

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARILIA APARECIDA MORANDI

Desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de erva-mate
(*Ilex paraguariensis* Saint Hil.)

Piracicaba
2020

MARILIA APARECIDA MORANDI

Desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de erva-mate
(*Ilex paraguariensis* Saint Hil.)

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba

2020

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Morandi, Marília Aparecida

Desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.) / Marília Aparecida Morandi; Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

123 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Cultura de tecidos vegetais 2. Embriogênese somática 3. Erva-mate. 4. Morfogênese 5. Propagação vegetativa I. Título.

CDU 631.53 : 633.77

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais, Divercindo e Marilda e à minha irmã Paula,
pelo amor incondicional e por todo apoio e presença durante
a elaboração deste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por guiar meus passos.

Aos meus pais, Divercindo e Marilda e a minha irmã Paula, por mesmo de longe terem se mantidos presentes, pelo apoio incondicional e por serem o motivo de eu seguir em frente.

A toda minha família, pelo apoio e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao professor Dr. Antonio Figueira, pela orientação e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade realização do mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Código de Financiamento 001 e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - Processo Nº 134136/2019-5, pelo suporte financeiro, através da concessão de bolsa.

Às minhas amigas Jacqueline Lepchak e Camila Galvan, que há anos me oferecem amizade sincera e apoio em todas as situações.

À Danielle Scotton pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pela paciência em ensinar e por toda a ajuda ao longo da realização dessa dissertação.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMP): Albania Patiño, Anieli Baldo, Bruna Factor, Daniele Paschoal, Eder da Silva, Gabriel Ragazzo, Laecio Sampaio, Larissa de Souza, Luciana Chiba, Luís Serezino, Rafael do Carmo e Rodolfo Maniero, pelo convívio diário, pelos auxílios, sugestões e críticas, pelos divertidos almoços no RUCAS e pela amizade.

Aos professores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) que contribuíram com a minha formação.

Aos técnicos Felipe Campana, Paulo Cassieri e Wlamir Godoy e a todos os funcionários do CENA, pelo auxílio nas várias fases deste trabalho.

Ao professor Dr. Rodrigo Latado, pelas valiosas sugestões e pela disponibilidade em ensinar e ajudar.

À Thaísa Tessutti e Perla Oliveira, pelo incentivo inicial que tornou tudo isso possível.

Ao meu cunhado Emerson Cruz, pela ajuda na realização de um importante experimento.

A todos os amigos que conquistei em Piracicaba, que tornaram essa jornada mais leve e feliz.

À Sininho, que esperou pacientemente o meu retorno, por todo esse tempo.

E a todos os não citados, que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço de todo meu coração.

*"Eu nasci naquelas terras onde o minuano assobia
Cevando a erva pro mate, chimarreando todo dia (...)
Gauderiando em outros pagos, mesmo assim nas veias trago
O sangue da tradição"*

Joel Marques

RESUMO

MORANDI, M. A. **Desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.)**. 2020. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma espécie de grande importância econômica e cultural para os estados do sul do Brasil, cujas folhas são utilizadas como matéria-prima para o preparo de bebidas estimulantes. Apesar da sua relevância econômica, há pouco progresso relativo ao melhoramento genético da erva-mate, e a produção de mudas ainda é feita via seminal, o que contribui para o estabelecimento de plantios com materiais de baixa produção e baixa qualidade no sabor. Além disso, as sementes desta espécie possuem dormência, tornando o processo de produção de mudas demorado. O objetivo desse trabalho foi estabelecer protocolos de germinação *in vitro* de sementes, bem como de cultivo de segmentos nodais, além de indução de calogênese, visando a embriogênese somática como forma de propagação de genótipos conhecidos. Para germinação das sementes, a dormência e contaminação das culturas consistem em importantes entraves. Portanto, foram testados protocolos de assepsia contendo hipoclorito de sódio (NaOCl), hipoclorito de cálcio (Ca(ClO)₂), suplementação do meio de cultura com o fungicida Midas BR[®] e o biocida PPM[®], e também, autoclavagem das sementes; suplementação do meio de cultura com água de coco, giberelina (GA₃), e a irradiação das sementes com raios gama, visando contribuir com a germinação. Nenhum tratamento testado favoreceu a germinação das sementes *in vitro*. Para o cultivo dos segmentos nodais, a contaminação de explantes também representa um obstáculo para o início das culturas. Foram realizados experimentos, utilizando NaOCl, Kasumin e adição de PPM[®] ao meio de cultura; para controlar a oxidação fenólica dos explantes foram avaliados os efeitos do ácido ascórbico, carvão ativado ou PVP; e avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com benziladenina (BA) e ácido naftaleno acético (ANA) para favorecer a brotação, alongamento e enraizamento de brotos. Houve sucesso no estabelecimento de cultivos, mas nenhum experimento culminou com explantes formando raízes, o que impossibilitou a manutenção *in vitro* a longo prazo. Com relação aos experimentos de calogênese foliar, foram realizados testes para determinar um protocolo de introdução,

avaliando o efeito das concentrações de NaOCl; posição do explante no meio de cultura; modo de recorte e tamanho dos explantes. Foram avaliadas as respostas dos explantes aos meios de cultivo empregados para a embriogênese somática de peças florais de cacaueteiro, além da influência dos hormônios vegetais 2,4-D, tiadiazuron, BA, ANA, GA₃, cinetina e zeatina, na sobrevivência e na indução de calos. O uso de NaOCl foi eficiente no controle da contaminação. Nenhum meio de cultura ou hormônio testado induziu a embriogênese somática, e nem mesmo a formação de brotações adventícias; além disso, os calos entraram em fase de declínio após 12 meses de manutenção *in vitro*. Contudo, houve a formação de diversas condições favoráveis, como calos contendo raízes, e calos com aspectos visuais promissores, como aparência friável e coloração esverdeada. Conclui-se que há a possibilidade de morfogênese a partir de explantes foliares.

Palavras-chave: Propagação vegetativa. Cultivo *in vitro*. Erva-mate.

ABSTRACT

MORANDI, M. A. **Development of *in vitro* Propagation Protocols of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.)**. 2020. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a species of great economic and cultural importance for the Southern states of Brazil. Yerba mate leaves are used as raw material for the preparation of stimulant beverages. Despite its economic relevance, little progress has been achieved in the genetic improvement of the crop, and propagation is still based on open-pollinated seeds, which contributes to the establishment of low-yielding and low-quality plantings. In addition, yerba mate seeds exhibit dormancy, turning the seedling production process lengthy. Thus, the objective of this work was to establish protocols for *in vitro* germination of seeds, cultivation of nodal segments, and induction of callogenesis for somatic embryogenesis. For seed germination, dormancy and contamination are important barriers. Therefore, disinfection protocols were tested using NaOCl, Ca(ClO)₂, supplementation of the culture medium with the fungicide Midas BR[®] or PPM[®], and autoclaving the seeds. In addition, supplementing the culture medium with coconut water, gibberellin GA₃, or irradiating the seeds with gamma rays were tested expecting to contribute to seed germination. None of the experiments favored seed germination *in vitro*. For the cultivation of nodal segments, contamination of explants also represented an obstacle to the establishment of the cultures. Experiments were carried out using NaOCl, Kasumin and the addition of PPM[®] to the culture medium; to control explant phenolic oxidation, the addition of ascorbic acid, activated carbon or polyvinylpyrrolidone (PVP) were evaluated; whereas supplementing the culture medium with plant hormones, such as benzyladenine (BA) or naphthalene acetic acid (NAA) to favor bud-breaking, elongation and rooting of shoots. Some successful cultures were established, but no experiment culminated in explants forming roots, which made long-term *in vitro* maintenance impossible. Regarding the callogenesis of leaf disks, tests were carried out to determine an introduction protocol, evaluating the effect of NaOCl concentrations; explant position in the culture medium; cutting mode and size of leaf explants. The explant responses to various culture media were evaluated, in addition

to the influence of the hormones 2,4-D, thiadiazuron, BA, NAA, GA₃, kinetin or zeatin, on survival and callus induction. The use of NaOCl was efficient in controlling contamination. No culture medium or hormone tested induced somatic embryogenesis, or the formation of adventitious buds. Callus declined after 12 months of *in vitro*. However, several favorable conditions were determined, that favored promising rooting calli, with promising visual aspects, such as friable appearance and greenish colour. It is concluded that there is a possibility of morphogenesis from leaf explants.

Keywords: Vegetative propagation. *In vitro* cultivation. Yerba mate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2-iP – N⁶ - (2-Isopentenil) adenina
AIB – Ácido indol-butírico
ANA – Ácido naftalenoacético
BA – N⁶-benziladenina
BOD – *Biochemical Oxygen Demand*
Ca(ClO)₂ – Hipoclorito de cálcio
DKW – Driver & Kuniyuki
ED – Meio de desenvolvimento de embriões
GA₃ – Ácido giberélico
KIN – Cinetina
MS – Murashige & Skoog
NaOCl – Hipoclorito de sódio
PCG – Meio primário de crescimento de calo
PPM[®] – *Plant Preservative Mixture*
PVP – Polivinilpirrolidona
SCG – Meio secundário de crescimento de calo
TDZ – Tidiazuron
Tween 20 – Polioxietileno sorbitan monolato
WPM – Wood Plant Medium

LISTA DE SÍMBOLOS

et al. – e outros

°C – Celsius

t/ha – Toneladas por hectare

μM – Micromolar

Atm – Atmosfera

min – Minuto

h – Hora

μmol m⁻² s⁻¹ – Micromol por metro quadrado por segundo

v – Volume

mL – Mililitro

g L⁻¹ – Grama por litro

p – Peso

mL L⁻¹ – Mililitro por litro

mg L⁻¹ – Miligrama por litro

rpm – Rotações por minuto

kGy – KiloGray

kGy h⁻¹ – KiloGray por hora

μL L⁻¹ – Microlitro por litro

cm² – Centímetro quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Biologia da espécie	23
2.2 A importância histórica e socioeconômica	26
2.3 O cultivo da erva-mate.....	28
2.4 A produção de mudas.....	32
2.5 Cultivo <i>in vitro</i>	36
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Germinação de sementes <i>in vitro</i>	42
4.1.1 Assepsia com hipoclorito de sódio (NaOCl)	43
4.1.2 Autoclavagem das sementes	43
4.1.3 Assepsia com hipoclorito de cálcio $Ca(ClO)_2$	43
4.1.4 Ruptura do tegumento das sementes.....	43
4.1.5 Meio de cultura suplementado com N ⁶ -benziladenina (BA).....	44
4.1.6 Adição de fungicida ao meio de cultura	44
4.1.7 Adição de água de coco ao meio de cultura	45
4.1.8 Adição de <i>Plant Preservative Mixture</i> (PPM [®]) (Plant Cell Technology, EUA) no meio de cultura	45
4.1.9 Adição de GA ₃ em meio de cultura líquido	45
4.1.10 Irradiação de raios gamas em sementes	46
4.2 Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodais para proliferação de gemas axilares..	46
4.2.1 Estabelecimento de segmentos nodais.....	47
4.2.2 Adição de PPM [®] no meio de cultura.....	47
4.2.3 Meio de cultura suplementado com 2iP e ANA.....	48
4.2.4 Adição de carvão ativado e de PVP ao meio de cultura	48
4.2.5 Utilização de ácido ascórbico, PVP e carvão ativado.....	48
4.2.6 Assepsia com NaOCl e PPM [®]	49
4.3 Pré-teste de indução de embriogênese somática.....	50

4.4	Calogênese foliar	50
4.4.1	Assepsia com concentrações crescentes de NaOCl	51
4.4.2	Posição do explante no meio de cultura	51
4.4.3	Modo de recorte dos explantes	52
4.4.4	Tamanho dos explantes.....	52
4.4.5	Introdução dos explantes em meios de cultura PCG, SCG e ED (Li et al., 1998).....	53
4.4.6	Introdução dos explantes em meios PCG e SCG com alteração de balanço hormonal	53
4.4.7	Meio gelificado com ágar.....	54
4.4.8	Introdução dos explantes em meios PCG e ED (Li et al., 1998) com balanço hormonal	54
4.4.9	Introdução em meios de cultura suplementados com cinetina ou zeatina.....	55
4.4.10	Introdução dos explantes em meio com alteração de balanço hormonal entre TDZ e 2,4-D	56
4.5	Análise estatística	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Germinação de sementes <i>in vitro</i>	58
5.1.1	Avaliação da influência de diferentes concentrações de NaOCl na assepsia das sementes	58
5.1.2	Efeito da autoclavagem das sementes no processo de germinação.....	59
5.1.3	Influência de Ca(ClO) ₂ na assepsia das sementes.....	60
5.1.4	Influência da ruptura no tegumento e do efeito de BA nos índices de germinação	60
5.1.5	Efeito da adição de fungicida ao meio de cultivo	61
5.1.6	Influência da adição de água de coco no meio de cultura.....	62
5.1.7	Efeito do meio de cultura suplementado com PPM®	63
5.1.8	Efeito do meio de cultura líquido suplementado com GA ₃	65
5.1.9	Influência da irradiação de raios gamas na germinação das sementes.....	66
5.2	Gemas Axilares.....	67
5.2.2	Efeito do PPM® no controle da contaminação no cultivo de segmentos nodais.....	69
5.2.3	Efeito da assepsia dos explantes com Kasumin e da suplementação do meio de cultura com 2 iP e ANA no estabelecimento dos segmentos nodais	69
5.2.4	Efeito do carvão ativado e do PVP como agentes antioxidantes	70

