

# ESTUDOS PARA DEFINIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E MÉTODOS DE DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DE PLANTAS ADULTAS DE ERVA-MATE

(*Ilex paraguariensis* St. Hill)

SANTOS, D.C. DOS<sup>1</sup> e WENDLING, I.<sup>2</sup>

## RESUMO

Este trabalho é o resultado de uma série de estudos objetivando avaliar os efeitos de diferentes tratamentos (desinfestantes, antioxidantes, bactericidas, reguladores de crescimento e meios de cultura) na desinfestação e no controle da oxidação para o estabelecimento *in vitro* de explantes de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), procedentes de árvores de 8 anos de idade, de Colombo - PR. A avaliação dos experimentos foi realizada sete dias após sua introdução *in vitro*, sendo verificadas grandes taxas gerais de contaminação por fungos e bactérias, bem como, a ocorrência de oxidação nos explantes. De forma geral, conclui-se que o hipoclorito de sódio a 1,5%, com tempo de imersão de 30 minutos e o etanol (álcool 70%) a dois minutos em explantes oriundos de brotações de mudas enxertadas foram os que proporcionaram os melhores resultados.

Palavras-chave: micropropagação, cultivo *in vitro*, *Ilex paraguariensis*.

## ABSTRACT

This work is the result of a series of studies with the objective to evaluate the effect of different treatments (disinfecting, antioxidants, bactericidal, growth regulators and cultures medium) in the disinfection and in the control of the oxidation for the *in vitro* establishment of explants of *Ilex paraguariensis* trees with 8 years of age, from Colombo - PR. The evaluation of the experiments was carried through seven days after its introduction *in vitro*, being verified great general taxes of contamination with fungi and bacteria, as well as, the occurrence of oxidation in the explantes. In general, it was concluded that the sodium hypochlorite at 1.5%, with 30 minutes of immersion and ethanol (alcohol 70%) at two minutes in explants derived from sprouts of grafted seedlings had been the ones that had provided the best resulted.

Key-words: micropropagation, *in vitro* culture, *Ilex paraguariensis*.

## INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) é cultivada por empresas ervateiras e pequenos produtores na região sul do Brasil. Economicamente, esta espécie já foi importante em décadas passadas, quando se destacava entre os principais produtos de exportação do Brasil.

As mudas para plantios de erva-mate podem ser obtidas a partir de sementes ou a partir de propagação vegetativa. A propagação da erva-mate através de sementes é dificultada

---

<sup>1</sup> Danielle Cristine dos Santos - Estudante do Curso Técnico Química Industrial / CEEP. Estagiária da Embrapa Florestas – Estrada da Ribeira Km 111 – Colombo/Paraná/Brasil. oilicato2002@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Ivar Wendling – Engenheiro florestal, DS. Pesquisador Embrapa Florestas. Estrada da Ribeira Km 111 – Colombo/Paraná/Brasil. ivar@cnpf.embrapa.br

pela baixa taxa de germinação (5 a 20%) decorrente de embriões rudimentares nesta espécie, pelo ciclo longo para produção das mudas (2 anos em média) e pela desuniformidade das mudas produzidas (Lessing, 1985; Schneider e Petry, 1985; Zanon, 1988).

Os protocolos de estaquia desenvolvidos para a propagação de erva-mate têm apresentado uma série de limitações para sua adoção em escala comercial, principalmente em relação a métodos eficientes de rejuvenescimento de material adulto, ao desenvolvimento das técnicas de manejo do ambiente de propagação (substratos, umidade na folha e no substrato, controle fúngico e hormonal), manejo das estacas pós enraizamento em relação a nutrição (tipos de adubos, dosagens, intensidade de aplicação, relações de nutrientes etc.), sistemas de enraizamento e condução que não necessitem de transplante para as estacas enraizadas, sombreamento, vigor do sistema radicular, bem como, o estabelecimento de testes clonais, visando estudos de comparação do crescimento de mudas clonais com mudas originárias de sementes (Wendling, 2003). A porcentagem média de enraizamento situa-se em torno de 17% devido à alta variabilidade na capacidade de enraizamento apresentada pela espécie (Graça et al., 1988).

