica en Rio Grande do Sul; pero no ha podido nunca hallar esta especie en las selvas transcisionales del oriente del planalto. El patrón de migración de *I. pseudobuxus* durante los cambios ambientales del Holoceno parece reflejar la condición general de la dispersión de la vegetación arbórea desde las bajas, arenosas y paludosas áreas orientales próximas al océano del Sur de Brasil hacia lugares más elevados occidentales (Leal & Lorscheitter, 2007).

La distribución geográfica de *Ilex taubertiana* es más reducida, pues no alcanza a vivir en las bajas latitudes adónde existe la entidad anterior (**Fig. 1**): hasta el presente, solamente se la conoce creciendo silvestre en Rio de Janeiro, Parana, Santa Catarina y Rio Grande do Sul (Loesener, 1901; Edwin & Reitz, 1967) -(aunque presumiblemente también crecería en el E de São Paulo-. Sus exigencias ambientales son más precisas que las de la especies precedentes, ya que *I. taubertiana* es solamente conocida de la region llamada “area de matilhas nebulares” (área de selva tropical montana de nubes del Sur brasileiro atlántico): más precisamente de la cima de los “morros” (= promontorios) de Serra do Mar y de Serra Geral. *Ilex taubertiana* también se encontró en la región transicional de altura entre el área de vegetación tropical atlántica y las selvas subtropicales de *Araucaria* de la región del planalto (hemos podido recolectarla en el área transicional de los Aparados da Serra Geral, Rio Grande do Sul). No existen registros de la existencia de *Ilex taubertiana* a altitudes menores tales como las áreas de ambientes arenosos cercanas al mar –i.e. donde *I. pseudobuxus* sí existe-.

- Exomorfología

Ambas especies se separan claramente entre sí por precisos caracteres morfológicos, y conjuntamente, son también fácilmente diferenciables de *Ilex paraguariensis*.

- Anatomía vegetal

a) Vegetativa: la bibliografía reporta datos para ambas especies (Brieger, 1995; Coelho, 1995; González & Tarragó, 2009). Los dos primeros trabajos registran un grado de similitud entre *Ilex taubertiana* Loes. e *I. microdonta* Reissek (esta última entidad parece ser más próxima a *I. paraguariensis* que los dos taxa que motivan el presente estudio - *I. microdonta* pertenece al subgénero *euilex*, serie *aquifolium* (Tournefort) Maxim. emend. Loes., sección *microdontae* Loes.-. *Ilex microdonta* comparte con *I. paraguariensis* el tipo de inflorescencia, que es bastante diferente de aquel de *I. taubertiana* e *I. pseudobuxus*. Para esta última entidad, Coelho (1995) reportó la existencia de una hipodermis foliar y la presencia de traqueidas con puntuaciones areoladas (ambos caracteres que no han sido registrados para *I. taubertiana*). De acuerdo con Brieger (1995) *I. taubertiana* posee idioblastos mucilaginosos. No se encontraron ni hipodermis ni células de mucilago en *I. paraguariensis* (Giberti, 1979).

b) Anatomía floral: para ambas especies se observó un patrón de anatomía floral relativamente estable. Se observaron unas pocas diferencias menores entre las muestras de las 2 especies estudiadas (Giberti & Gurni, 2008; Giberti, 2001). Datos recientes registraron la presencia de coléteres sésiles en las brácteas florales de *I. pseudobuxus*, los cuales no se encontraron en *I. taubertiana* (González & Tarragó, 2009).

- Citología

Una evidencia citológica relevante como para inferir relaciones taxonómicas dentro del género *Ilex* es escasa. Tan sólo unos pocos recuentos de números cromosómicos y de contenido de ADN han probado ser de interés para evaluar algunas relaciones interespecíficas –la evidencia existente para *Ilex argentina* Lillo e *I. paraguariensis* (Barral *et al.*, 1995). Por otro lado, para el caso de *I. pseudobuxus* e *I. taubertiana* se

publicaron no hace mucho los primeros recuentos cromosómicos para ambas especies - $2n = 40$ -. Dichos guarismos igualan el número cromosómico más difundido en todo el género (Greizerstein *et al.*, 2004).