5.2.5	Efeito do ácido ascórbico, PVP e carvão ativado com antioxidantes.....	70
5.2.6	Efeito de NaOCl e de PPM® no controle da contaminação	74
5.3	Pré-teste com botões florais.....	79
5.4	Obtenção de calogênese através de explantes foliares	80
5.4.1	Efeito de diferentes concentrações de NaOCl na assepsia das folhas	81
5.4.2	Efeito da posição no meio de cultura, do modo de recorte e do tamanho dos explantes na sobrevivência e indução de calos <i>in vitro</i>	83
5.4.3	Respostas dos explantes foliares ao cultivo em meio PCG, SCG e ED.....	86
5.4.4	Efeito dos meios PCG e SCG com variação nos reguladores hormonais.....	89
5.4.5	Efeito do ágar como agente gelificante	91
5.4.6	Efeito dos meios PCG e ED com balanço dos reguladores hormonais.....	92
5.4.7	Influência de meios de cultura suplementados com cinetina ou zeatina e 2,4-D.....	98
5.4.8	Efeito do tempo de permanência em meio PCG e da variação dos reguladores hormonais	101
6.	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.; Aquifoliaceae) é uma planta de grande importância para a economia brasileira, e para a tradição cultural do Sul do país. A espécie ocorre naturalmente na Argentina, Brasil e Paraguai, sendo que mais de 80% da sua área de abrangência é em território brasileiro. Os estados brasileiros com maior concentração da espécie são Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Conhecida por ser uma planta rústica, que se desenvolve em matas sob araucárias, a erva-mate é o principal produto florestal não madeireiro da economia do Sul do Brasil, representando grande valor econômico, social e ecológico à região (Penteado Junior; Goulart, 2019).

As folhas da erva-mate são utilizadas para preparar bebidas típicas, como o chimarrão e o tererê, além de ser matéria prima para o popular 'chá mate'. Apesar de ser a principal fonte de renda de pequenos produtores da região sul, há poucos resultados de melhoramento e produção de mudas de qualidade superior desta espécie (Horbach, 2008). A principal forma de produção de mudas de erva-mate ainda é seminal, visto que é um método de baixo custo e de domínio dos produtores. Todavia, a produção seminal apresenta dificuldades em superar a dormência das sementes (Carvalho, 2003; Wendling; Brondani, 2015). Ainda, é sabido que a reprodução sexuada pode favorecer o estabelecimento de ervais desuniformes, de baixa produtividade e com consequências negativas no sabor do produto final.

A propagação vegetativa apresenta grande potencial para multiplicar matrizes previamente selecionadas e produzir mudas de qualidade elevada, além de contribuir com a conservação de germoplasma. A propagação assexuada está associada à reprodução fiel do genótipo da planta doadora do propágulo, e, portanto, não envolve os processos de meiose ou de fecundação, bem como recombinação genética. Embora muito vantajosos, não há métodos de propagação vegetativa de erva-mate suficientemente eficientes, sendo que o estabelecimento de novos cultivos ainda depende de sementes. Portanto, é estratégico investir nas técnicas de cultivo *in vitro*, que podem viabilizar a obtenção de um grande número de indivíduos em uma área e em espaço de tempo reduzidos, além de acelerar os programas de melhoramento de espécies perenes (Oliveira et al., 2013). Apesar dos esforços, existe uma carência de trabalhos com relação à erva-mate, e, até o momento, não há uma metodologia definida para cultivar a espécie *in vitro*.

O objetivo deste trabalho, portanto, foi buscar o desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* de erva-mate, por meio do cultivo de segmentos nodais e da técnica de calogênese foliar, necessária para obter embriogênese somática de forma indireta baseando-se em protocolos de outras plantas arbóreas estimulantes, visando contribuir para a resolução dos entraves descritos para a micropropagação da erva mate.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia da espécie

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil., Aquifoliaceae) é uma espécie nativa de Floresta Ombrófila Mista, sendo uma das principais fontes de renda de pequenos produtores dos estados do sul do Brasil. A espécie, ocorre em menor intensidade nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (Carvalho, 2003). Seu cultivo também tem destaque em outros países da América do Sul, como Paraguai e Argentina (Figura 1).



Figura 1. Mapa da ocorrência natural da erva-mate
Fonte: Erva Mate Catanduvás (2018)

O gênero *Ilex* apresenta cerca de 600 espécies largamente distribuídas pelas florestas de todo mundo, sendo 220 nativas da América do Sul, das quais 68 ocorrem no Brasil (Wendt, 2005; Daniel, 2009). Esse gênero compreende arbustos e árvores decíduas ou perenifólias com importância econômica de cultivo ou ornamental (Gottlieb et al., 2005). De todas as espécies desse gênero, a *Ilex paraguariensis* é a mais relevante na perspectiva econômica.

A erva-mate apresenta porte arbóreo, podendo atingir até 30 metros de altura, mas quando manejadas não passam de sete metros, de característica perene e com uma sobrevivência superior a 100 anos de idade (Santin, 2008; Mazuchowski, 1991).

As suas folhas são alternadas, simples, variando de subcoriáceas à coriáceas, com as bordas levemente serreadas (Daniel, 2009). O pecíolo é relativamente curto, medindo em torno de 15 mm de comprimento e a folha inteira mede, cerca de 8 a 10 cm de comprimento e 4 a 5 cm de largura (Mazuchowski, 1989).

As plantas são funcionalmente dioicas, com flores díclinas, com um dos sexos abortivo, ou seja, as flores femininas possuem estames inoperantes e as masculinas, possuem ovário rudimentar não funcional (Ferreira et al., 1983; Mazuchowski, 1989; Carvalho, 1994). Suas flores apresentam coloração branca e são relativamente pequenas, com quatro pétalas pedunculadas e dispostas na axila das folhas superiores (Figura 2A e B). O fruto é uma baga-dupla globular que mede de 6 a 8 mm e possui coloração verde quando imatura, tornando-se vermelho-arroxeadado na maturidade e contém, em média, quatro sementes no seu interior (Figura 2C) (Daniel, 2009). Após os frutos atingirem a maturação, apenas 1 % das sementes contém embriões desenvolvidos e aptos a germinação. Dos 99 % de embriões imaturos, cerca de 70 % encontram-se na fase de coração e 29 % na fase de torpedo (Niklas, 1987). As sementes são duras, de coloração amarelo-clara e apresentam dormência embrionária e tegumentar (Figura 2D) (Fowler; Sturion, 2000; Daniel, 2009; Wendling; Brondani, 2015). A germinação das sementes só acontece após a estratificação, o qual constitui no armazenamento das sementes em camadas de areia úmida por um período de 120 dias (Backes; Irgang, 2002).



Figura 2. Estruturas da planta. (A) Flores masculinas; (B) Flores femininas; (C) Frutos com aspecto maduro e (D) Sementes
 Fonte: Cerderva (2017)

A maturidade reprodutiva das plantas inicia-se normalmente aos cinco anos de idade. Nas condições brasileiras, a floração ocorre de setembro a dezembro e os frutos amadurecem de dezembro a março (Carvalho, 2003). Os principais agentes polinizadores são os insetos, principalmente as ordens Diptera, Hymenoptera, Coleoptera e Hemiptera, sendo as abelhas (*Apis mellifera*) os insetos que mais se destacam nessa função (Ferreira et al., 1983; Mazuchowski, 1989). A dispersão das sementes é feita por zoocoria, principalmente por pássaros, que consomem os frutos maduros e disseminam as sementes por meio das fezes (Mazuchowski, 1989; Carvalho, 2003). Existem, atualmente, 14 espécies de aves registradas como potencial dispersores de *Ilex paraguariensis*, sendo elas pertencentes às famílias Emberizidae, Tyrannidae, Muscicapidae, Mimidae e Pipridae (Colussi; Prestes, 2011).

A erva-mate é uma planta polimorfa (Figura 3), ou seja, que pode variar de forma, e por isso apresenta dificuldades quando se refere à sistemática, levando aos menos familiarizados com a cultura a separar novas espécies. As diferenças se referem ao tamanho, forma e consistência das folhas, e são atribuídas às variações edafoclimáticas, às reações das plantas às podas sucessivas e à condição nutricional da planta (Mattos, 1985; Santin et al., 2015).

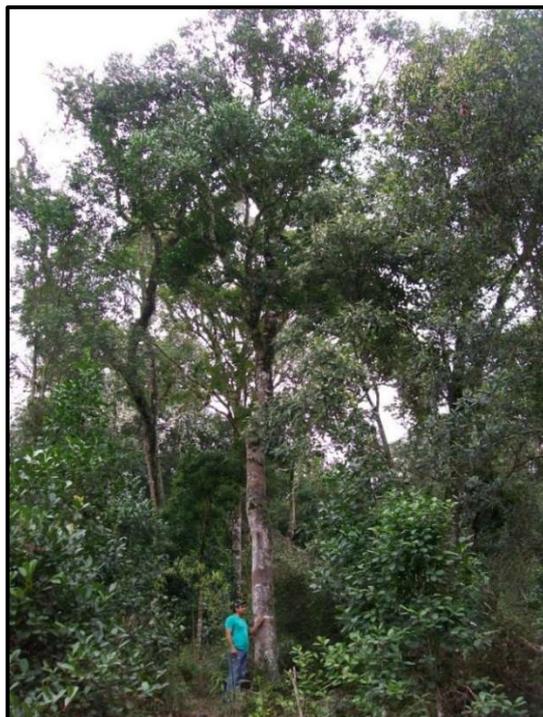


Figura 3. Árvore de erva-mate; matriz de sementes com aproximadamente 25 metros de altura e com idade superior a 90 anos

A espécie se desenvolve em climas predominantemente pluviais temperados, representados pela letra C, segundo a classificação de Köppen-Geiger, predominantemente nos climas Cfa e Cfb (Köppen, 1918). O clima Cfa é caracterizado por apresentar chuvas regulares e verões com temperatura média anual superior a 22°C, já o clima Cfb, difere-se do anterior apenas por apresentar uma temperatura média inferior a 22°C (Daniel, 2009). A erva-mate é tolerante a solos de baixa fertilidade e muito ácidos, além de tolerante a altos teores de alumínio e manganês (Carvalho, 2003; Benedetti, 2012; Santin et al., 2015). A espécie ocorre em solos com textura argilosa, com profundidade média a profunda, úmidos e bem drenados (Penteado Junior; Goulart, 2019). É importante ressaltar, que a erva-mate é uma planta muito resistente a solos degradados (Oliveira; Rotta, 1985).

2.2 A importância histórica e socioeconômica

As primeiras notícias concretas sobre o uso do mate datam de 1541. Nos documentos, cita-se uma bebida consumida pelos índios da nação guarani da região do Guaíra (oeste do Paraná). O colonizador espanhol atribuiu o vigor físico e a saúde dos índios à essa bebida desconhecida, chamada por eles de *Caa* (erva saborosa) e

Caa-I (água de erva saborosa). O hábito de consumo se generalizou, penetrando nos lares dos colonizadores europeus (Costa, 1995).

No início do século XVII houve um impulso da economia ervateira, quando os jesuítas perceberam o valor da planta e tornaram-se propagadores do consumo. Além de intensificar o comércio, eles passaram a promover o cultivo e buscaram aprimorar as técnicas silviculturais, de beneficiamento e armazenagem (Prat Kricun, 1990; Berkai; Braga, 2000). Com a expulsão dos jesuítas em 1767, a atividade voltou a ser realizada de forma extrativista, tendo como consequência, a decadência dos ervais e um atraso econômico para a cultura (Redig, 1985).

Cerca de cem anos depois, a existência de excelentes ervais nativos, e a facilidade de escoamento da produção através dos rios Paraná, Paraguai e da Prata, possibilitaram a volta do ciclo ervateiro e a erva-mate tornou-se absoluta na economia paranaense (Miranda; Urban, 1998; Lazier, 2004). Era a principal riqueza produzida e os setores econômico, social, político e cultural, giravam em torno do então “ouro verde” (Costa, 1995). O motivo da decadência da produção e da crise que encerrou o ciclo de ouro da produção ocorreu em meados de 1928, quando a Argentina, principal compradora da produção paranaense, passou a ser autossustentável e ainda conquistou os mercados chileno e uruguaio (Lazier, 2004).

