

Comunicado 215

Técnico

ISSN 1806-9185
Pelotas, RS
Dezembro 2009

versão
ON LINE

Fotos: Giuliane Viegas e Leonardo Ferreira Dutra



Estabelecimento *In Vitro* de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Leonardo Ferreira Dutra¹
Natália Dias Gomes da Silva²

A erva-mate é nativa de região de clima temperado. Sua área de ocorrência natural está restrita a três países da América do Sul: Brasil, Paraguai e Argentina, cuja superfície de abrangência geográfica estende-se desde as latitudes de 21° até 30°S e longitudes de 48°30' até 56°10'W, com altitudes variáveis entre 500 e 1.700 metros (OLIVEIRA e ROTTA, 1985). Pode ser utilizada para a produção de bebidas (chimarrão, tereré, refrigerantes e chás), apresentando grande potencial para diversas aplicações industriais como corantes, conservantes de alimentos, produtos de higiene e cosméticos (MACCARI JUNIOR e MAZUCHOWSKI, 2000).

Sua propagação é realizada principalmente por sementes. Entretanto, a produção de mudas de erva-mate via sementes apresenta uma série de limitações e dificuldades, como: a baixa qualidade genética e fisiológica das sementes (STURION, 1988); a dormência das sementes; o longo tempo necessário para a estratificação; a germinação lenta, desuniforme (PRAT KRIKUN, 1993; MENNA, 1995) e em baixo percentual (MENNA, 1995; STURION, 1988); o longo período necessário para a produção das mudas (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 1999; STURION, 1988;

HIGA, 1983); a necessidade de repicagem das mudas e a dificuldade de obtenção de sementes com alto padrão genético. Todos estes fatores contribuem para elevar o custo de produção das mudas, além de limitar a sequência dos programas de melhoramento genético da espécie. As sementes da erva-mate apresentam dormência devido ao embrião se encontrar morfologicamente imaturo, requerendo determinado período de estratificação em areia para que ocorra o seu desenvolvimento e favoreça a germinação (FOWLER e STURION, 2000), além de apresentarem endocarpo lenhoso (MEDEIROS, 1998), ou seja, dormência tegumentar (FOWLER e STURION, 2000).

Os plantios de erva-mate a partir de sementes coletadas sem critérios técnicos apresentam desenvolvimento heterogêneo, com reflexos negativos na produtividade e na qualidade do produto final. Esses problemas podem ser minimizados ou até solucionados por meio da obtenção de mudas por propagação vegetativa de indivíduos geneticamente superiores, preservando-se suas características domésticas.

Neste sentido, visando obter indivíduos geneticamente idênticos à planta-mãe, deve-se adotar um método de

¹Eng. Agrôn., Dr., Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, leo@cpact.embrapa.br

²Graduanda em Ciências Biológicas, Faculdade Atlântico Sul de Pelotas - Faculdades Anhanguera, Bolsista PIBIC/CNPq, Pelotas, RS.

propagação vegetativa ou assexuada. Além disso, segundo Graça et al. (1989), para espécies florestais, a propagação vegetativa oferece vantagens com a possibilidade de se obter ganhos genéticos maiores do que na reprodução via semente.

Dentre os métodos potenciais de propagação vegetativa com possibilidades de aplicação para a cultura da erva-mate, podem-se citar a estaquia, a enxertia, a micropopulação e a miniestaquia. Cada técnica tem limitações e vantagens, devendo ser criteriosamente escolhida aquela que se adapta para cada objetivo proposto (multiplicação massal, rejuvenescimento, formação de pomares de sementes e bancos de conservação genética, entre outros) e em função das condições técnico-financeiras disponíveis.

Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com a estaquia de erva-mate (PRAT KRIKUN e ARANDA, 1980; IRITANI, 1981; IRITANI e SOARES, 1981; HIGA, 1983; PRAT KRIKUN, 1993; PRAT KRIKUN et al., 1983 e 1986; NIKLAS, 1988; SAND, 1989; TAVARES et al., 1992; CORREA, 1995; STURION e RESENDE, 1997). Graça et al. (1988) afirmaram que os estudos têm sido inconclusivos quanto à sua viabilidade em escala comercial, sendo que a porcentagem média de enraizamento tem-se situado em torno de 17%. De forma geral, é consenso a grande dificuldade de enraizamento das estacas, bem como, a produção de mudas clonais de baixa qualidade (sistema radicular deficiente) dessa espécie, principalmente, quando se trabalha com plantas matrizes adultas. Além disso, os protocolos de enraizamento estabelecidos até o momento não puderam ser aplicados em nível comercial, não sendo possível, portanto, a sua adoção em programas clonais. De acordo com Wendling e Souza Júnior (2003), uma das possíveis causas da baixa porcentagem de enraizamento de estacas de erva-mate oriundas de árvores adultas é a baixa de juvenilidade do ramo.

Segundo Wendling (2004), para genótipos selecionados de erva-mate que apresentam limitada capacidade de propagação vegetativa por qualquer outro método, a enxertia poderá vir a ser implementada para obtenção de plantios comerciais. Entretanto, para tal objetivo necessitam ser desenvolvidos estudos buscando avaliar, além dos métodos de enxertia, os efeitos da origem do material propagativo das plantas matrizes no crescimento e no desenvolvimento das plantas formadas, épocas de enxertia e manejo dos enxertos.

A miniestaquia é uma técnica que foi desenvolvida para plantas do gênero *Eucalyptus* e consiste em

manter as mudas dos genótipos selecionados em recipientes no viveiro (jardim miniclonal), onde, após a poda de seus ápices, elas emitem brotações que serão coletadas e estacaadas em casa de vegetação, originando as mudas para o plantio comercial.

Resultados promissores de emprego dessa técnica para a erva-mate foram demonstrados por Wendling et al. (2007).

A micropopulação é uma técnica de propagação de plantas que possibilita a obtenção de grande número de indivíduos a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório. Pode também auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando a antecipação em décadas dos resultados finais. Entretanto, o uso da micropopulação, na produção comercial de mudas de muitas espécies florestais, ainda não se justificou técnica e economicamente.

Os protocolos de propagação vegetativa desenvolvidos até o momento para a cultura da erva-mate se referem principalmente a material juvenil não selecionado, entretanto ainda não foram adaptados e testados em escala comercial.

Uma das maiores dificuldades do estabelecimento de segmentos nodais *in vitro* é a grande contaminação e oxidação inicial dos explantes. Para minimizar a contaminação, os explantes têm sido retirados de plantas que se encontram em condições de viveiro (BERNASCONI et al., 1998), e que foram submetidas a tratamentos periódicos com fungicidas antes da coleta dos explantes (PANICK, 1995; ZANILO e ZANETTE, 2001; HÖRNER et al., 2000 b).

Até o momento, a maioria dos trabalhos referentes ao cultivo *in vitro* de erva-mate tem-se limitado ao cultivo de embriões (HU et. al, 1978; FERREIRA et al., 1991; FERREIRA e SILVEIRA, 1992) e de segmentos nodais oriundos de mudas produzidas de materiais juvenis (KRYVENKI, 1997; MROGINSKI et al., 1997, SANSBERRO et al., 1999; SANSBERRO et al., 1997 a e b; SANSBERRO et al., 2001; KRAEMER et al., 2002; HORBACH, 2008).

Embora inúmeros trabalhos tenham sido realizados com micropopulação de erva-mate no Brasil, alguns com resultados promissores, ainda não há otimização do processo visando a manutenção indefinida de explantes *in vitro* (DOMBROSKI et al., 2005; SANTOS e WENDLING, 2003; SANTOS et al., 2005; LIMA et al., 2006; QUADROS et al., 2006; ROSA et al., 2006 a, b).

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer *in vitro* segmentos nodais de erva-mate, em diferentes meios de cultura.

Procedimento para o estabelecimento *in vitro*

Plantas matrizes com um ano e meio de idade, propagadas por sementes e cultivadas em casa de vegetação de vidro da Embrapa Clima Temperado foram pulverizadas com Agrimicina® PM (1ml L⁻¹) aos 26, 19, 12 e 5 dias antes da coleta das brotações.