A micropropagação surgiu como uma forma alternativa para propagação massal da erva-mate. Através da micropropagação pode-se produzir um grande número de plantas livres de doenças e em qualquer época de ano e em um menor espaço físico. Em relação à esta técnica de propagação vegetativa, o desenvolvimento de técnicas de resgate de material adulto é de extrema importância, aliado ao desenvolvimento de métodos eficientes de desinfestação de propágulos adultos e diminuição ou eliminação da oxidação fenólica no meio de cultura *in vitro*.

Assim, este trabalho objetivou a realização de estudos buscando avaliar a influência de diferentes métodos de desinfestação de explantes oriundos de árvores adultas selecionadas de erva-mate.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para o presente estudo foram utilizados explantes de erva-mate originados de plantas adultas, os quais foram submetidos a uma desinfestação com detergente comercial e solução contendo Benlate®. Após a prévia desinfestação, os explantes permaneceram em água corrente por 30 minutos, sendo em seguida lavados em detergente 50% por 5 minutos, lavados em água destilada três vezes e transferidos para uma solução de Benlate® 1g L<sup>-1</sup> por 10 minutos.

Na seqüência foram montados seis experimentos para teste de diferentes formulações de desinfestantes, antioxidantes, de reguladores de crescimento e meios de cultura. Como desinfestantes foram utilizados o NaClO (hipoclorito de sódio), o HgCl<sub>2</sub> (cloreto de mercúrio) e a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (água oxigenada); como antioxidante, o PVP-10 (polivinilpirrolidona), a l-cisteína, o carvão ativado e o ácido cítrico em várias concentrações e tempos de permanência variáveis e, como reguladores de crescimento a BAP (benzilaminopurina) e o ANA (ácido naftaleno acético), em concentrações diferentes para cada experimento.

O processo de desinfestação foi realizado em capela de fluxo laminar em condições assépticas, utilizando vidraria previamente esterilizada. Prosseguindo o experimento, os explantes foram introduzidos em meio de cultura composto pelos sais básicos e vitaminas do meio de cultura JADS 89 e MS (Murashige e Skoog, 1962), com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (Quadro 1).

Quadro 1 – Sais e vitaminas utilizadas para o preparo dos meios de cultura JADS 89 e MS.

Composição	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	
	JADS 89	MS
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	32,400	165,00
KNO <sub>3</sub>	80,900	190,00
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	118,10	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40,800	17,000
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	73,950	37,000
MnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1,6900	1,6900
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,1250	0,0025
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,4320	0,8600
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	7,4500	2,7800
Na <sub>2</sub> EDTA . 2 H <sub>2</sub> O	5,5600	3,7300
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3100	0,6200
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,0150	0,0250
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,0250	0,0025
KI	0,0160	0,0830
Tiamina-HCl	0,0500	0,0200
Mio Inositol	5,0000	10,000
Glicina	0,1000	0,4000
Ácido Nicotínico	0,0250	0,1000
Piridoxina HCl	0,0250	0,1000
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	-	44,000

Após sua introdução no meio de cultura, os explantes permaneceram no escuro durante sete dias, após os quais foram avaliados. As condições da sala de crescimento foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 horas de escura, a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C.