- Fitoquímica y metabolómica

Por lo que se sabe, los resultados de estudios fitoquímicos revelan que en *Ilex taubertiana*, el patrón de flavonoles exhibe la presencia conjunta de quercetina (compuesto reportado por Ricco *et al.* 1991, 1995) y también por Martínez *et al.* (1997), quercetina-3-O-glicósido y de rutina. Ambas sustancias también se hallan en *Ilex pseudobuxus* –cuyos contenidos en rutina asimismo son los más elevados luego de los de *I. paraguariensis* (Filip *et al.*, 2001)-, donde el kaempferol y kaempferol-3-O-glicósido también se detectaron, resultando de esta forma un carácter diferencial entre ambas especies.

Los estudios de proantocianidinas merecen una consideración especial. Entre los materiales de *Ilex taubertiana* hasta ahora analizados, no se pudieron detectar proantocianidinas, tal como se reportara previamente (Ricco *et al.*, 1991, 1995). Pero al considerar *Ilex pseudobuxus* (la mejor muestreada de ambas especies, que crece desde

Paraná en el norte hasta Rio Grande do Sul en el sur (**Fig. 1**), algunas muestras estudiadas exhibieron la presencia de proantocianidinas. Estos compuestos fueron solamente registrados en los materiales provenientes de “Tramandaí” (leg. G. Coelho 40; Giberti *et al.*, 374), pero no se los encontró en aquellos extractos de muestras de Campo Bom, Morro dos Conventos, Pontal do Sul o de Torres.

De esta manera, parece ser que la presencia de proantocianidinas no es un carácter constante para esta especie, por lo que no puede constituirse en un marcador fitoquímico/quimiosistemático. Hipotéticamente, la razón de la existencia de una variación infraespecífica, podría deberse a la existencia de razas o variedades químicas para *Ilex pseudobuxus*. Obviamente, la confirmación de tal hipótesis implica el análisis de un número bastante mayor de muestras pertenecientes a esta especie.

El patrón de triterpenoides y saponinas, que ha sido intensamente investigado por Schenkel y colaboradores (Taketa & Schenkel, 1994, 1995; Schenkel *et al.*, 1997), no ha sido motivo de estudio experimental en el presente trabajo. No obstante, la bibliografía registra que las saponinas de *Ilex pseudobuxus*, estudiadas por Taketa & Schenkel exhiben interesantes diferencias con aquellas encontradas en *I. paraguariensis*, y también que *I. taubertiana* posee cantidades menores de un compuesto diferente (Taketa & Schenkel, 1994).

La bibliografía asimismo informa que el total de cafeoil derivados es más que cinco veces más alto en *Ilex pseudobuxus* que en *I. taubertiana* (Filip *et al.*, 2001).

Aunque la presencia de arbutina se reportó para ambas especies y especialmente en valores bastante elevados para *I. pseudobuxus* (Kim *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2005), no pudo ser hallada en nuestros estudios, tal vez debido a la condición altamente polar de la molécula de arbutina (Wilson *et al.*, 2012).

Adicionalmente, compuestos bien conocidos del grupo de las xantinas, responsables de las propiedades estimulantes de la “yerba mate” no son tratados en el presente trabajo, pero debe mencionarse que tanto cafeína como teofilina fueron citadas para *Ilex pseudobuxus* (Filip *et al.*, 1998).

Unos pocos datos sobre proteínas obtenidas de secreciones de coléteres sugieren una débil asociación fenética entre *I. pseudobuxus* e *I. taubertiana* (González & Tarragó, 2009). Aunque el agrupamiento “clustering” de varias especies sudamericanas de *Ilex* obtenido por el estudio de secreción de proteínas por González & Tarragó (2009) recuerda a aquel publicado por Gottlieb *et al.* (2005), el panorama completo de las relaciones entre las especies sudamericanas de *Ilex* permanece confuso.