Após a coleta, as brotações tiveram suas folhas retiradas e foram preparados segmentos nodais com 0,5-1,0 cm de comprimento. Esses foram desinfestados em álcool 70% por 2 minutos, em hipoclorito de sódio a 1% sob agitação por 10 minutos e posterior tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar.

Ao término da assepsia, os explantes foram inoculados em frascos de vidro contendo 10 mL dos meios de cultura, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 1/4 MS, WPM (LLOYD e McCOWN, 1981), e B5 (GAMBORG et al., 1968). Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,9 depois da adição de ágar e foram autoclavados à 1,5 atm e 121°C, durante 20 minutos. Os frascos contendo os explantes foram acondicionados em sala de crescimento a 24 ± 2°C, 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa de 2000 lux, durante 30 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos

(meios MS, 1/4 MS, WPM e B5) e cinco repetições contendo sete explantes cada uma. A partir de sete dias da inoculação dos explantes, foram avaliadas, semanalmente, as variáveis percentual de explantes sadios e de contaminação.

Já na primeira semana de cultivo *in vitro*, constatou-se a ocorrência de contaminação dos explantes em todos os meios de cultura, com percentuais variando de 28,5 a 40%. Nas semanas seguintes, as taxas de contaminação foram crescentes, com percentuais variando de 91 a 100% (Figura 1), culminando com apenas 5,25% de explantes sobreviventes.

De acordo com Mroginski et al. (1996), um dos problemas na micropropagação de erva-mate é a alta taxa de contaminação por fungos e bactérias, além da oxidação dos explantes na fase de estabelecimento. A provável explicação para a dificuldade em se estabelecer erva-mate *in vitro* é a existência de microorganismos endofíticos associados a essa. Trabalhos têm evidenciado a presença de fungos endofíticos em partes aéreas de erva-mate (HÖRNER et al., 2000 a; PENNA, 2000; AUER e GRIGOLETTI JUNIOR, 2002; PIMENTEL et al., 2006). A presença de bactérias endofíticas também já foi relatada em sementes de erva-mate (PENNA, 2000).

Não houve diferença significativa entre as variáveis para os diferentes meios de cultura. Resultado semelhante foi obtido por Horbach (2008), que constatou que o número de folhas e a altura de plântulas de erva-mate cultivadas *in vitro* não diferiram significativamente em função dos meios de cultura testados.

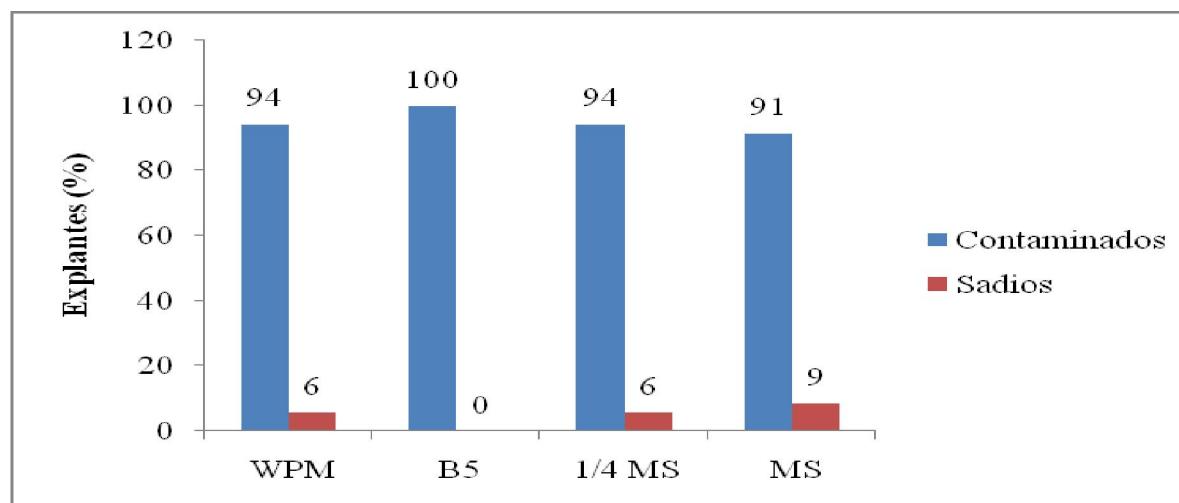


Figura 1. Percentagem de contaminação e de explantes sadios de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), cultivados *in vitro* em quatro meios de cultura. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2009.