A erva-mate teve um papel muito importante no desenvolvimento econômico dos estados do Sul do Brasil, principalmente do Paraná (Gerhardt, 2003). Constituiu-se até hoje de uma atividade muito rentável ao produtor rural, por ser uma cultura permanente e com colheitas geralmente programadas para a entressafra das culturas agrícolas anuais (Redig, 1985). Atualmente, o Paraná é o maior produtor brasileiro de erva-mate com 87,8 % da produção, seguido de Rio Grande do Sul com 6,3 % e Santa Catarina com 5,8 % (IBGE, 2018).

Cabe ressaltar, que além de aspecto econômico e financeiro, o mate é extremamente relevante a cultura regional. O hábito de consumo da infusão de água quente com erva-mate beneficiada, o chimarrão, pode ser considerada a forma de degustação de erva-mate mais disseminada no Brasil (Berté et al., 2006). O costume de sorver o chimarrão ou de “matear” é considerado mais que uma tradição propagada de geração em geração, sendo também um sinônimo de hospitalidade, capaz de aproximar pessoas e constituir relações sociais (Maccari Junior, 2005; Strachulski, 2016).

Hoje existe uma infinidade de usos industriais possíveis para a erva-mate, muito além do tradicional chimarrão, do tererê e do chá mate. Miranda e Urban (1998) destacam que a planta pode ser transformada em sucos, refrigerantes, corantes, sorvetes, chicletes, medicamentos, perfumes, desodorantes, cosméticos e sabonetes. Ainda, pode-se utilizar a erva-mate como conservante alimentar, bactericida hospitalar e doméstico, emulsificante e pode ser útil também, no tratamento de esgoto e na reciclagem do lixo urbano (Ferraz, 1995).

A erva-mate apresenta na sua composição química substâncias como: alcaloides (cafeína, teobromina, teofilina), substâncias tânicas, flavonoides, saponinas, vitaminas (A, C, B1, B2 e E) e minerais (ferro, fósforo, cálcio, magnésio, manganês e potássio), que tornam o mate uma bebida que age sobre o sistema cardiovascular, respiratório, trato gastrointestinal, além de potencializar as funções antirreumáticas, antioxidantes e diuréticas (Alikaridis, 1987; Berkai; Braga, 2000; Henrichs; Malavolta, 2001; Heck; Mejia, 2007). Estudos também demonstram que mate possui propriedades quimiopreventivas, que previnem danos celulares capazes de causar doenças crônicas e é capaz de reduzir o colesterol e de inibir a proliferação de células cancerígenas (Filip et al., 2007; Heck; Mejia, 2007; Morais et al., 2009). Mas talvez, um dos principais motivos de seu consumo, seja a ação estimulante sobre o sistema nervoso central, causada pela cafeína, que aumenta a atividade de alerta e reduz a fadiga (Ferreira, 1995; Daniel, 2009). Sabe-se ainda, que a ação estimulante provocada pela erva-mate é mais prolongada que a proporcionada pelo café, e não apresenta efeitos colaterais como irritabilidade e insônia (Berkai; Braga, 2000).

Todas essas utilidades e características funcionais ampliam as possibilidades de mercado para erva-mate, tanto no cenário econômico nacional, quanto no internacional.

2.3 O cultivo da erva-mate

Estima-se que o cultivo da erva-mate no Brasil abranja, aproximadamente, 72 mil hectares (FAO, 2020), localizados em mais de 480 municípios e distribuídos em cerca de 180 mil propriedades (Embrapa, 2019). A produção brasileira de erva-mate em 2018, foi de 546.618 toneladas, representando 57 % de toda a produção mundial, apesar de possuir menos da metade da área colhida da Argentina (FAO, 2020). Segundo o IBGE (2017), a produção brasileira de 2017 gerou um valor de R\$ 423,9 milhões, e com isso, a erva-mate é considerada a segunda atividade de

extração de produtos não madeireiros mais importantes do país, ficando atrás apenas do açaí, e a principal da região sul. Os principais países importadores dessa matéria-prima brasileira são Uruguai (87,9 %), Chile (3,8 %), Alemanha (2,7 %), Estados Unidos (2,5 %) e França (1,3 %) (MDIC, 2016).

A erva-mate é uma espécie que pode ser cultivada tanto em condições de sombra, quanto de sol. Sendo assim, o sistema de produção pode ser em monocultura, consórcio com cultivos agrícolas ou espécies florestais, ou à sombra em sub-bosque. Devido a essa condição de adaptação, a espécie permite um cultivo de forma direcionada, conforme a finalidade do produto (Santin et al., 2015).

Os ervais (nome dado aos plantios de erva-mate) se dividem em erval nativo, adensado ou plantado. O erval nativo é aquele que foi formado naturalmente e se constitui de um método extrativista. O produtor intervém apenas com roçadas da vegetação de pequeno porte e no momento da colheita. Já os ervais adensados, são áreas onde já existem ervais naturais, mas as plantas de erva-mate estão distribuídas de forma irregular e o plantio de novas mudas acontece nas clareiras de floresta nativa. Uma área de erva-mate plantada, constitui-se de um terreno sem erveiras (árvore já produtiva de erva-mate), em áreas antes utilizadas para lavoura ou pastagem ou áreas de capinzal (Berkai; Braga, 2000; Penteado Junior; Goulart, 2019).

A erva-mate pode ser cultivada em sistema agroflorestal, que consiste na combinação de cultivos simultâneos de espécies arbóreas com culturas anuais (Penteado Junior; Goulart, 2019). Esse sistema é comumente utilizado por pequenos agricultores, que derrubam a mata nativa para cultivar a terra, mas preservam as erveiras ali existentes. Nesse caso, a agricultura é o principal uso da terra e a erva-mate consiste em uma renda extra e variável (Baggio; Schreiner, 1985). Os sistemas agroflorestais de erva-mate podem ser realizados com associação a culturas como: milho, mandioca, feijão, trigo, soja e forrageiras (Medrado; Sturion, 2014). É importante ressaltar, que na maioria dos casos, utilizam-se culturas apenas de subsistência, com preparo mínimo de solo e baixa aplicação de insumos (Baggio; Schreiner, 1985).

Outra forma de cultivo que pode ser realizada é a inclusão de bovinos, caprinos e ovinos em ervais sob florestas naturais, que é conhecido como sistema silvipastoril. Baggio e Schreiner (1985) contudo, destacam que essa prática pode comprometer os ervais, com os danos mecânicos que os animais podem causar nas plantas adultas, além de pisotear as plantas pequenas, recomendando que a associação não

seja permanente e sim, em sistema de rotação e que os animais sejam introduzidos na área de produção a partir do quinto ano de idade das plantas.

Os ervais plantados em consórcio com espécies arbóreas nativas (Figura 4), também podem ser considerados um sistema agroflorestal e nesse caso, as árvores permitem aumentar a retenção de carbono e de água dos ervais (Baggio et al., 2008). O uso de espécies madeiráveis e frutíferas podem ser também, uma opção de renda extra ao produtor (Penteado Junior; Goulart, 2019). Baggio et al. (2008) citam algumas espécies recomendadas para esse tipo de sistema, como araucária, angico, canafístula e ipê-roxo ou amarelo.



Figura 4. Plantio de erva-mate consorciado com mata nativa

Santin et al. (2015) citam o estímulo da indústria do chimarrão em valorizar a matéria prima oriunda de ervais sombreados, por este material possuir características desejáveis para o comércio. Os preços das folhas oriundas de ervais sombreados são cerca de 30 % maiores que de ervais sob pleno sol (Penteado Junior; Goulart, 2019). Contudo, nesses ambientes sombreados, a produtividade pode ter uma redução superior a 75 % (Rachwal et al., 2002).

Além dessas formas de cultivo, existe o de sistema faxinal. Os faxinais são sistemas de cultivo da terra que se desenvolveram no Paraná e em Santa Catarina, onde não existem divisões cercadas demarcando as propriedades, pois são terras coletivas (Marques, 2014). Segundo Chang (1988), o sistema faxinalense se

caracteriza em três fenômenos: criação extensiva de animais em áreas comuns; extração florestal (erva-mate); e policultura alimentar em áreas protegidas do acesso animal. Ressalta-se que o cultivo da erva-mate é muito importante histórica, cultural e economicamente para esses sistemas, pois foi através da extração das folhas, que essas comunidades surgiram e se consolidaram (Marques, 2014).

Com relação ao manejo de pragas dos plantios, é importante destacar que apesar de 86 espécies de insetos terem sido identificados como fitófagos, poucos comprometem substancialmente a produção dos ervais (Grigoletti et al., 2006). A principal praga da erva-mate é o *Hedypathes betulinus*, conhecido como “corintiano”; as larvas desse besouro constroem galerias no tronco da erva, prejudicando a circulação da seiva, comprometendo o desenvolvimento da planta e podendo acarretar na sua morte (Grigoletti et al., 2006). A segunda praga mais danosa aos plantios é a “ampola-da-erva-mate”, cujo inseto deposita os ovos junto à nervura central das folhas, causando a deformação das mesmas, que se fecham em formato de ampola e caem ao final do ciclo do inseto (Iede; Machado, 1989). Entre os insetos-pragas, destacam-se também as lagartas, que são capazes de comprometer a produção do erval, se alimentando tanto dos brotos quanto das folhas mais velhas. Ainda cabe citar, a ocorrência de cochonilhas-de-cera e os ácaros, que debilitam a erva, reduzem o crescimento e podem provocar a morte da planta (Penteado Junior; Goulart, 2019).

Se tratando de doenças, os maiores problemas enfrentados pela espécie, ocorrem ainda no viveiro, como podridão das raízes, tombamento das plantas e manchas nas folhas (Penteado Junior; Goulart, 2019). O tombamento das mudas (*damping off*) é a principal doença nos viveiros, e ocorre na fase de pré ou pós emergência das plântulas, resultando na não germinação das sementes ou no estrangulamento da plântula na região do coleto, provocando seu tombamento (Grigoletti et al., 2006). Os principais fungos associados à essa doença são: *Botrytis* sp., *Cylindrocladium spathulatum*, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Pythium* sp (Penteado Junior; Goulart, 2019). A campo, a principal doença da cultura é a “mancha da folha”, também conhecida como “pinta-preta”, onde o fungo *Cylindrocladium spathulatum* provoca lesões nas folhas e ocasiona a sua queda prematura (Grigoletti et al., 2006). A “pinta preta” ocorre em viveiros também e pode provocar até 30% de perda de mudas. Para a maioria das doenças da erva-mate não existe um controle químico específico ou produtos recomendados para a cultura por parte do

Ministério da Agricultura (Daniel, 2009; Brasil, 2020). É importante destacar, que as folhas são consumidas quase *in natura* e o uso indiscriminado de defensivos químicos podem causar transtornos à saúde humana.

Outro fato relevante no cultivo da erva-mate é a planta apresentar diferentes morfotipos. Reisseman et al. (2003) descreveram três morfotipos: amarelinha, cinza e sassafrás. O morfotipo amarelinha caracteriza-se por apresentar folhas com uma tonalidade mais clara na região do limbo e as nervuras principais e secundárias em tonalidade amarela. O morfotipo cinza apresenta folhas com uma tonalidade cinza-esverdeada, e as nervuras não tão amareladas como o morfotipo anterior. Já o sassafrás, são plantas com o limbo verde escuro e as nervuras em um tom mais claro, além de um aspecto brilhante na face adaxial da folha. Wendling et al. (2016) descreveram mais três morfotipos. O morfotipo verde-escuro, com folhas em um tom intenso de verde, mas sem possuir o brilho da face adaxial, como a sassafrás. O morfotipo verde-opaco, que apresenta esse tom nas folhas, não possuindo um aspecto brilhante e por último, o morfotipo peludinha, que possui aspecto piloso na face adaxial da folha. Santin et al. (2015) ressaltam que além das diferenças de morfologia foliar, os morfotipos se diferenciam também em termos de composição química, como na quantidade de cafeína, teobromina, taninos e clorofila.

A produção de ervais plantados e manejados com as técnicas adequadas se inicia entre o terceiro e o quinto ano de plantio, e nestas condições, a poda de colheita pode ser repetida a cada 18 meses (Embrapa, 2019). A produtividade média de material fresco dos ervais plantados é considerada baixa, de cerca de 8,5 t/ha (IBGE, 2015), enquanto em áreas de pesquisa, esse valor pode ser superior a 18 t/ha (Santin et al., 2014). A produção de erva-mate no Brasil é de caráter extrativista, e possui pouco aporte tecnológico. Penteado Junior e Goulart (2019) relatam que a qualidade genética das mudas, aspectos de proteção vegetal, nutrição, época de colheita e podas bem executadas, são características que geralmente não são levadas em consideração pelo produtor.