En un trabajo reciente de clasificación de las especies de *Ilex* según el metaboloma (Kim *et al.*, 2010), *Ilex taubertiana* e *I. pseudobuxus* aparecen distantes fitoquímicamente.

- Sistemática molecular

Trabajos bastante recientes (Cuénoud *et al.*, 2000; Manen *et al.*, 2002; Gottlieb *et al.*, 2005; Selbach-Schnadelbach *et al.*, 2009), que consideran una amplia muestra de especies de *Ilex*, solamente han sugerido unos pocos hechos consistentes sobre la complicada Sistemática infragenérica de este género. Pero asimismo contribuyen a

delucidar su polémica posición taxonómica dentro de las Angiospermas, su origen y sus patrones de distribución geográfica actuales y pasados (Cuénoud *et al.*, 2000).

Aunque una gran cantidad de informaciones nuevas en estas temáticas afortunadamente ahora están disponibles, el progreso en conjunto sigue siendo lamentablemente lento. Considerando referencias bibliográficas, las dos especies tratadas en esta contribución no parecen haber generado un particular interés desde el punto de vista de la sistemática molecular; y, como fue sugerido por Gottlieb *et al.* (2005), no conforman un clado y sus analogías morfológicas deberían referirse a evolución convergente dentro de este género.

CONCLUSIONES

A pesar de algunas analogías exomorfológicas entre ambas especies, nuestros datos, lo mismo que la mayoría de las informaciones fitoquímicas y anatómicas existentes, sugieren que *Ilex pseudobuxus* e *I. taubertiana* no están tan estrechamente relacionadas y no deberían compartir el mismo rango sistemático infragenérico en manera alguna –Loesener había propuesto incluirlas en la sección *laxae*-. Adicionalmente, como ninguna de las dos exhibe similitudes muy cercanas a *Ilex paraguariensis*, sus posibles roles como sustitutos menores de esta última especie como materias primas para la industria de la yerba mate debería descartarse hoy en día. Por otro lado, ambas especies son casi completamente alopátricas con *Ilex paraguariensis* en condiciones naturales en Brasil, ni tampoco crecen en las áreas actuales importantes de producción de yerba mate en Sur América.

Observamos interesantes cambios en la composición fenólica para varias muestras de *I. pseudobuxus* coleccionadas en diferentes ambientes geográficos.

AGRADECIMIENTOS

Estamos profundamente agradecidos a varios colegas tanto de Argentina Estación Experimental Cerro Azul, INTA como de Brasil (IAPAR, Jardim Botânico de Curitiba, Universidade Federal de Rio Grande do Sul), quienes nos ayudaron mucho durante varias excursiones de campo para tomar las muestras. Agradecemos asimismo financiamiento del CONICET y de la UBA.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, S. 1985. A checklist of the *Aquifoliaceae* of Bahia. Rodriguésia 37 (63): 34–44.
- Baas, P. 1975. Vegetative anatomy and the affinities of *Aquifoliaceae*, *Sphenostemon*, *Phelline* and *Oncotheca*. Blumea 22 (3) 311–407.
- Barral, G., L. Poggio, L. & Giberti, G. C. 1995. Chromosome numbers and DNA content from *Ilex argentina* (*Aquifoliaceae*). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 30: 243–248.