Os experimentos testados foram os seguintes:

*a) Experimento 1*

- T1** → HgCl<sub>2</sub> (cloreto de mercúrio) 1% - 5' + sulfato de streptomina 1g L<sup>-1</sup> - 5' + ácido cítrico 3g L<sup>-1</sup> - 5';
- T2** → HgCl<sub>2</sub> (cloreto de mercúrio) 1% - 10' + sulfato de streptomina 2g L<sup>-1</sup> - 10'+ ácido cítrico 3g L<sup>-1</sup> - 10';
- T3** → HgCl<sub>2</sub> (cloreto de mercúrio) 1% - 15' + sulfato de streptomina 3 g L<sup>-1</sup> - 15' + ácido cítrico 3g L<sup>-1</sup> - 15';
- T4** → HgCl<sub>2</sub> (cloreto de mercúrio) 1% -5' + sulfato de streptomina 1 g L<sup>-1</sup> - 5' + PVP 10 (polivinilpirrolidona) 1g L<sup>-1</sup>;
- T5** → HgCl<sub>2</sub> (cloreto de mercúrio) 1% - 10'+ sulfato de streptomina 2 g L<sup>-1</sup> - 10';
- T6** → HgCl<sub>2</sub> (cloreto de mercúrio) 1% - 15' + sulfato de streptomina 3 g L<sup>-1</sup> - 15' + PVP 10 (polivinilpirrolidona) 1g L<sup>-1</sup> - 15';

Foram realizados seis tratamentos com cinco repetições contendo 10 explantes com 10mL de meio de cultura. Os meios de cultura testados foram o sólido: M1 = (JADS 89 +20g L<sup>-1</sup> de sacarose + 7g L<sup>-1</sup> de Agar + 5g L<sup>-1</sup> de PVP 10) e o líquido: M2 = (JADS 89 + 20g L<sup>-1</sup> de sacarose + 5g L<sup>-1</sup> de PVP 10).

b) Experimento 2

**T1** → Álcool 70% - 15' + NaClO (hipoclorito de sódio) 50% - 15' + sulfato de streptomicina  $30 \text{ g L}^{-1}$  - 15' + l-cisteína  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 10'.

**T2** → Álcool 70% - 30' + NaClO (hipoclorito de sódio) 50% - 30' + sulfato de streptomicina  $3 \text{ g L}^{-1}$  - 15' + l-cisteína  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 10'.

**T3** →  $\text{HgCl}_2$  (cloreto de mercúrio) 1% - 10' + sulfato de streptomicina  $3 \text{ g L}^{-1}$  - 15' + l-cisteína  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 10'.

**T4** →  $\text{HgCl}_2$  (cloreto de mercúrio) 1,5% - 10' + sulfato de streptomicina  $3 \text{ g L}^{-1}$  - 3' + l-cisteína  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 10'.

COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA:

**M1:** Soluções  $\frac{1}{4}$  MS +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose +  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  Agar +  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  l-cisteína

**M2:** Soluções  $\frac{1}{4}$  MS +  $20 \text{ g L}^{-1}$  sacarose +  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  agar +  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  PVP-10.

Foram realizados tratamentos com cinco repetições de 10 explantes e 10mL de meio de cultura por tubo.

c) Experimento 3

**T1** → Álcool 70% - 15' + NaClO (hipoclorito de sódio) 50% - 15' + sulfato de streptomicina  $3 \text{ g L}^{-1}$  - 15' + PVP-10 (polivinilpirrolidona)  $5 \text{ g L}^{-1}$  - 30'.

**T2** →  $\text{HgCl}_2$  (cloreto de mercúrio) 1,5% - 10' + sulfato de streptomicina  $3 \text{ g L}^{-1}$  - 15' + PVP-10 (polivinilpirrolidona)  $5 \text{ g L}^{-1}$  - 30'.

Todos os meios de cultura foram compostos por  $\frac{1}{4}$  MS +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose +  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  agar, com as seguintes variações entre antioxidantes e reguladores de crescimento:

**M1** →  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  l-cisteína +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP.

**M2** →  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  l-cisteína +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA.

**M3** →  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  PVP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP.

**M4** →  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  PVP +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA.