2.4 A produção de mudas

A produção de mudas de erva-mate é habitualmente derivada de sementes, devido à maior facilidade de produção, ao maior conhecimento dos produtores sobre essa técnica, à necessidade de estruturas mais baratas e ao menor custo de produção em relação à propagação vegetativa (Wendling; Brondani, 2015). A variabilidade

genética presente entre as mudas produzidas pelo método sexuado pode ocasionar uma maior amplitude adaptativa a determinados genótipos da nova geração, porém menor qualidade e uniformidade nas mudas produzidas (Xavier et al., 2013). Essa diversidade genética também é responsável por causar um maior potencial de reação às plantas contra o ataque de pragas, doenças e alterações do meio, havendo assim, uma redução no risco de perda dos plantios (Daniel, 2009).

Como as principais desvantagens da produção via sexuada, têm-se a dificuldade na quebra de dormência das sementes, a germinação desuniforme e o longo período para a produção de mudas (Sturion, 1988; Wendling; Brondani, 2015). A produção de mudas de erva-mate (Figura 5) é uma atividade demorada, devido à necessidade de superar a dormência das sementes. Dessa forma, o período necessário de preparação das mudas para estarem aptas ao plantio requer até 18 meses (Daniel, 2009).



Figura 5. Mudanças de erva-mate aptas para o plantio a campo

Estima-se que 15 milhões de mudas de erva-mate são produzidas anualmente na região Sul a partir de sementes colhidas sem critério de seleção, e como consequência, os ervais manifestam um desenvolvimento desuniforme, com reflexos negativos na qualidade do produto final e na produtividade do erval (Wendt, 2005). Desta forma, a obtenção de mudas por propagação vegetativa a partir de indivíduos geneticamente superiores, poderia reduzir e até eliminar esses problemas.

Os programas de melhoramento de erva-mate tiveram início na Argentina, em 1970 (Prat Kricun; Belingheri, 1995). No Brasil, o melhoramento é mais recente, sendo desenvolvido pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina) e Embrapa Florestas, com seleção de progênies, indivíduos e clones (Resende et al., 2000). Inicialmente, o parâmetro utilizado para esses programas era a produção de massa foliar. Mas o aumento do consumo de erva-mate, nos mercados interno e externo motivou novos plantios e despertou o interesse dos melhoristas em associar outras características para obtenção de material geneticamente superior (Wendt, 2005). As variáveis silviculturais que passaram a ser consideradas incluem resistência a pragas e doenças, desfolhamento, tipo de ramo, adaptação da planta à campo e ainda composição química, que tem relação direta com o sabor do produto final (Donaduzzi et al., 2000; Sturion et al., 2017).

Além desses programas, há outros três grupos de pesquisas brasileiros compostos por UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – RS), EPAGRI, Embrapa Florestas e além do INTA (Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária) da Argentina, envolvidos na formação de bancos de germoplasma (Sturion; Resende, 2001; Wendt, 2005). Resende et al. (2000) destacam a grande variabilidade genética presente entre as populações de erva-mate, em função da amplitude da área de distribuição da espécie. E ainda, as diferenças fenotípicas e morfológicas existentes em cada população devem ser adequadamente utilizadas em benefício da conservação e do melhoramento genético da espécie (Sturion; Resende, 2001). Além disso, a fragmentação e o desmatamento intensivo do ecossistema de ocorrência natural da *I. paraguariensis* faz com que a conservação dos recursos genéticos da espécie, sejam prioritários (Resende et al., 1997).

A propagação vegetativa, que se baseia na predisposição que algumas estruturas vegetativas possuem de formar um novo indivíduo (Wendling et al., 2005), possibilita o estabelecimento de um plantio uniforme, trazendo conseqüentemente uma maior produtividade e uniformidade de crescimento (Quadros, 2009). Outra vantagem constitui-se na obtenção de um grande número de indivíduos, em espaço de tempo reduzido (Eldrige et al., 1994). A escolha da técnica adotada na clonagem de árvores deve considerar fatores como custos, recursos físicos, a habilidade do executor e condições ambientais (Wendling et al., 2005). Porém, o sucesso da propagação vegetativa é dependente das condições fisiológicas da planta-mãe,

do tamanho e do tipo do propágulo utilizado, do armazenamento e da hora da coleta do propágulo, do meio de enraizamento e dos produtos químicos utilizados (Wendling et al., 2010; Brondani et al., 2012; Xavier et al., 2013).

Os métodos possíveis de propagação vegetativa de erva-mate são a estaquia, enxertia, miniestaquia e micropropagação (Daniel, 2009), com diversos graus de sucesso e eficiência. A técnica de estaquia consiste em promover o enraizamento de partes da planta, podendo ser ramos, raízes, galhos, caule ou folhas, produzindo mudas com as mesmas características genéticas da planta matriz (Daniel, 2009; Wendling; Brondani, 2015). A estaquia é a técnica com maior viabilidade econômica para o estabelecimento de plantios clonais e vem sendo estudada em erva-mate desde 1930 (Paiva; Gomes, 1995; Prat Krikun, 1995). No cenário atual, a técnica da estaquia se encontra bem desenvolvida, mas com baixos índices de enraizamento, devido a variação de comportamento dentro da espécie, que inviabiliza o uso dessa técnica em escala comercial (Wendling; Brondani, 2015).

Já a técnica de miniestaquia, utiliza como fonte de propágulo as brotações de mudas propagadas por estaquia ou seminais e é a técnica mais difundida entre as médias e grandes empresas que produzem mudas clonais de *Eucalyptus* sp. (Wendling et al., 2010; Xavier et al., 2013). Para erva-mate, essa técnica mostrou maiores índices de enraizamento quando comparada à estaquia tradicional (Wendling; Dutra; Grossi, 2007), além apresentar bons índices de sobrevivência, bom crescimento e alta produtividade à campo (Santin et al., 2015). A produção de mudas por miniestaquia já começou a ser aplicada em escala comercial nos viveiros comerciais, sendo uma grande oportunidade para o momento (Wendling; Brondani, 2015). Cabe ainda, ressaltar, que já existem quatro cultivares de erva-mate registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento propagadas por miniestaquia. São elas BRS 408 e BRS 409 (Embrapa); BRS BLD Aupaba e BRS BLD Yari (Baldo S/A e Embrapa) (Wendling et al., 2017; Wendling; Sturion; Santin, 2017).

A enxertia é a união de partes de uma planta com outra que lhe sirva de suporte, onde as duas plantas passam a constituir vegetativamente, apenas uma (Hartmann et al., 2011; Xavier et al., 2013). Essa técnica pode ser empregada para diversos objetivos, como perpetuação de clones; obtenção de floração e frutificação precoces; resistência a doenças e pragas em função do porta-enxerto; formação de pomares de sementes; restauração de plantas com substituição da copa; transformação de plantas estéreis em produtivas; resgate vegetativo de genótipos

selecionados; rejuvenescimento de clones e outras (Xavier et al., 2013). O primeiro trabalho com erva-mate foi publicado por Niklas (1990) que não obteve sucesso com a técnica de borbulhia, mas apresentou 80% de pegamento com a técnica de garfagem, índice que se repetiu no trabalho de Oliszeski e Neiverth (2002), que testaram também o método de mergulhia (obtendo 50% de sobrevivência). Wendling e Brondani (2015) destacam que outros estudos posteriores confirmaram que o método de garfagem é o mais efetivo para erva-mate.

As técnicas de cultivo *in vitro* oferecem então, uma forma de substituir as técnicas que não são suficientemente eficientes, além de possuir um grande potencial para o uso futuro e de ser útil no resgate de material de grande valor econômico.

2.5 Cultivo *in vitro*

Considera-se que todas as células vivas de uma planta possuem autonomia potencial de regenerar outra planta, quando submetidas a tratamentos adequados (Kerbauy, 1999). Sendo então, a cultura de tecidos vegetais a expressão utilizada para designar a cultura *in vitro* de células, tecidos vegetais ou de partes de órgãos diferenciados da planta em um meio nutritivo adequado e em condições controladas (Trevizan, 2005; George et al., 2008). Essas condições controladas incluem assepsia, controle de luminosidade, temperatura, umidade, pH e uso de meios de cultura artificiais, suplementados com reguladores de crescimento e nutrientes, que somados, dirigem o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado (Hartmann et al., 2002; Carvalho; Vidal, 2003). Essa técnica viabiliza a obtenção de muitos indivíduos, em uma área reduzida e em um curto espaço de tempo, possibilitando uma alternativa para a propagação de genótipos superiores, além de permitir acelerar programas de melhoramento de espécies perenes (Oliveira et al., 2013) e de conservação de germoplasma. O cultivo *in vitro* de plantas pode ser conduzido de três maneiras, conforme o explante utilizado: multiplicação por proliferação de gemas axilares; multiplicação por indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta; e multiplicação via embriogênese somática (Torres et al., 1998).

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares tem sido utilizada para propagar espécies lenhosas (Xavier et al., 2007). A proliferação de gemas ocorre, especificamente, em órgãos meristemáticos, os quais são estimulados com a aplicação de fitorreguladores no meio de cultura, originando novas partes aéreas ou tufo de brotos. Este sistema oferece uma grande fidelidade genética do material

originado, com uma taxa de propagação consideravelmente alta, além de ser um sistema mais facilmente controlado (Torres et al., 1998; Xavier et al., 2007). A micropropagação é dividida em quatro estágios: o estágio I que consiste no estabelecimento do explante no meio de cultura; estágio II onde ocorre a multiplicação e indução dos brotos; estágio III com formação de raízes e estágio IV que é a aclimatização das plantas em condição *ex vitro* (Murashige, 1974; Hartmann et al., 2002). É importante ressaltar, que para haver sucesso na técnica, é importante que todas essas etapas sejam eficientemente cumpridas.

Para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva por organogênese ou embriogênese somática indireta, é necessária a etapa de calogênese. A indução de calos ocorre com a introdução de explantes originados de qualquer parte da planta, em um meio de cultura adequado e com o estímulo de fitorreguladores. Nesse processo, o explante gera um novo tecido composto por células meristemáticas não diferenciadas, denominado calo (Degenhardt-Goldbach et al., 2011). Durante a multiplicação celular desse calo, podem surgir células especializadas, que são capazes de iniciar a formação de órgãos, como raízes, brotos com um meristema direcional, ou embriões somáticos que possuem meristemas opostos (apical e radicular) (George et al., 2008).

O cultivo *in vitro* de plantas apresenta algumas limitações e desvantagens. Entre as desvantagens estão a necessidade de uma infraestrutura de laboratório e de mão-de-obra especializada, a alta possibilidade de contaminação, a complexidade de encontrar o meio adequado para a espécie em questão (George et al., 2008). Além disso, existe uma carência de trabalhos e desenvolvimento de protocolos, em vista ao elevado número de espécies florestais (Oliveira et al., 2013). Ainda, a variabilidade genética intraespecífica, exige um ajuste de metodologia, que torna o processo demorado e oneroso (Wendling; Dutra; Grossi, 2006).

O potencial das técnicas de cultura *in vitro* para o melhoramento de *Ilex* spp. é amplamente discutido, contudo, a variação entre as mais de 500 espécies que o gênero possui, exige protocolos de micropropagação específicos para cada uma (Hansek et al., 2006). Apesar dos esforços, ainda não existem metodologias eficientes e aplicáveis em larga escala para erva-mate (Sansberro et al., 2000).

Um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de propagação *in vitro* de genótipos de erva-mate consiste nos elevados índices de contaminação durante o estabelecimento dos explantes (Wendling; Brondani, 2015).

Explantes de árvores adultas de erva-mate não são adequados para a cultura *in vitro*, devido à alta taxa de contaminação e recalcitrância (Rey; Mroginski, 1988). É possível estabelecer propágulos de plantas com menos de dois anos de idade, mantidas em condições de casa de vegetação com manejo fitossanitário adequado, mas o percentual de enraizamento é consideravelmente baixo, o que acaba inviabilizando o método (Mroginski et al., 1997). Ainda, há influência da época do ano em que se obtém os explantes para estabelecimento *in vitro*. Os explantes cultivados no inverno apresentam menor contaminação por bactéria e maior taxa de sobrevivência (57%) (Rosa et al., 2006).