Tem sido demonstrada a possibilidade de micropropagação da erva-mate nos trabalhos de Mroginski et al. (1997), Sansberro et al. (1997 a e b), Sansberro et al. (1999) e Sansberro et al. (2001). Entretanto, embora tenham tido sucesso no estabelecimento *in vitro* da erva-mate, ainda não obtiveram protocolo de multiplicação, mantendo os explantes indefinidamente sob cultivo. Nos trabalhos realizados no Brasil, tem-se enfrentado dificuldades ainda no estabelecimento das culturas, em função das altas taxas de contaminação dos explantes.

As respostas obtidas no presente trabalho constataram comportamento semelhante da erva-mate micropropagada, em relação a outros trabalhos (SANTOS et al., 2005; DOMBROSKI et al., 2005; ROSA et al., 2006 a, b; QUADROS et al., 2006; LIMA et al., 2006).

A maioria dos trabalhos que envolvem micropropagação de erva-mate tem indicado o meio de cultura 1/4 MS. No entanto, em função das altas taxas de mortalidade verificadas, não houve influência de nenhum dos meios de cultura utilizados no cultivo *in vitro* da espécie.

Considerando-se os resultados obtidos com a micropropagação de erva-mate até o presente momento, evidencia-se a necessidade de aperfeiçoamento desta técnica para a clonagem massal de indivíduos adultos selecionados. Sugere-se a continuidade de pesquisas que envolvam tratamentos fitossanitários das plantas matrizes, bem como diferentes agentes desinfestantes e suas concentrações na assepsia dos explantes.

Observou-se que a manutenção dos explantes por tempo superior a 30 dias, visando a multiplicação é, até o momento, inviável. Neste sentido, a continuidade dos trabalhos com micropropagação de erva-mate é necessária, visto que essa técnica poderá representar grande impacto na produção de mudas da espécie, principalmente de material adulto, o qual é difícil de ser propagado vegetativamente.

Conclusões

Não houve diferença significativa entre os meios de cultura utilizados, no estabelecimento *in vitro* de erva-mate.

Em razão das altas taxas de contaminação verificadas, a porcentagem máxima de sobrevivência dos explantes foi de 5,25%.

Referências

- AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Associação de fungos com *Ilex* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 45, p. 109-124, 2002.
- BERNASCONI, N. K.; MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. Micropropagación de la yerba-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del genotipo y de la época del año en el establecimiento *in vitro* de los explantes. **Phyton**, Buenos Aires, v. 62, n. 1/2, p. 95-99, 1998.
- CORREA, G. **Controle genético do enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire)**. 1995. 55 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DOMBROSKI, J. R. C.; HANSEL, F. A.; FRACARO, L. C.; DUTRA, L. F. Métodos físicos para descontaminação de bactérias endofíticas em explantes de erva-mate. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 4., 2005, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 1 CD-ROM.
- FERREIRA, A. G.; CUNHA, G. G.; SILVEIRA, T. S.; HU, C. Y. *In vitro* germination of immature embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**, Buenos Aires, v. 52, n. 1, p. 27-32, 1991.
- FERREIRA, A. G.; SILVEIRA, T. S. Crescimento *in vitro* de embriões de 4 espécies de *Ilex*. In: REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1., 1992, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: FAPERGS: Secretaria de Ciência e Tecnologia, 1992. p. 2.
- FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 5 p. (Embrapa Florestas. **Comunicado Técnico**, 45).
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GRAÇA, M. E. C.; COOPER, M. A.; TAVARES, F. R.; CARPANEZZI, A. A. Estaquia de Erva-mate. Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1988. 6 p. (EMBRAPA-CNPF. **Circular técnica**, 18).
- GRAÇA, M. E. C.; TAVARES, F. R.; RODIGHERI, H. R.; COOPER, M. A. Produção de mudas de erva-mate por estaquia. Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1989. não paginado.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; RODIGHERI, H. A.; MOSELE, S. H.; WIELEWSKI, P. Estimativa de danos causados por doenças em viveiros de erva-mate, nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. Colombo: EMBRAPA-CNP, 1999. 3 p. (EMBRAPA-CNP. **Comunicado Técnico**, 21).