Foram realizados dois tratamentos com cinco repetições de 10 explantes e 10mL de meio de cultura por tubo.

d) Experimento 4

**T1** → Álcool 70% - 2' + NaClO (hipoclorito de sódio) 1,5% - 30'

**T2** → Álcool 70% - 1' + NaClO (hipoclorito de sódio) 1,5% - 15'

**T3** →  $\text{HgCl}_2$  (cloreto de mercúrio) 1% - 5' + sulfato de streptomicina  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 5' + ácido cítrico  $3 \text{ g L}^{-1}$  - 5'

**T4** →  $\text{HgCl}_2$  (cloreto de mercúrio) 1% - 3' + sulfato de streptomicina  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 3' + ácido cítrico  $3 \text{ g L}^{-1}$  - 3'

Foram realizados quatro tratamentos com cinco repetições de 10 explantes e 10 mL de meio de cultura por tubo.

### COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA:

**M1** → ¼ MS + 20g L<sup>-1</sup> sacarose + 6,0g L<sup>-1</sup> agar + 5g L<sup>-1</sup> PVP-10 + 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP

**M2** → ¼ MS + 20g L<sup>-1</sup> sacarose + 6,0g L<sup>-1</sup> agar + 5g L<sup>-1</sup> PVP-10 + 5g L<sup>-1</sup> carvão ativado + 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP.

**M3** → Meio líquido ¼ MS + 20g L<sup>-1</sup> sacarose + 5g L<sup>-1</sup> PVP-10 + 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP

### e) Experimento 5

**T1** → Álcool 70% - 2' + NaClO (hipoclorito de sódio) 1,5% - 30' + Tween 20 - 2 gotas;

**T2** → Álcool 70% - 2' + NaClO (hipoclorito de sódio) 1,5% - 30' + Tween 20 - 2 gotas + PVP-10 (polivinilpirrolidona) 1g L<sup>-1</sup>;

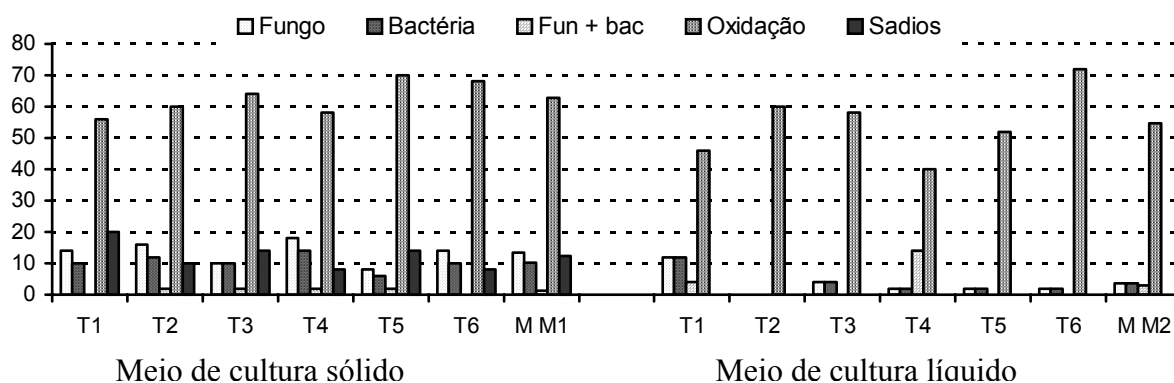
**T3** → Álcool 70% - 1' + NaClO (hipoclorito de sódio) 1,8% - 20' + Tween 20 - 2 gotas + PVP-10 (polivinilpirrolidona) 5g L<sup>-1</sup> - 10'.

Para o T1 foram utilizados 55 explantes; 73 explantes para o T2 e 31 para o T3 com 10 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi formado pelas soluções ¼ MS + 20g L<sup>-1</sup> de sacarose + 7g L<sup>-1</sup> de agar + 2g L<sup>-1</sup> de PVP 10 + 0,5mg L<sup>-1</sup> BAP. Neste experimento os explantes foram oriundos de brotações advindas de enxertos com 90 dias de idade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Figura 1, as taxas de contaminação (fungo, bactéria e fungo/bactéria), oxidação e explantes saudáveis, no experimento 1 apresentaram variações expressivas entre os diferentes tratamentos estudados.