Sansberro et al. (1999) obtiveram maior taxa de multiplicação de brotações de erva-mate após seis meses de subcultivos em meio de cultura contendo $\frac{1}{4}$ de sais MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 4,4 μM de BA (N^6 -benziladenina). Já Zaniolo e Zanette (2001) observaram uma maior taxa de multiplicação de gemas axilares após três subcultivos em meio WPM (Lloyd; McCown, 1980) suplementado com 8,9 μM de BA. Dutra e Silva (2009) não verificaram diferença significativa entre os meios de cultura MS, $\frac{1}{4}$ MS, WPM e B5 no estabelecimento dos segmentos nodais, além de apresentarem apenas 5,25 % de sobrevivência, devido à alta taxa de contaminação. Horbach et al. (2011) encontraram um maior número e comprimento de brotações adventícias utilizando o meio $\frac{1}{4}$ MS acrescido de 8,9 μM de BA. Griebeler et al. (2014) ao comparar meio de cultura MS e WPM, observaram que o meio MS com metade das concentrações dos sais, foi estatisticamente superior e que a adição de 8,9 μM de BA e 0,5 μM de ANA (ácido naftaleno acético) foi responsável por produzir mais brotos e maior produção foliar. Todos esses trabalhos, além de apresentarem resultados divergentes, não determinaram um protocolo reprodutível e suficientemente eficaz. Com relação a fase de enraizamento, que é limitante ao sucesso da micropropagação, ainda é necessário o desenvolvimento de estudos que aperfeiçoem essa etapa (Wendling; Brondani, 2015).

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de erva-mate, é uma prática utilizada para contornar a dormência das sementes e obter a micropropagação via embriogênese direta (Horbach et al., 2011), além de ser aplicável para a criopreservação do gênero *Ilex* (Mroginski et al., 2011). Entretanto a excisão de embriões seguindo o protocolo de Hu (1989) pode ser considerado um procedimento complexo e demorado devido ao tamanho das sementes, e que pode gerar danos aos embriões frágeis (Sansberro et al., 1998). Em torno de 20 % de embriões

de erva-mate converteram-se em plântulas em meio de cultura ¼ MS sem adição de citocininas; esse número passou para aproximadamente 50 %, quando o meio foi suplementado com 0,45 µM de zeatina, e quando suplementado com 0,99 µM TDZ a taxa de conversão foi 30 %; contudo, as plântulas apresentaram desenvolvimento anormal das folhas e supressão do crescimento radicular (Sansberro et al., 1998). Mrogisnki et al. (2011), em revisão sobre o tema, concluíram que o máximo de embriões zigóticos de *I. paraguayensis* convertidos em plântulas já obtido é de 60%. Tais valores diferem muito das taxas de germinação de outras espécies do gênero *Ilex*. *I. argentina*, *I. theezans* e *I. brasiliensis* apresentaram conversão de embriões em plântulas de 97, 96 e 82% respectivamente, quando cultivados em meio ¼ MS suplementado com zeatina (Sansberro et al., 2001). Esses valores demonstram, que apesar de ser uma técnica alternativa e replicável, ainda não é eficaz o suficiente para erva-mate, além de ser pouco prática, justificando a busca de outros métodos para superar a dormência e obter a germinação das sementes.

Quanto à indução de calogênese de erva-mate, a utilização dos hormônios zeatina e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxi acético) em meio composto por ¼ de sais MS se mostrou eficaz para a formação de calos a partir de explantes foliares; porém, não foi obtido um balanço hormonal propício ao desenvolvimento de embriões somáticos (Degenhardt-Goldbach et al., 2011). A concentração de 4,52 µM de 2,4-D foi descrita como a ideal para obter uma maior porcentagem de formação de calos de aspecto friável, e acima disso, pode inibir a formação dos mesmos (Stachevski; Degenhardt, 2011). Com relação à indução de raízes adventícias nos calos, os meios MS com adição de 24,6 µM de AIB (ácido indol-butírico) e WPM suplementado com zeatina e 2,4-D se mostraram eficientes (Comiran et al., 2011; Stachevski et al., 2013). Entretanto, nenhum desses meios propiciaram a formação de brotações adventícias.

Esses trabalhos realizados evidenciam a recalcitrância da espécie para ser propagada *in vitro*, além da notória necessidade de um protocolo padrão e funcional. Como forma de superar os entraves, foram buscadas referências em trabalhos de outras espécies arbóreas tropicais, como cacaueteiro (*Theobroma cacao*) e cafeeiro (*Coffea arabica*) que apresentam características semelhantes à erva-mate, como o fato de serem espécies lenhosas, terem tendência à oxidação devido a presença de substâncias fenólicas e serem recalcitrantes ao cultivo *in vitro* (Oliveira et al., 2013).

No cacau, a produção de mudas via embriogênese somática começou a ser desenvolvida na década de 1970 a partir de embriões zigóticos, e possui atualmente protocolos bastante eficientes e responsivos empregando tecidos esporofíticos (Teixeira et al., 2002). O protocolo do cacaueteiro utiliza estaminóides e pétalas de botões florais fechados como explante inicial, e a combinação de 2,4-D e tidiazuron (TDZ) no meio de cultura inicial, propicia uma taxa de embriogênese aceitável (Li et al., 1998; Maximova et al., 2002; Teixeira et al., 2002).

Com relação ao cafeeiro, os primeiros trabalhos de embriogênese somática foram realizados em 1970 e o gênero possui duas estratégias determinantes: cultivar os explantes foliares em um único meio de cultura, suplementado com a combinação de auxina e citocinina, ou cultivar os explantes em um meio primário (de indução), seguindo para um meio secundário (de diferenciação) que possui menor proporção entre auxina e citocinina (Starisky, 1970; Pierson et al., 1983; Dublin, 1984; Noriega; Sondahl, 1993). Quanto aos hormônios utilizados nos meios de cultura, 2,4-D e cinetina combinados em proporção 2:1 resultaram numa formação de 80,5% de calos primários em explantes foliares e o uso de BA (13,32 μM) foi responsável por uma maior formação de embriões em calos embriogênicos friáveis (Maciel et al., 2003). Esses protocolos foram aplicados no presente trabalho, buscando uma adaptação eficiente a *Ilex paraguariensis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer protocolos de cultivo *in vitro* de erva-mate por meio de cultivo de segmentos nodais e da técnica de calogênese foliar, visando contribuir na resolução de entraves descritos por outros autores.

3.2 Objetivos específicos

- Definir um método eficiente de assepsia para os explantes no estabelecimento *in vitro* para erva-mate;
- Obter a germinação das sementes *in vitro*;
- Estabelecer um método eficaz para o controle da oxidação dos explantes *in vitro*;
- Determinar os melhores procedimentos iniciais do protocolo de introdução de explantes foliares *in vitro*;
- Definir as melhores combinações de reguladores de crescimento na composição do meio de cultura para os processos de introdução de segmentos nodais e de explantes foliares;
- Estabelecer um método de manutenção dos explantes *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) em Piracicaba, São Paulo.

4.1 Germinação de sementes *in vitro*

Foram realizados testes a fim de superar a dormência tegumentar das sementes visando obter plântulas *in vitro*. As sementes foram cedidas por um viveiro florestal localizado no município de São Mateus do Sul, PR, sendo elas provenientes de uma Área de Coleta de Sementes (ACS). Os frutos já haviam sido submetidos ao processo de beneficiamento. Esse processo foi constituído na separação dos frutos das sementes, através de ruptura mecânica sob água corrente e com o auxílio de uma peneira. Os frutos foram coletados com base nas características da planta-mãe, onde a matriz selecionada resulta em um produto de alta qualidade para o consumo, especificamente para utilização em bebidas e infusões.

O meio de cultura de todos os experimentos teve o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e da adição do agente geleificante. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,1 atm de pressão, por 20 min. As sementes foram transferidas para meio fresco a cada 30 dias.

Nos experimentos em que a desinfestação foi realizada com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), foram utilizadas soluções diluídas em diversas concentrações de água sanitária comercial com 2,5 % de cloro ativo.

Os experimentos que foram mantidos no escuro, permaneceram em incubadoras BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, enquanto os que foram conduzidos em condições de luz, foram mantidos em sala de crescimento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz branca fria, obtendo-se aproximadamente $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os tubos de ensaio e as placas utilizados, foram vedados com duas camadas de filme plástico de PVC.

Nas avaliações, foi observada a presença de germinação e de agentes contaminantes nas sementes.

4.1.1 Assepsia com hipoclorito de sódio (NaOCl)

Para o estabelecimento *in vitro*, as sementes foram imersas em água destilada por 24 h, objetivando uma reidratação e em seguida, submetidas à desinfestação por meio da imersão em etanol 70 % (v/v) por 1 min, seguido da imersão em solução aquosa de NaOCl comercial diluída nas concentrações de 0,3; 0,4; 0,5 ou 0,6 %, com variação de tempo (30, 40 ou 50 min), sob agitação constante. Após, as sementes foram submetidas a cinco enxágues com água destilada estéril e dentro do fluxo laminar, introduzidas inteiras, em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 25 mL de meio de cultura, o qual foi constituído de meio com $\frac{1}{4}$ da concentração dos sais MS, acrescidos de sacarose (30 g L^{-1}) e ágar (7 g L^{-1}), e sem adição de hormônios vegetais. Foram utilizadas 5 placas por tratamento, com 20 sementes por placa. As culturas foram mantidas no escuro e a avaliação foi realizada após 30 dias.

4.1.2 Autoclavagem das sementes

As sementes foram autoclavadas por 18 min. Após a autoclavagem, as mesmas foram introduzidas em placas de Petri contendo 25 mL de água e ágar (7 g L^{-1}), em condições assépticas. Foram utilizadas 20 placas, sendo 20 sementes em cada. Todas as placas foram mantidas no escuro por 7 dias e após esse período, metade delas foi transferida para condição de fotoperíodo, e a outra metade permaneceu no escuro. A avaliação foi realizada após 21 dias.

4.1.3 Assepsia com hipoclorito de cálcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

As sementes foram imersas em etanol 70% (v/v) por 5 min e logo após, o álcool descartado, as sementes foram imersas em $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (1 ou 2,5 % p/v) com duas variações de período (10 ou 20 min), sob agitação constante. Após o tempo de imersão, as sementes foram enxaguadas 5 vezes com água destilada e estéril e introduzidas em placas de Petri contendo água e ágar (7 g L^{-1}). O experimento consistiu de cinco placas por tratamento, contendo 20 sementes por placas. As sementes foram mantidas no escuro, e a avaliação foi realizada com 30 dias.

4.1.4 Ruptura do tegumento das sementes

As sementes foram imersas em etanol 70 % (v/v) por 2 min, logo após transferidas para solução aquosa de NaOCl comercial, na diluição de 0,25 %, por 40 min e depois enxaguadas cinco vezes com água destilada estéril. Dentro do fluxo

laminar, as sementes foram cortadas transversalmente, com o auxílio de um bisturi, buscando facilitar a germinação do embrião com essa ruptura do tegumento. Após o corte, as sementes foram introduzidas em frascos contendo 30 mL de meio MS, $\frac{1}{4}$ dos sais e ágar (7 g L^{-1}). Não foi adicionada nenhuma fonte de açúcar ao meio. O experimento consistiu de 15 frascos, com 5 sementes em cada frasco. Estes foram mantidos no escuro, por 60 dias, quando ocorreu a avaliação.

4.1.5 Meio de cultura suplementado com N⁶-benziladenina (BA)

As sementes foram imersas em água destilada por 24 h. Após esse processo, elas foram desinfestadas pela imersão em etanol 70 % (v/v) por 1 min e em seguida, transferidas para uma solução aquosa na diluição de 0,25 % de NaOCl comercial por 60 min, sob agitação constante. Após a desinfestação, as sementes foram transferidas para papel filtro estéril, receberam um corte transversal para romper o tegumento e foram introduzidas em tubos de ensaio contendo 15 mL de água e ágar (7 g L^{-1}). O experimento consistiu de 40 tubos de ensaio (15 x 100 mm), cada um contendo uma semente. Os tubos foram mantidos no escuro. Após 30 dias, as sementes que não apresentaram contaminação fúngica, foram transferidas para tubos contendo meio $\frac{1}{4}$ de sais MS, com adição de $0,044 \mu\text{M}$ de BA e ágar (7 g L^{-1}). Os tubos foram mantidos no escuro por 90 dias, quando foi realizada a avaliação.

4.1.6 Adição de fungicida ao meio de cultura

As sementes ficaram imersas por 24 h em água destilada e então, passaram pelo processo de desinfestação que consistiu em dois min imersas em etanol 70 % (v/v) e posteriormente, 40 min imersas em solução aquosa na diluição de 0,25 % de NaOCl comercial. As sementes foram então, enxaguadas cinco vezes com água destilada e estéril e receberam um corte transversal no tegumento. As sementes foram introduzidas em placas de Petri contendo sais e vitaminas MS e adição do fungicida e bactericida Midas BR[®] (Du Pont do Brasil S.A., Brasil) nas concentrações de 2, 5 ou 8 g L^{-1} e ágar (7 g L^{-1}). O fungicida foi adicionado ao meio antes da autoclavagem. O experimento consistiu de 5 placas por tratamento, com 20 sementes em cada. As placas foram mantidas no escuro, e a avaliação foi realizada aos 90 dias.