- Brieger, D. 1995. Charakterisierung der Blätter von *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire und möglichen Verfälschungen mit Hilfe botanischer und phytochemischer Methoden». Dissertationes Botanicae 240. J. Cramer, Berlin – Stuttgart: 268 pp
- Choi, Y. H., S. Sertic, S., Kim, H. K., Wilson, E. G., Michopoulos, F., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Prat Kricun, S. D. & Verpoorte, R. 2005. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (4): 1237–1245.
- Coelho, G. C. 1995. Anatomia foliar e Morfologia de Inflorescências das espécies rio-grandenses de *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*). Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS, Porto Alegre.
- Coelho, G. C. & Mariath, J. E. de A. 1996. Inflorescences morphology of *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) species from Rio Grande do Sul, Brazil. Feddes Repertorium specierum novarum regni vegetabilis 107 (1-2): 19-30, fig. 14.
- Cuénoud, P., Martínez, M. A. D. P., Loizeau, P.-A., Spichiger, R., Andrews, S. & Manen, J.- F. 2000. Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*). Annals of Botany. London 85: 111-122.
- Edwin, G. & Reitz, R. 1967. Aquifoliáceas. En: Reitz, R. (ed.) Flora Ilustrada Catarinense. I, Fascículo AQUÍ, Itajaí, Santa Catarina, pp. 3-47.
- Filip, R., López, P., Coussio, J. D. & Ferraro, G. 1998. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. Phytotherapy Research 12: 129–131.
- Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J. & Ferraro, G. 2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. Fitoterapia 72: 774-778.
- Giberti, G. C. 1979. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*). Darwiniana 22: 217-240.
- Giberti, G. C. 1989. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteración. Dominguezia 7 (1): 3-21.
- Giberti, G. C. 1994. *Aquifoliaceae*. En: Flora Fanerogámica de Argentina. Fascículo 1 (157). Programa PROFLOTA (CONICET), Museo Botánico, IMBIV, Córdoba, Argentina: 8pp.
- Giberti, G. C. 1998. Hallazgo de *Ilex brasiliensis* (*Aquifoliaceae*) en la Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 33: 137-140.
- Giberti, G. C. 2001. Diferentes aspectos del género *Ilex* (*Aquifoliaceae*). Corología, arquitectura floral, posición sistemática. Disertación. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
- Giberti, G. C. & Gurni, A. A. 2008. Anatomía floral comparada de 11 especies sudamericanas de *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) relacionadas con la yerba mate. Dominguezia 24 (2): 77-94.
- González, A. M. & Tarragó, J. R. 2009. Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species from southern South America. Botanical Journal of the Linnean Society 160 (2): 197-210.
- Gottlieb, A. M., Giberti, G. C. & Poggio, L. 2005. Molecular analyses of the genus *Ilex* (*Aquifoliaceae*) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. American Journal of Botany 92: 352-369.