HIGA, R. C. V. Estaquia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* SAINT HILAIRE): resultados preliminares. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 304-305, 1983.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire - Aquifoliaceae)**. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

HÖRNER, L. de A.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A.; MIELKE, M. S.; SUZIN, M.; DENARDIN, N. D. Estudo do desenvolvimento e identificação dos agentes contaminantes da erva-mate cultivada *in vitro*. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA MATE, 3., 2000, Encantado. **Anais...** Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul; Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2000 a. p. 453-456.

HÖRNER, L. de A.; AUGUSTIN, L.; MIELKE, M. S.; SUZIN, M. Efeito dos pré-tratamentos e uso de diferentes combinações de fungicida e antibiótico no meio de cultura em explantes de erva-mate. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA MATE, 3., 2000, Encantado. **Anais...** Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul; Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2000 b. p. 457-460.

HU, C. Y.; OCHS, J. D.; MANCINI, F. M. Further observations on *Ilex* embryoid production. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 89, n. 1, p. 41-49, 1978.

IRITANI, C. **Ação de reguladores de crescimento na propagação vegetativa por estaquia de *Ilex paraguariensis* St. Hil. e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** 1981. 163 f. Dissertação (Mestrado - Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Ação de reguladores de crescimento em estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Floresta**, Curitiba, v. 2, n. 12, p. 59-67, 1981.

KRAEMER, K. H.; SCHENKEL, E. P.; VERPOORTE, R. *Ilex paraguariensis* cell suspension culture characterization and response against ethanol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 257-263, 2002.

KRYVENKI, M. A. Micropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto de la bencilaminopurina y la kinetina sobre el cultivo *in vitro* de segmentos nodales. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais....** Colombo: EMBRAPA-CNP, 1997. p. 424. (EMBRAPA-CNP. Documentos, 33).

LIMA, B. H. de; QUADROS, K. M. de; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Eficiência do método de desinfestação de explantes de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire por cloreto de mercúrio. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 5., 2006, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 1 CD-ROM.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagator's Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427, 1981.

MACCARI JUNIOR, A.; MAZUCHOWSKI, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate.** Curitiba: Câmara Setorial Produtiva da Erva-Mate do Paraná, 2000. 160 p.

MEDEIROS, A. C. de S. **Dormência em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: Embrapa-CNP, 1998. 25 p. (Embrapa-CNP. Documentos, 36).

MENNA, A. B. Proposta para ação extensionista na cultura da erva-mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E., de A.; TARASCONI, L. C. **Erva-mate: biologia e cultura no cone sul.** Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1995. p. 235-239. (Org.).

MROGINSKI, L. A.; BERNASCONI, N. K.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. Micropagación de la yerba-mate (*Ilex paraguarienses* St. Hil.): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. **Phyton**, Buenos Aires, v. 59, p. 161-170, 1996.

MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; COLLAVINO, M. Micropagación vegetativa de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): estado actual y perspectivas. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNP, 1997. p. 141-152. (EMBRAPA-CNP. Documentos, 33).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NIKLAS, C. O. Empleo de sustancias promotoras de enraizamiento en estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Citrusmisiones**, Montecarlo, n. 18, p. 12-19, 1988.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais – Silvicultura da Erva-Mate. 10., 1985, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1985. p. 17-36.

PANICK, B. Multiplicación clonal de plantas elite de yerba mate mediante técnicas de cultivo *in vitro*. In: WINGE, H. et al. **Erva-mate: biología e cultura no Conesul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 157-160.

PENNA, E. B. da S. **Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e variabilidade genética em *Phyllosticta sp.* por RAPD**. 2000. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 124-128, 2006.

PRAT KRIKUN, S. D.; ARANDA, D. **Plan de trabajo: selección clonal de la Yerba mate. Progresos y resultados: Año 1979**. [S.I.: s.n.], 1980. 2 p.