4.1.7 Adição de água de coco ao meio de cultura

As sementes passaram por um processo de desinfestação pela imersão em solução de 1 g L^{-1} do fungicida Cerconil (Iharabras S.A Indústrias Químicas, Brasil) por cinco min, e posteriormente, foram imersas em uma solução aquosa na diluição de 0,25 % de NaOCl comercial por 40 min. As sementes receberam 5 enxágues consecutivos com água destilada estéril, e com o auxílio de um bisturi, receberam um corte transversal, rompendo o tegumento. Foram então introduzidas em placas de Petri contendo água e ágar (7 g L^{-1}), suplementadas com água de coco Kero Coco® (0, 50, 100, 150 ou 200 mL L^{-1}), adicionada antes da autoclavagem. O experimento consistiu de 4 placas por tratamento, com 10 sementes em cada. Duas placas de cada tratamento permaneceram no escuro e duas placas foram transferidas para condição de fotoperíodo. A avaliação foi realizada após 60 dias.

4.1.8 Adição de *Plant Preservative Mixture* (PPM®) (Plant Cell Technology, EUA) no meio de cultura

As sementes passaram pelo processo de desinfestação, que consistiu em imersão em etanol 70 % (v/v) por um min e posterior imersão em solução 1 % de NaOCl comercial, com adição de 10 gotas do agente surfactante Tween 20 por 10 min sob agitação constante. Após o enxágue com água destilada estéril, as sementes foram introduzidas inteiras em tubos de ensaio contendo meio WPM com adição de sacarose (30 g L^{-1}), PPM® (0, 100, 200 ou $300 \mu\text{L L}^{-1}$) e Phytigel (2 g L^{-1}). O experimento consistiu de 12 tubos por tratamento, contendo uma semente por tubo e os mesmos permaneceram no escuro. Após 45 dias da introdução, as sementes que não apresentaram contaminação, foram transferidas para tubos contendo meio de cultura fresco, constituído de meio WPM com adição de sacarose (30 g L^{-1}), ácido giberélico (GA_3) (0; 144,5; 289 ou $578 \mu\text{M}$) e Phytigel (2 g L^{-1}) e os tubos permaneceram no escuro por 60 dias, quando foi realizada a avaliação.

4.1.9 Adição de GA_3 em meio de cultura líquido

As sementes passaram pelo processo de desinfestação com etanol 70 % (v/v) por um min, seguida de imersão em solução 1 % de NaOCl comercial por 10 min sob agitação constante. Após 5 enxágues com água estéril, as sementes foram introduzidas em frascos contendo meio líquido, sais e vitaminas MS. sacarose (30 g L^{-1}), além de concentrações crescentes de GA_3 (0; 5,78; 11,56 ou $17,34 \mu\text{M}$)

filtro-esterilizada em filtro de 0,25 µm. Cada tratamento foi representado por um frasco, contendo 15 sementes. Os frascos foram mantidos no escuro, sob agitação constante de 80 rpm a 27°C por sete dias. Após esse período, as sementes foram transferidas para meio de idêntica composição, porém com adição de Phytigel (2 g L⁻¹) e permaneceram no escuro por 90 dias, quando foi realizada a avaliação.

4.1.10 Irradiação de raios gamas em sementes

As sementes foram submetidas à irradiação com doses crescentes de raios gama – 0, 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 kGy -, utilizando fonte de Co⁶⁰ modelo Gammacell 220, a uma taxa de 1,322 kGy h⁻¹. As irradiações foram realizadas em frascos de vidro contendo 40 sementes por frascos. Após a irradiação, as sementes foram imersas em solução de 1% de NaOCl comercial por dez min e receberam cinco enxágues com água estéril. Em seguida, foram introduzidas em placas de Petri contando meio de cultura básico MS, com adição de sacarose (30 g L⁻¹), 4,44 µM de BA e solidificado com Phytigel (2 g L⁻¹). As placas foram vedadas e mantidas no escuro onde permaneceram por 60 dias, quando foi realizada a avaliação.

4.2 Cultivo *in vitro* de segmentos nodais para proliferação de gemas axilares

Os experimentos foram realizados utilizando plantas de origem clonal com aproximadamente dois anos, cedidas por um viveiro florestal. A matriz dessas plantas está localizada no município de São Mateus do Sul, PR. As plantas foram mantidas na casa de vegetação do Laboratório de Melhoramento de Plantas no CENA/USP. As plantas foram mantidas sob regime de podas seletivas, conduzidas mensalmente, de forma a manter a juvenilidade dos propágulos. Para a coleta das brotações, utilizou-se tesoura de poda previamente esterilizada em etanol 70 % (v/v). Após a coleta, as brotações utilizadas como fontes de propágulos para o preparo dos segmentos nodais foram acondicionadas em recipientes com água deionizada, com o intuito de manter a turgescência das mesmas. Em seguida, foram conduzidas até o laboratório, onde foi realizada a assepsia dos explantes.

As brotações passaram pela pré-assepsia com água e detergente comercial e logo após, foram imersas em etanol 70 % (v/v) por 4 min. Em seguida, foram imersas em soluções diluídas em diversas concentrações de água sanitária comercial com 2,5 % de cloro ativo, durante 10 min, sob agitação constante. As concentrações de

solução comercial de NaOCl variaram em cada experimento. Em seguida, foram enxaguadas três vezes em água desionizada estéril. Os segmentos nodais foram mantidos numa solução antioxidante cisteína (1 g L^{-1}) até o momento da inoculação no meio de cultura.

O meio de cultura de todos os experimentos teve o pH ajustado para 5,8 antes de autoclavagem e da adição de Phytigel (2 g L^{-1}). Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C e $1,1 \text{ atm}$ de pressão, por 20 min. Os experimentos que foram mantidos no escuro, permaneceram em incubadoras do tipo BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, enquanto os que foram conduzidos em condições de luz foram mantidos em sala de crescimento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz branca fria, obtendo-se aproximadamente $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os tubos de ensaio foram vedados com tampas de polietileno e duas camadas de filme plástico de PVC.

As avaliações dos experimentos foram realizadas aos 15, 30, 60 e 120 dias após a introdução dos explantes, observando a presença de contaminantes, oxidação fenólica, sobrevivência, presença de brotos e raízes.

4.2.1 Estabelecimento de segmentos nodais

Após a assepsia com solução aquosa de 0,25 % de NaOCl comercial, dentro da capela de fluxo laminar, os explantes foram preparados com auxílio de pinça e bisturi, em segmentos nodais de aproximadamente um centímetro de comprimento. Posteriormente, esses segmentos foram inoculados em tubos contendo 15 mL de meio de cultura com $\frac{1}{4}$ da concentração dos sais MS, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}) e $4,4 \mu\text{M}$ de BA. O experimento consistiu de 80 tubos, onde 40 deles foram mantidos no escuro por 7 dias e em seguida, transferidos para condição de fotoperíodo. A outra metade, seguiu para condição de fotoperíodo imediatamente.

4.2.2 Adição de PPM® no meio de cultura

Após a assepsia das brotações com solução aquosa na diluição de 0,25 % de NaOCl comercial, os explantes foram preparados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura WPM, suplementado com sacarose (20 g L^{-1}) e carvão ativado (3 g L^{-1}). Após a autoclavagem do meio, o PPM® foi adicionado (0 ou $125 \mu\text{L L}^{-1}$) e misturado. O experimento consistiu de 25 tubos de ensaio por

tratamento, os mesmos permaneceram no escuro 7 dias e após, foram transferidos para condição de fotoperíodo.

4.2.3 Meio de cultura suplementado com 2iP e ANA

As brotações foram lavadas em água corrente e imersas no fungicida-bactericida Kasumin[®] (Casugamicina) (Arysta Lifescience, Brasil), sendo utilizado 3 mL L⁻¹ por 10 min. Em seguida, foram transferidas para o fluxo laminar e imersas em solução de aquosa na diluição de 0,25 % de NaOCl comercial. Posteriormente, com auxílio de pinça e bisturi, sob papel estéril, os explantes foram preparados, contendo os segmentos nodais. Os segmentos foram introduzidos em tubos de ensaio contendo meio WPM suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), 8,8 µM de 2iP, 0,2 µM de ANA e carvão ativado (3 g L⁻¹). O experimento constitui de 40 tubos de ensaio, que foram mantidos por 7 dias no escuro e após, foram transferidos para sala de cultivo em condição de fotoperíodo.

4.2.4 Adição de carvão ativado e de PVP ao meio de cultura

As brotações passaram pelo processo de pré-asepsia, e logo após, foram imersas em solução aquosa na diluição de 0,5 % de NaOCl comercial. Após o enxágue triplo com água estéril, os explantes foram preparados e introduzidos em meio de cultura contendo sais e vitaminas MS, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e PPM[®] (125 µL L⁻¹). Os tratamentos se caracterizaram na adição de carvão ativado (3 g L⁻¹) ou polivinilpirrolidona (PVP) (3 g L⁻¹) ao meio de cultura. Cada tratamento constitui de 20 tubos de ensaio, que foram mantidos no escuro por 7 dias e em seguida, foram transferidos para condição de fotoperíodo.

4.2.5 Utilização de ácido ascórbico, PVP e carvão ativado

Um segundo experimento foi realizado, buscando determinar o antioxidante ideal para o cultivo *in vitro* dos segmentos nodais. Após a pré-asepsia e imersão em solução na diluição de 1% de NaOCl comercial por 10 min e o enxágue das brotações com água destilada estéril, os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio contendo meio composto por sais e vitaminas MS, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹). Os tratamentos ficaram definidos como:

T1: antes do processo de assepsia, os explantes ficaram imersos por 20 min em solução contendo ácido ascórbico (1 g L^{-1}) e ao meio de cultura foi adicionado 2 mL L^{-1} de PPM[®];

T2: meio de cultura suplementado com carvão ativado (3 g L^{-1}) e 2 mL L^{-1} de PPM[®];

T3: meio de cultura suplementado com PVP (5 g L^{-1}) e 2 mL L^{-1} de PPM[®];

T4: imersão em solução de ácido ascórbico (1 g L^{-1}) e introdução em meio com 4 mL L^{-1} de PPM[®];

T5: meio de cultura suplementado com carvão ativado (3 g L^{-1}) e 4 mL L^{-1} de PPM[®];

T6: meio de cultura suplementado com PVP (5 g L^{-1}) e 4 mL L^{-1} de PPM[®].

Cada tratamento foi representado por 15 tubos de ensaio, que foram mantidos por 7 dias no escuro e em seguida, transferidos para condição de fotoperíodo.

4.2.6 Assepsia com NaOCl e PPM[®]

As brotações passaram pela pré-assepsia e foram imersos em 70 % etanol por um min. Em seguida, foram imersos em solução de NaOCl comercial na diluição de 0,25; 0,5 ou 1 % de concentração. Após o tríplice enxágue em água estéril, os explantes foram preparados e introduzidos em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), $8,8 \mu\text{M}$ de BA, $0,1 \mu\text{M}$ de ANA e PPM[®] (0 ou $250 \mu\text{L L}^{-1}$). O experimento foi delineado em esquema fatorial, onde o fator A é representado pela concentração do hipoclorito de sódio e o fator B a concentração de PPM[®] no meio de cultura (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos com modificações da concentração de hipoclorito de sódio e quantidade de PPM[®] no meio de cultura

PPM [®] ($\mu\text{L L}^{-1}$)	% NaOCl comercial		
	1	0,5	0,25
0	T1	T2	T3
250	T4	T5	T6

O experimento consistiu de 20 frascos por tratamento, os quais permaneceram no escuro por 7 dias, em seguida foram transferidos para condição de fotoperíodo.

Após 60 dias, os segmentos nodais foram transferidos para meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}) e ANA (0 ou $5,37 \mu\text{M}$), visando induzir a formação de raízes e permaneceram nesse meio por 120 dias, sendo realizada a avaliação após esse período.

4.3 Pré-teste de indução de embriogênese somática

Li et al. (1998) e Maximova et al. (2002) descreveram protocolo para indução de embriogênese somática em *Theobroma cacao* L. (cacaueiro), utilizando botões florais fechados. Esse protocolo serviu como base para um pré-teste com as flores de erva-mate. Botões florais foram coletados ao final da tarde, em São Mateus do Sul-PR e foram acondicionados em tubos Falcon contendo água fria e estes em caixas de isopor, com o intuito de manter a turgescência durante o transporte até o laboratório, em Piracicaba, SP.