Figura 1 - Percentual de contaminação (fungo, bactéria, fungo + bactéria), oxidação e explantes saudáveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no experimento 1, sete dias após a introdução *in vitro*.

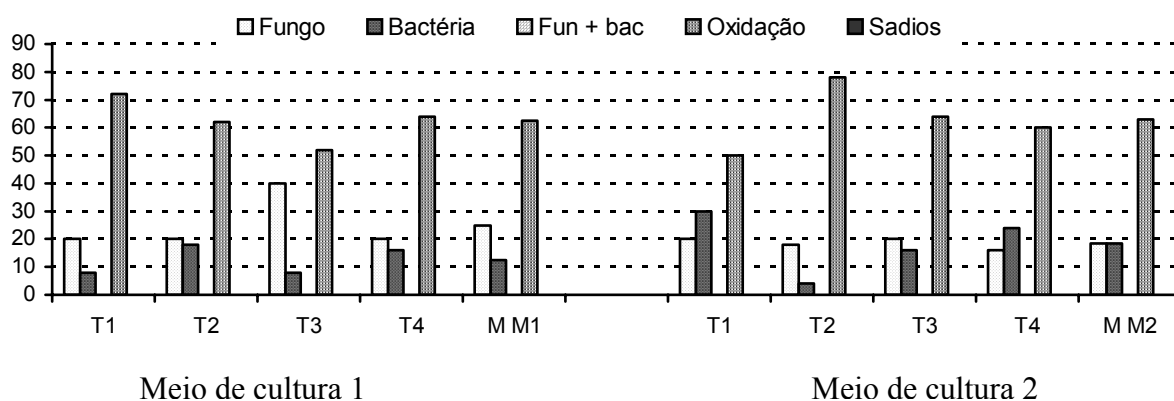


No experimento 1 (Figura 1) observa-se grandes variações entre o meio de cultura líquido e sólido estudado. Em todos os tratamentos assépticos foi utilizado cloreto de mercúrio, sulfato de streptomina. Nos tratamentos T1, T2 e T3 o agente antioxidante foi o ácido cítrico e nos T4, T5 e T6 foi o PVP-10.

De maneira geral, o meio sólido proporcionou maior taxa de contaminação por bactéria, enquanto que o meio líquido uma menor contaminação por fungos, o que, neste último meio, por ter sido atribuído ao constante agito do meio em que os explantes se encontravam. Em relação ao percentual de contaminação por fungo + bactéria e oxidação não se observam diferenças entre os dois tipos de meio de cultura. Entretanto, o meio sólido foi o

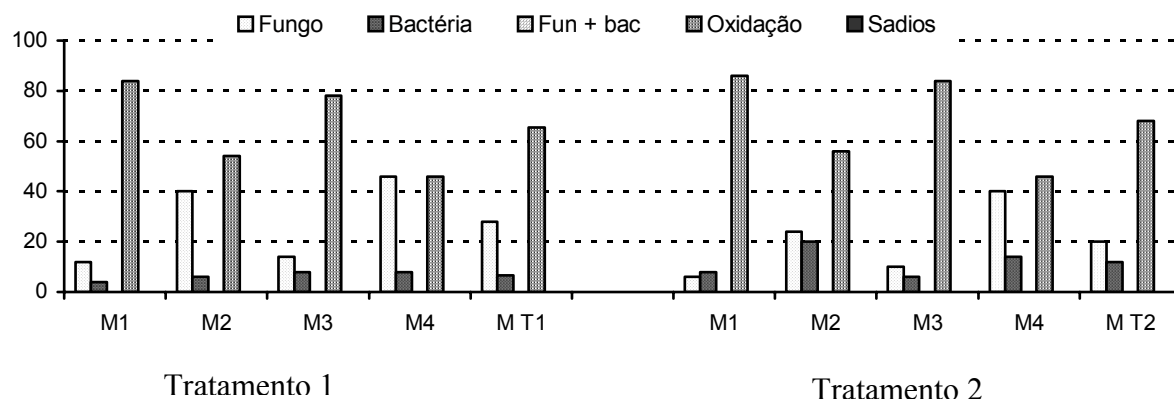
único que proporcionou a obtenção de explantes saudáveis, com variação de 8 a 20%, os quais aos quinze dias de idade, contaminaram por bactéria e oxidaram. Assim, o ácido cítrico nas concentrações e tempos usados não proporcionou diferenças no controle da oxidação dos explantes em relação ao PVP.