- Greizerstein, E., Giberti, G. C. & Poggio, L. 2004. Cytogenetic studies on Southern South–American *Ilex*. Caryologia 57 (1): 19-23.
- Kim, H. K., Khan, S., Wilson, E. G., Prat Kricun, S. D., Meissner, A. Goral, S. Deelder, A. M., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. 2010. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR – based metabolomics. Phytochemistry 71: 773–784.
- Leal, M. G. & Lorscheitter, M. L. 2007. Plant succession in a forest on the lower northeast slope of Serra Geral, Rio Grande do Sul, southern Brazil. Acta Botanica Brasilica 21 (1): 1–14.
- Locquin, M. & Langeron, M. 1985. Manual de Microscopía. Editorial Labor S. A., Barcelona: X + 372 pp.
- Loesener, T. 1891. Vorstudien zu einer Monographien der Aquifoliaceen. Verhandlungen des Botanisches Vereins für die Provinz Brandenburg 33: 1-45.
- Loesener, T. 1901. Monographia Aquifoliacearum. I. Nova acta Academiae Caesareae Leopoldino- Carolinae germanicae naturae curiosorum 78: pp. VIII + 600 + 15 tabs.
- Loesener, T. 1908. Monographia Aquifoliacearum. II. Nova acta Academiae Caesareae Leopoldino- Carolinae germanicae naturae curiosorum 89: pp. 313 + 3 maps.
- Loesener, T. 1942. *Aquifoliaceae*. En: Harms, H. & Mattfeld, J. (eds.) Die Natürlichen Pflanzenfamilien, 2 ed. 20 b, Duncker & Humblot, Berlin, reprint 1960, pp. 36-86.
- Loizeau, P.-A. & Spichiger, R. 1992. Proposition d'une classification des inflorescences d'*Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) Candollea 47 (1): 97-112.
- Loizeau, P.-A., Barriera, G., Manen, J.-F. & Broennimann, O. 2005. Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) on a World-wide scale. En: Friis, I. & H. Balslev, H. (eds.) Plant Diversity and Complexity Patterns. Local, Regional and Global Dimensions pp. 501-520.
- 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 fossil data. Plant Systematics and Evolution 235: 79-98.
- Martínez, M. A. D. P., Pelotto, J. P. & Basualdo, N. 1997. Distribution of flavonoid aglycones in *Ilex* species (*Aquifoliaceae*). Biochemical Systematics and Ecology 25: 619-622.
- Navajas Artaza, A. 1995. La economía yerbatera argentina. En: Erva-Mate: biología e cultura no Cone Sul Winge, H., Ferreira, A. G., Mariath, J. E. de A. & Tarasconi, L. C. (eds.), Erva-Mate: biología e cultura no Cone Sul. Editora da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, pp. 23-26.
- Nicolson, D. H., DeFilipps, R. A., Nicolson, A. C. et al. 1991. *Aquifoliaceae*. En: Nicolson, D. H., DeFilipps, R. A., Nicolson, A. C. et al. (eds.) Flora of Dominica Part 2: *Dicotyledoneae*. Smithsonian Contributions to Botany 77: pp. 26-27.
- Reitz, R., Klein, R. M. & Reis, A., 1983. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Sellowia 34 – 35: 525 pp.

-
- Ricco, R. A., Wagner, M. L. & Gurni, A. A. 1991. Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. Acta Farmacéutica Bonaerense 10 (1): 29-35.
- Ricco, R. A., Wagner, M. L. & Gurni, A. A. 1995. Estudio comparativo de flavonoides en especies austrosudamericanas del género *Ilex*. págs. 243 - 249. En: Winge, H., Ferreira, A. G.; de Mariath, J. E. de A. & Tarasconi, L. C. (eds.), *Erva-Mate: biologia e cultura no Cone Sul*. Editora da UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- Schenkel, E. P., Gosmann G., Montanha, J. A., Heizmann, B. M., Athayde, M. L., Taketa, A. T. C., Pires, V. S. & Guillaume, D. 1997. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: ten years of research on *Ilex* saponins. Ciência e cultura. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science 49 (5/6): 359–363.
- Selbach-Schnadelbach, A. S., Smith Cavalli, J., Manen, J.-F., Coelho, G. C. & Souza-Chies, T. T. de. 2009. New information for *Ilex* phylogeretics basid on the plastid *psbA-trnH* intergenic spacer (Aquifoliaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 159: 182-193.
- Taketa, A. T. C. & Schenkel, E. P. 1994. Saponins from *Ilex pseudobuxus*. Acta Farmacéutica Bonaerense 13 (3): 159-164.
- Taketa, A. T. C. & Schenkel, E. P. 1995. Saponins from *Ilex taubertiana*. Revista Brasileira de Farmácia 76: 9–11.
- Tormen, M. J. 1995. Economia ervateira brasileira. En: Winge, H., Ferreira, A. G., Mariath, J. E. de A. & Tarasconi, L. C. (eds.) *Erva-Mate: biologia e cultura no Cone Sul*, Editora da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, pp. 27-40.
- Wilson, E. G., Michopoulos, F., Kim, H. K., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. 2012. HPLC Determination of Arbutin in *Ilex* species. Chapter 9, pp. 212-228. En: Wilson, E. G., (ed.), *Contributions to the quality control of two crops of economic importance: hops and yerba mate*. Leiden University, ISBN 9789462030572.