Dentro do fluxo laminar, os botões florais foram imersos em solução de 1 % (p/v) de hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) por 20 min. Os botões florais foram enxaguados com água destilada estéril por três vezes e mantidos em placas com água para evitar o dessecamento. Em cima de papel filtro estéril, os botões foram cortados, de forma a separar: pétalas e ovário das flores femininas e pétalas e estames das flores masculinas. Os explantes foram introduzidos em placas de Petri contendo 25 mL de meio primário de crescimento de calo PCG (Li et al., 1998), composto por sais e vitaminas DKW (Driver; Kuniyuki, 1984), suplementado com glicose (20 g L^{-1}); glutamina (250 mg L^{-1}); mio-inositol (100 mg L^{-1}); $9 \mu\text{M}$ de 2,4-D, $0,022 \mu\text{M}$ de thidiazuron (TDZ) e Phytigel (2 g L^{-1}). As culturas foram mantidas no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 14 dias, quando foi realizada a avaliação da presença de contaminantes e oxidação fenólica dos explantes.

4.4 Calogênese foliar

Os experimentos foram realizados utilizando plantas de origem clonal com aproximadamente dois anos, mantidas na casa de vegetação ao Laboratório de Melhoramento de Plantas no CENA/USP. Para a condução dos experimentos, foi coletado o terceiro ou quarto par de folhas mais jovens das plantas e imersos em água desionizada e conduzidos até o laboratório. Todas as coletas foram realizadas pela manhã, com o objetivo de manter a hidratação das folhas. A desinfestação superficial das folhas foi realizada com água corrente e detergente comercial. Em seguida, as

folhas foram imersas em uma solução de álcool 70 % (v/v) por um min e após, imersas em solução de 1 % de NaOCl comercial (2,5 % de cloro ativo) por 10 min. O meio de cultura de todos os experimentos teve o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e da adição de Phytigel (2 g L⁻¹). Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,1 atm de pressão, por 20 min. Os experimentos que foram mantidos no escuro, permaneceram em incubadoras do tipo BOD a 25 ± 2°C, enquanto os que foram conduzidos em condições de luz, foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2°C com fotoperíodo de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz branca fria, obtendo-se aproximadamente 31 μmol m⁻² s⁻¹. As placas de Petri foram vedadas com duas camadas de filme plástico de PVC.

4.4.1 Assepsia com concentrações crescentes de NaOCl

As folhas passaram pelo sistema de pré-lavagem e permaneceram imersas em solução diluída de NaOCl comercial a 0,25; 0,5 e 1 % de concentração por 10 min. As folhas foram então, transferidas para a capela de fluxo laminar e a desinfestação foi finalizada com cinco lavagens em água estéril. Os explantes foram preparados com um tamanho aproximado de 1 cm² com o auxílio de bisturi, pinça e papel de filtro estéril. Uma vez obtidos, esses explantes foram introduzidos em placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultura PCG sem adição de hormônios, com a face adaxial em contato com o meio. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas no escuro. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, onde cada tratamento foi constituído de 10 placas com 4 explantes. A avaliação ocorreu aos 15 e aos 30 dias, onde foram observadas a contaminação, oxidação e a sobrevivência dos explantes.

4.4.2 Posição do explante no meio de cultura

Os explantes, uma vez recortados, foram posicionados com a face adaxial ou abaxial em contato com o meio de cultura. Os explantes foram introduzidos em placas de Petri contendo 25 mL de meio PCG, suplementado com 9 μM de 2,4-D e 0,022 μM de tidiazuron (TDZ). As culturas foram mantidas no escuro. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 placas por tratamento e 4 explantes por placa. A avaliação ocorreu aos 30, 60 e 90 dias, observando a sobrevivência e a presença de calos.

4.4.3 Modo de recorte dos explantes

Após a desinfecção padrão das folhas, os explantes foram cortados de duas maneiras: contendo parte da nervura central, ou apenas do limbo foliar (Figura 6), e introduzidos em placas de Petri contendo meio PCG com adição de 9 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ. As placas foram mantidas no escuro.

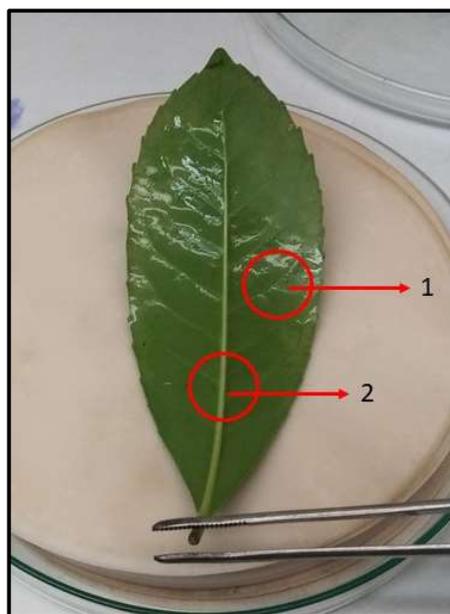


Figura 6. Modo de recorte dos explantes. (1) explante de limbo foliar; (2) explante contendo parte da nervura central

O experimento consistiu de 10 placas por tratamento, contendo 4 explantes por placa. A avaliação ocorreu aos 30 e 45 dias, observando a ocorrência de oxidação e sobrevivência.

4.4.4 Tamanho dos explantes

As folhas passaram pela desinfecção padrão e os explantes foram confeccionados medindo 1 cm^2 ou 0,5 cm^2 e introduzidos em placas de Petri contendo meio PCG contendo 9 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ. As placas permaneceram no escuro. O experimento contou com 10 placas por tratamento e 4 explantes por placa. A avaliação ocorreu aos 30, 60 e 90 dias, observando a sobrevivência, contaminação e presença ou não de calos.

4.4.5 Introdução dos explantes em meios de cultura PCG, SCG e ED (Li et al., 1998)

Após o processo de desinfestação e confecção dos explantes, os mesmos foram introduzidos com a face adaxial em contato com o meio em placas de Petri contendo 25 mL de meio PCG, suplementado com 9 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ. As culturas foram mantidas no escuro 14 dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para o meio secundário de crescimento de calo (SCG) (Li et al., 1998), composto por sais WPM; vitaminas (Gamborg, 1966); glicose (20 g L⁻¹); 9 μM de 2,4-D e 1,4 μM de BA, onde permaneceram por 14 dias no escuro.

Após o período de indução, os explantes foram transferidos para placa de Petri contendo o meio de desenvolvimento de embriões (ED) (Li et al., 1998), constituído por sais e vitaminas DKW, suplementado com sacarose (20 g L⁻¹) e glicose (1 g L⁻¹). As culturas foram mantidas no escuro por 60 dias com subcultivos regulares a cada duas semanas.

Após os 60 dias, os calos formados foram transferidos para placas contendo meio ED suplementado com 1,44 μM de GA₃; concentrações crescentes de BA (0; 4,44 ou 8,88 μM) e ANA (0; 5,37 ou 10,74 μM) (Tabela 2). As culturas foram transferidas para sala de luz, em condição de fotoperíodo. Os calos foram mantidos por 12 meses nessas condições, onde mensalmente foi realizada uma avaliação descritiva dos mesmos, considerando a coloração e a aparência.

Tabela 2. Delineamento em esquema fatorial 3x3, com combinação entre as concentrações de BA e ANA

		BA (μM)		
		0	4,44	8,88
ANA (μM)	0	T1	T4	T7
	5,37	T2	T5	T8
	10,74	T3	T6	T9

4.4.6 Introdução dos explantes em meios PCG e SCG com alteração de balanço hormonal

Para avaliar a indução de calos, foram confeccionados explantes medindo 1 cm² e introduzidos com a face adaxial em contato com o meio de cultura. O meio utilizado foi meio PCG acrescido de combinações de 2,4-D (0; 4,5; 9 ou 13,5 μM) e

TDZ (0,011; 0,022 ou 0,033 μM) em esquema fatorial 4x4, resultando em 16 tratamentos (Tabela 3). O experimento foi constituído de 4 placas por tratamento, com 4 explantes em cada uma. As placas foram mantidas no escuro, por 30 dias.

Tabela 3. Delineamento em esquema fatorial 4x4, com combinação entre as concentrações de TDZ e 2,4-D

TDZ (μM)	2,4-D (μM)			
	0	4,52	9,04	13,56
0	T1	T2	T3	T4
0,011	T5	T6	T7	T8
0,022	T9	T10	T11	T12
0,033	T13	T14	T15	T16

Após o período de 30 dias, os explantes foram subcultivados em placas contendo meio SCG com as seguintes combinações de BA e 2,4-D:

- 1: 1,4 μM de BA + 0 mL L⁻¹ de 2,4-D
- 2: 0 μM de BA + 9,04 μM de 2,4-D
- 3: 1,4 μM de BA + 9,04 μM de 2,4-D
- 4: 2,8 μM de BA + 18,08 μM de 2,4-D

As placas foram acondicionadas em fotoperíodo e os calos foram transferidos para meio fresco a cada 30 dias. Em cada troca de meio, foi realizada uma avaliação descritiva dos calos.

4.4.7 Meio gelificado com ágar

A primeira fase do experimento anterior foi repetida, utilizando ágar (7 g L⁻¹) como agente gelificante. O experimento foi constituído de 4 placas por tratamento, com 4 explantes cada. Foi avaliado ao final de 30 dias a porcentagem de calos formados.

4.4.8 Introdução dos explantes em meios PCG e ED (Li et al., 1998) com balanço hormonal

Os explantes foram introduzidos em meio PCG com adição de extrato de malte (0,5 g L⁻¹) e com as seguintes combinações de 2,4-D e TDZ (Tabela 4):

Tabela 4. Tratamentos com modificações na concentração de 2,4-D

	2,4-D (μM)	TDZ (μM)
T1	9,04	0,022
T2	4,52	0,022
T3	2,26	0,022

O experimento foi constituído de 10 placas por tratamento, com 4 explantes em cada. As placas foram armazenadas no escuro. Aos 30 dias, os explantes foram subcultivados para meio ED suplementado com extrato de malte ($0,5 \text{ g L}^{-1}$). O meio recebeu diferentes combinações de BA (0; 4,44 ou 8,88 μM) e ANA (0; 5,37 ou 10,74 μM), sendo, portanto, um esquema fatorial de 3x3 com 9 tratamentos (Tabela 5). Metade das placas permaneceu no escuro e a outra metade foi transferida para sala de luz em condição de fotoperíodo.

Tabela 5. Delineamento em esquema fatorial com combinações entre as concentrações de ANA e BA

ANA (μM)	BA (μM)		
	0	4,44	8,88
0	T1	T4	T7
5,37	T2	T5	T8
10,74	T3	T6	T9

As avaliações foram realizadas a cada subcultivo, observando a sobrevivência, a presença de contaminação e a presença ou não, de calos.

4.4.9 Introdução em meios de cultura suplementados com cinetina ou zeatina

O experimento foi desenvolvido seguindo os seguintes tratamentos:

Meio 1 – MS básico, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}); 4,52 μM de 2,4-D e 4,56 μM de Zeatina (Zea);

- Meio 2 – MS básico, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹); 18,05 µM de 2,4-D e 9,3 µM de Cinetina (Kin);
- Meio 3 – Sais e vitaminas DKW, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹); 4,52 µM de 2,4-D e 4,56 µM de Zea;
- Meio 4 – Sais e vitaminas DKW, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹); 18,05 µM de 2,4-D e 9,3 µM de Kin;
- Meio 5 – Sais e vitaminas DKW, suplementado com glicose (20 g L⁻¹); glutamina (250 mg L⁻¹); mio-inositol (100 mg L⁻¹); 4,52 µM de 2,4-D e 4,56 µM de Zea;
- Meio 6 – Sais e vitaminas DKW, suplementado com glicose (20 g L⁻¹); glutamina (250 mg L⁻¹); mio-inositol (100 mg L⁻¹); 18,05 µM de 2,4-D e 9,3 µM de Kin;
- Meio 7 (Controle) – Meio PCG com 9 µM de 2,4-D e 0,022 µM de TDZ.

O experimento foi constituído de 4 explantes foliares por placa e 10 placas por tratamento, onde permaneceram no escuro. As avaliações foram realizadas aos 15, 30 e 90 d, observando a sobrevivência e a presença de calos.

4.4.10 Introdução dos explantes em meio com alteração de balanço hormonal entre TDZ e 2,4-D

O experimento consistiu na introdução dos explantes foliares em meio PCG com adição de 2,4-D (2,26; 4,52 ou 9,04 µM) e TDZ (0,0055; 0,011 ou 0,022 µM) (Tabela 6).