Figura 2 - Percentual de contaminação (fungo, bactéria, fungo + bactéria), oxidação e explantes saudáveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no experimento 2, sete dias após a introdução *in vitro*.



No experimento 2 foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) um quarto, onde pode ser observado (Figura 2) que a contaminação e oxidação entre os dois meios de cultura adotados ficou dentro de uma mesma faixa de percentual (de 16 a 20%), tendo o T3 no meio 1 proporcionado 40% de contaminação por fungo. Neste experimento não foram obtidos explantes saudáveis.

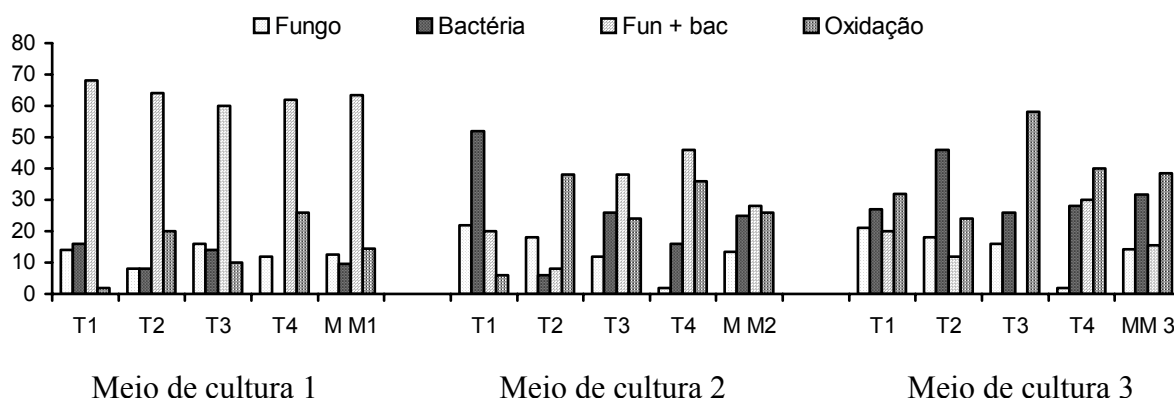
Figura 3 - Percentual de contaminação (fungo, bactéria, fungo + bactéria), oxidação e explantes saudáveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no experimento 3, sete dias após a introdução *in vitro*.



Pelos resultados do experimento 3 (Figura 3), percebe-se que a maioria dos explantes oxidaram, sendo o M1 e M3 (L-Cisteína e BAP) que obtiveram a maior taxa de oxidação e a menor em contaminação por fungo. Já nos meios de cultura M2 e M4 a taxa de oxidação apresentada foi menor e a de contaminação por fungos maior, podendo esta diferença atribuída à presença de ANA no meio de cultura.