PRAT KRIKUN, S. D.; BELINGHERI, L. D.; PICCOLO, G. A.; MAGRAN, E.; SWIER, R.; FLORES, S. E. R.; ACUÑA, D. O.; ABELARDO, S. **Yerba mate: informe sobre investigaciones realizadas, período 1982-83**. Cerro Azul: INTA - Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, 1983. 32 p. (INTA. Publicación Miscelánea, 7).

PRAT KRIKUN, S. D.; BELINGHERI, L. D.; PICCOLO, G. A.; FLORES, S. E. R.; FONTANA, H. P. **Yerba mate: informe sobre investigaciones realizadas, período 1984-85**. Cerro Azul: INTA - Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, 1986. 32 p. (INTA. Publicación Miscelánea, 15).

PRAT KRIKUN, S. D. **Yerba mate: técnicas actualizadas de cultivo**. Cerro Azul: INTA - Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, 1993. 14 p. (INTA. Publicación Miscelánea, 27).

QUADROS, K. M. de; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Desinfestação da erva-mate *in vitro*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 5., 2006, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 1 CD-ROM. (Embrapa Florestas. Documentos, 132).

ROSA, F. C. da; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; QUADROS, K. M. de. **Micropropagação de erva mate: efeito de diferentes épocas do ano no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006a. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 163).

ROSA, F. da R.; DUTRA, L. F.; BRONDANI, G. E.; HANSEL, F. A. Micropropagação de erva-mate: Efeito da desinfestação no estabelecimento de segmentos nodais. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4.; REUNIÓN TÉCNICA DE LA YERBA MATE, 4., EXPOSICIÓN DE AGRONEGOCIOS DE LA YERBA MATE, 2., 2006, Posadas. **Actas...** Posadas: INTA, 2006b. p. 184-187.

SAND, H. A. **Propagación agámica de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Cerro Azul: INTA - Estacion Experimental Agropecuaria Misiones, 1989. 11 p. (INTA. Nota Técnica, 40).

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. Obtencion de plantas mediante el cultivo *in vitro* de embriones de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais....** Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1997a. p. 422. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 33).

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. Regeneracion de plantas de yerba mate por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de plantas jóvenes. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1997b. p. 423. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 33).

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aequifoliaceae). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 35, n. 5, p. 401-402, 1999.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; KRIVENKI, M. A. Plant regeneration from *Ilex* spp. (Aequifoliaceae) *in vitro*. **Biocell**, Mendoza, v. 25, n. 2, p. 139-146, 2001.

SANTOS, D. C. dos; WENDLING, I. Estudos para definição de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais...** [Chapecó]: EPAGRI, 2003. 1 CD-ROM.

SANTOS, D. C. dos; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; FRACARO, L. C. Assepsia para estabelecimento *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 638, 2005.

STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamento com erva-mate.** Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1988. 10 p. (EMBRAPA-CNPF. Circular técnica, 17).

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. de. Programa de melhoramento genético da erva-mate no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Embrapa. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1997. p. 285-298. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 33).

TAVALVES, F. R.; PICHETH, J. A.; MASCHIO, L. M. de A. Alguns fatores relacionados com a estação da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) St. Hil. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. Florestas: desenvolvimento e conservação: **anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1992. p. 626-639.

WENDLING, I. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras.** Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 1 CD-ROM. (Embrapa Florestas. Documentos, 91).

WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestação de material juvenil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais...** [Chapecó]: EPAGRI, 2003. 1 CD-ROM.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 42, n. 2, p. 289-292, 2007.

ZANILO, S. R.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 2, n. 1/2, p. 39-44, 2001.

Comunicado Técnico, 215

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: Caixa Postal 403

Fone/fax: (53) 3275 8199

E-mail: sac@cpact.embrapa.br

1^ª edição

1^ª impressão 2009: 20 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior

Secretária- Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia

Membros: José Carlos Leite Reis, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Saita de Castro, Flávio Luiz Carpêna Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi e Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Expediente

Supervisor editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê

Revisão de texto: Marcos de Oliveira Treptow

Editoração eletrônica: Sérgio Ilmar Vergara dos Santos