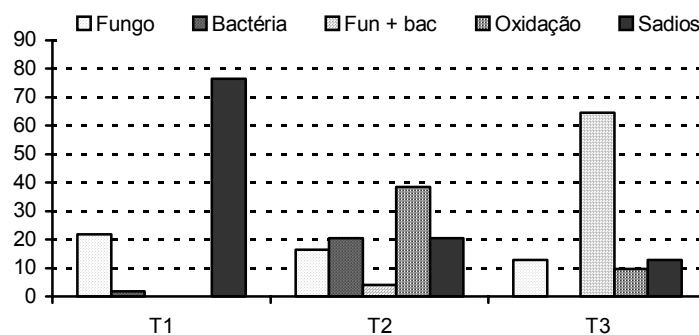
Em geral o tratamento T2 proporcionou menor contaminação por fungos e maior por bactérias, levando a proposição de o cloreto de mercúrio ser mais eficiente na descontaminação por fungos.

Figura 4 - Percentual de contaminação (fungo, bactéria, fungo + bactéria), oxidação e explantes saudios de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no experimento 4, sete dias após a introdução *in vitro*.



No experimento 4 foram testados três meios de cultura diferentes, sendo que as taxas de oxidação foram maiores no meio 3 (média de 38,5%), seguido do meio 2 (média de 26,0%) e meio 1 (média de 14,5%); para a contaminação por bactérias a mesma tendência foi observada e para fungo + bactéria a tendência inversa, ou seja, menores ocorrências no meio 1 (média de 63,5%), seguido pelo meio 2 (média de 28,0%) e pelo meio 3 (média de 15,5%) (Figura 5). Já para a contaminação por fungos, não houve influência dos diferentes meios de cultura estudados.

Figura 5 - Percentual de contaminação (fungo, bactéria, fungo + bactéria), oxidação e explantes saudios de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no experimento 5, sete dias após a introdução *in vitro*.



No que diz respeito aos tratamentos, dentro de cada meio de cultura se observa a superioridade do T1 e T2 em relação aos demais na característica de oxidação dos explantes, o que pode ser atribuído a ausência de cloreto de mercúrio, considerado um agente oxidante.

O experimento 5 foi o qual proporcionou os melhores resultados em comparação com os demais experimentos, obtendo-se índices médios de 36,6% de explantes saudios (Figura 5). Em vista de a origem dos explantes deste experimento ser de brotações de enxertos, conclui-se que a enxertia de brotações de árvores adultas previamente a introdução das mesmas em condições *in vitro* é fator chave na obtenção de resultados satisfatórios, ou seja, diminuição geral dos índices de contaminação e oxidação, bem como, maior percentual de explantes saudios estabelecidos *in vitro*.

Rey e Mroginski (1988) avaliaram a capacidade de regeneração *in vitro* de explantes obtidos de mudas de sementes e estacas de plantas jovens e adultas de erva-mate. Evidenciaram que explantes obtidos de mudas de árvores adultas não são adequados para culturas *in vitro*, uma vez que apresentaram altas taxas de contaminação e não multiplicavam (recalcitrância *in vitro*).

Em extensa revisão sobre o assunto, Mroginski *et al.* (2000) concluíram que é possível micropropagar plantas de erva-mate com menos de dois anos de idade mediante o cultivo de segmentos nodais em meio constituído pelos sais minerais e vitaminas de ¼ MS, 3% de sacarose e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido nafatalenoacético (ANA). Os explantes assim obtidos são enraizados em ¼ MS, mais 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB). Porém, em termos de propágulos obtidos de árvores adultas (acima de 10 anos de idade) somente podem ser estabelecidos *in vitro* caso os explantes provêm de plantas obtidas por estaquia, as quais são mantidas em condições de estufa e sejam cultivados em ¼ MS sem o emprego de reguladores de crescimento. Mesmo assim, o percentual de enraizamento dos propágulos obtidos é baixo. No caso do estabelecimento de explantes de plantas matrizes adultas diretamente *in vitro*, as únicas respostas que se obtém, segundo os mesmos autores, são o seu escurecimento e sua contaminação com fungos e bactérias, não sendo, portanto, possível induzir sua brotação.

Em relação aos diferentes tratamentos aplicados aos explantes no presente experimento, de forma geral, observa-se que o T1, constituído de Álcool 70% - 2' + NaClO (hipoclorito de sódio) 1,5% -30'+ Tween 20 – 2 gotas foi o que apresentou melhores resultados, levando a conclusão de em tratamentos mais simples se consegue resultados positivos, desde que os explantes não provenham diretamente da árvore matriz do campo.

## CONCLUSÃO

Em função dos objetivos inicialmente propostos e nas condições com que os experimentos foram desenvolvidos, pode-se concluir que a combinação entre álcool 70% por dois minutos e hipoclorito de sódio a 1,5% durante um tempo de 30 minutos, com explantes oriundos de brotações de enxertos consistiram no melhor tratamento para a desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de erva-mate (*Ilex paraguarienses*). Conclui-se também da necessidade de estudos sobre a contaminação por bactéria endógena visível somente após alguns sucessivos subcultivos *in vitro* e a oxidação da erva-mate (*Ilex paraguarienses*) para um melhor aproveitamento da técnica de micropropagação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, M.T.A. Projeto erva-mate. In: **CONGRESSO FLORESTAL DO PARANÁ, 2**, 1988. Curitiba. Anais. Curitiba: Instituto Florestal do Paraná. 1988. p. 704.710.
- CARPANEZZI, A. A.; ZANON, A.; IEDE, E. T.; STURION, J. A.; GRAÇA, M.E.C.; LOURENÇO, R. S. Diretrizes de pesquisa aplicada para plantios de erva-mate no Brasil. In: **CONGRESSO FLORESTAL DO PARANÁ, 2**, 1988. Curitiba. Resumos. Curitiba: Instituto Florestal do Paraná. 1988. p. 59.
- GRAÇA, M. E. C., COOPER, M. A., TAVARES, F. R., CARPANEZZI, A. A. **Estaquia de erva-mate**. Curitiba, EMBRAPA-CNPF, 1988. 6p. (Circular Técnica, 18).
- IRITANI, C. **Ação de reguladores de crescimento na propagação vegetativa por estaquia do *Ilex paragrarienses* Saint Hilaire e *Araucária angustifólia* (Bert) O. Ktze**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 1981. 163p. Tese de Mestrado.



- KARAS, A.C. Inventário Florestal em povoaamentos nativos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) **In: CONGRESSO FLORESTAL DO PARANÁ, 2**, 1988, Curitiba. Resumos. Curitiba: Instituto Florestal do Paraná, 1988.p.33.
- LESSING, P.G. Reflorestamento com erva-mate. **In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10**. Silvicultura da erva-mate. (*Ilex paraguariensis* St. Hill.), Curitiba, 1983. Anais. Curitiba. EMBRAPA-CNPf, 1985. p. 53-57. (EMBRAPA-CNPf. Documentos, 15).
- MROGINSKI, L., SANSBERRO, P., REY, H., COLLAVINO, M. **Micropropagacion de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): estado actual y perspectivas**. In. I CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE E II REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE. p. 141-151. 2000.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- REY, H. Y., MROGINSKI, L. A. Regeneración de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo *in vitro* de ápices caulinares y de segmentos nodales. **Phyton**, v. 48, n. 1/2, p. 139-145. 1988.
- SCHNEIDER, C.; PETRY, G. Aspectos da cultura da erva-mate na região de Erebangó. Município de Getúlio Vargas – RS, em propriedade da Empresa Hoppen, Petry & Cia. Ltda. **In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10**. Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.), Curitiba, 1983. Anais. Curitiba, EMBRAPA-CNPf, 1985. P. 64-70. (EMBRAPA-CNPf. Documentos, 15).
- TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas** – Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPf, 1998. 2v.(864p.).
- WENDLING, I. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis*): estado da arte e tendências futuras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003 (no prelo).
- ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA-CNPf, 1988.7p. (EMBRAPA-CNPf. Circular técnica, 16).