Tabela 6. Esquema fatorial 3x3, com variação nas concentrações de TDZ e 2,4-D no meio de cultura

	TDZ (µM)		
	2,26	4,52	9,04
0,0055	T1	T2	T3
0,011	T4	T5	T6
0,022	T7	T8	T9

O experimento foi constituído de 10 placas por tratamento com 4 explantes cada. As placas permaneceram no escuro e foram subcultivadas para meio ED com adição de 5,37 μM de ANA e 4,44 μM de BA aos: 5, 10 e 15 dias. O delineamento do experimento constituiu-se de um fatorial duplo, onde o fator A se constitui das 9 combinações de 2,4-D e TDZ e o fator B, seria o período de permanência nesse meio (5, 10 e 15 dias), totalizando 27 tratamentos.

4.5 Análise estatística

O experimento de influência da concentração de NaOCl e PPM[®] no controle de contaminação das gemas axilares, e os de influência da concentração de NaOCl no controle de contaminação, de influência na posição do explante em contato com o meio de cultura, modo de recorte e tamanho dos explantes, de efeito de diferentes meios de cultura e de influência do tempo de permanência em meio PCG de calogênese foliar foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com o auxílio do programa R Studio, versão 4.0.0 (R Core Team, 2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação de sementes *in vitro*

As sementes de *I. paraguariensis* são pequenas, com tegumento duro e o embrião imaturo (Fowler; Sturion, 2000). A dormência tegumentar e embrionária apresentada, tornam necessário o processo de estratificação, onde as sementes permanecem em areia úmida por 4 a 5 meses em temperatura ambiente, até dar início ao processo de germinação (Wending; Brondani, 2015). Tal processo causa um aumento significativo no tempo de produção das mudas, sendo justificável encontrar outros métodos mais rápidos e eficazes para superar a dormência das sementes. Nesse trabalho, foram testados métodos de germinação de sementes de erva-mate *in vitro* para otimizar esse processo e eliminar a contaminação por patógenos.

5.1.1 Avaliação da influência de diferentes concentrações de NaOCl na assepsia das sementes

Para controlar a ação dos agentes contaminantes durante a germinação *in vitro*, foram avaliadas concentrações de diluição de NaOCl para assepsia das sementes. Foram realizados testes com NaOCl comercial diluído em soluções aquosas com concentrações de 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 % durante 30, 40, 50 e 60 min. Foi observado que as imersões com NaOCl não foram suficientes para controlar os agentes contaminantes em nenhum dos tempos de imersão testados, sendo necessário descartar o experimento (Figura 7).



Figura 7. Sementes de erva-mate introduzidas *in vitro* contaminadas por fungos

Com isso, foi percebida a necessidade de aumentar a dosagem de NaOCl na assepsia das sementes de erva-mate. Todavia, é importante ressaltar, que a exposição às soluções de NaOCl por um período longo, pode causar danos ao embrião. Estudos com sementes de *Amburana (Commiphora leptophloeos)*, espécie arbórea de ocorrência no cerrado brasileiro, demonstraram a redução na viabilidade, quando o período de exposição ao hipoclorito de sódio passou de 10 para 20 min (Faiad et al., 1997).

5.1.2 Efeito da autoclavagem das sementes no processo de germinação

Foi testado um método de autoclavagem descrito por Martins-Corder e Borges Junior (1999) como forma de quebrar a dormência e superar o problema de contaminação. Seguindo esse protocolo, as sementes foram submetidas a um processo de autoclavagem por 18 min. Após a autoclavagem, as sementes foram cultivadas em água e ágar e não apresentaram contaminação de agentes patogênicos, todavia, as sementes não germinaram (Figura 8).

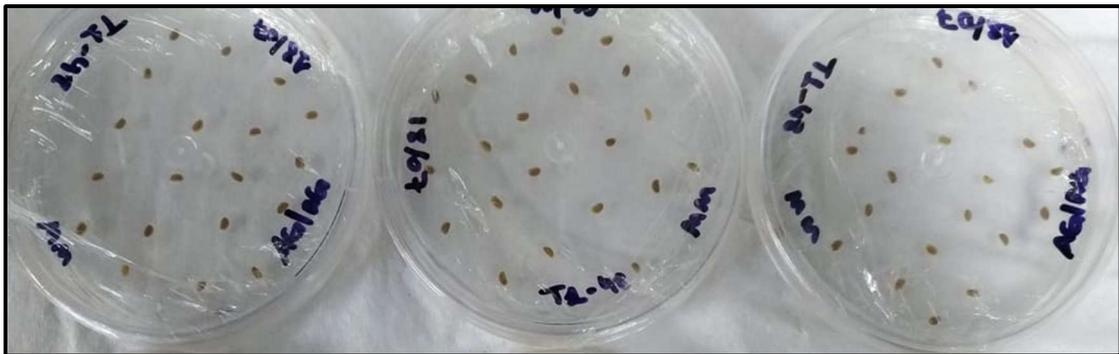


Figura 8. Sementes de erva-mate autoclavadas por 18 min, após 21 dias de introdução em água e ágar

Em sementes de acácia negra (*Acacia meagensii*) que apresentam dormência tegumentar e possuem um problema considerável com contaminação de fungos e bactérias no cultivo *in vitro*, a autoclavagem das sementes por 20 ou 25 min, gerou índices de 90 e 70 % de germinação, respectivamente. Além disso, as sementes não apresentaram nenhum tipo de contaminação. Entretanto, as sementes de uma outra espécie florestal, a cutieira (*Joannesia princeps* VELL.), após a autoclavagem por 20 min, tornaram-se inviáveis devido à morte do embrião, analisada pelo teste de tetrazólio (Neves et al., 2010). Aparentemente, as sementes de erva-mate também sofreram danos no embrião, devido à exposição à alta temperatura por um longo período (Figura 8).

5.1.3 Influência de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ na assepsia das sementes

Como o protocolo com NaOCl não foi bem sucedido, o uso de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ no processo de assepsia de sementes de erva-mate foi testado, como uso alternativo objetivando um menor dano à semente (Grattapaglia; Machado, 1990). Nesse experimento, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ foi adicionado em 1 ou 2,5 % (p/v), em 10 ou 20 min de imersão. Contudo, as sementes apresentaram 100 % de contaminação por agentes fúngicos, demonstrando que não houve eficácia dos tratamentos em erva-mate. Em segmentos de brácteas (folhas modificadas) de *Mussaenda erythrophylla*, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ foi mais eficiente, quando comparado à mesma concentração de NaOCl (Almeida et al., 2010). Já em ramos de pessegueiro, a desinfestação realizada com NaOCl foi mais eficiente em relação ao tratamento com $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, utilizando as mesmas concentrações (0,5; 1,0; 1,5 e 2 %) (Chaves et al., 2004). Isso demonstra que a eficácia do tratamento com NaOCl ou $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ variam conforme a espécie ou variedade estudada. Em erva-mate, ambos os tratamentos não foram suficientes para limitar a contaminação por agentes patogênicos.

5.1.4 Influência da ruptura no tegumento e do efeito de BA nos índices de germinação

Para a otimização do processo de germinação de sementes de erva-mate, um protocolo de ruptura do tegumento das sementes foi empregado, visando facilitar o processo de quebra da dormência tegumentar. Para esse experimento, a diluição de NaOCl comercial no processo de assepsia foi de 0,25 %, para evitar danos ao embrião. Além disso, a sacarose do meio de cultura MS foi retirada, objetivando a redução nos índices de contaminantes. Sabe-se que a sacarose pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias no meio de cultura, interferindo negativamente na sobrevivência dos explantes (Kozai, 1991). No entanto, o experimento apresentou 100% de contaminação fúngica, impossibilitando as sementes de erva-mate de germinarem.

Para circunvir o problema de contaminação, o tempo de imersão das sementes em NaOCl foi alterado, passando de 40 para 60 min, mas mantendo a concentração da solução a 0,25 %. Após 30 dias, 37,5 % das sementes introduzidas não apresentaram contaminantes e foram transferidas para meio $\frac{1}{4}$ MS, com adição de sacarose e BA. Entretanto, nenhuma semente germinou ao final de 90 dias. Em sucupira branca (*Pterodon pubescens*), o índice de germinação *in vitro* de

sementes que receberam uma secção no tegumento foi de 80 %. Entretanto, esse valor foi inferior ao de germinação dos embriões excisados, provavelmente pela presença do tegumento, que ainda agiu como uma barreira na absorção dos nutrientes do meio de cultura (Coelho, 1999). As sementes do gênero *Ilex* possuem substâncias inibidoras do desenvolvimento embrionário, que se encontram no endosperma ou no tegumento (Niklas, 1987). Possivelmente, as sementes de erva-mate não germinaram devido à barreira do tegumento ou pela presença dessas substâncias inibidoras do desenvolvimento embrionário nas suas estruturas.

5.1.5 Efeito da adição de fungicida ao meio de cultivo

Buscando uma alternativa para o controle da contaminação no meio de cultura, foram adicionadas doses crescentes de fungicida Midas BR[®] para a germinação de erva-mate. As doses testadas foram 2, 5 ou 8 g L⁻¹ e a maior dose (8 g L⁻¹) apresentou 55 % de contaminação fúngica ($n=100$). Todavia, houve uma contaminação bacteriana elevada ao redor das sementes, o que comprometeu a germinação das sementes (Figura 9).

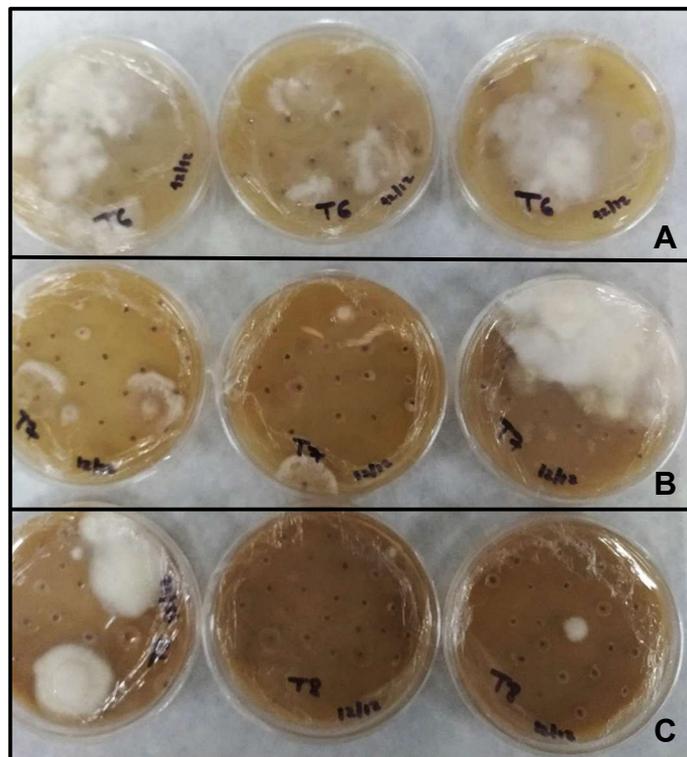


Figura 9. Teste de aplicação de fungicida Midas BR[®] em meio de cultura para germinação de sementes de erva-mate. (A) Meio de cultura suplementado com 2 g L⁻¹ de Midas BR[®]. (B) Meio de cultura suplementado com 5 g L⁻¹ de Midas BR[®]. (C) Meio de cultura suplementado com 8 g L⁻¹ de Midas BR[®]

O fungicida Midas BR[®] é uma mistura de dois ingredientes ativos: famoxadona e mancozebe, e seu modo de ação é pelo contato, onde atua inibindo a respiração mitocondrial e grupos sulfidrilos dos patógenos (Agrofit, 2019). Tófoli et al. (2003) avaliaram a ação do fungicida na germinação de conídios de *Alternaria solani*, agente causador da “pinta-preta”, de modo que meio de cultura suplementado com 0,1 g L⁻¹ de famoxadona + mancozebe inibiu em 75 % do crescimento micelial. As concentrações testadas no experimento com erva-mate, foram consideravelmente superiores à testada por Tófoli et al. (2003). Entretanto, foi observado um alto índice de contaminação. A adição do fungicida ocorreu antes da autoclavagem do meio de cultura, podendo indicar que o mesmo é suscetível a altas temperaturas de modo a degradar seus componentes ativos durante o processo.

5.1.6 Influência da adição de água de coco no meio de cultura

Buscando estimular a germinação das sementes *in vitro*, foi adicionada água de coco em água e ágar. Nesse experimento foram utilizadas as doses 0, 50, 100, 150 e 200 mL L⁻¹. Além da ausência de germinação, as sementes apresentaram os índices de contaminação diretamente proporcionais ao aumento das doses de água de coco (Figura 10). Isso indica que os suplementos fornecidos pela água de coco, favoreceram o desenvolvimento dos patógenos.

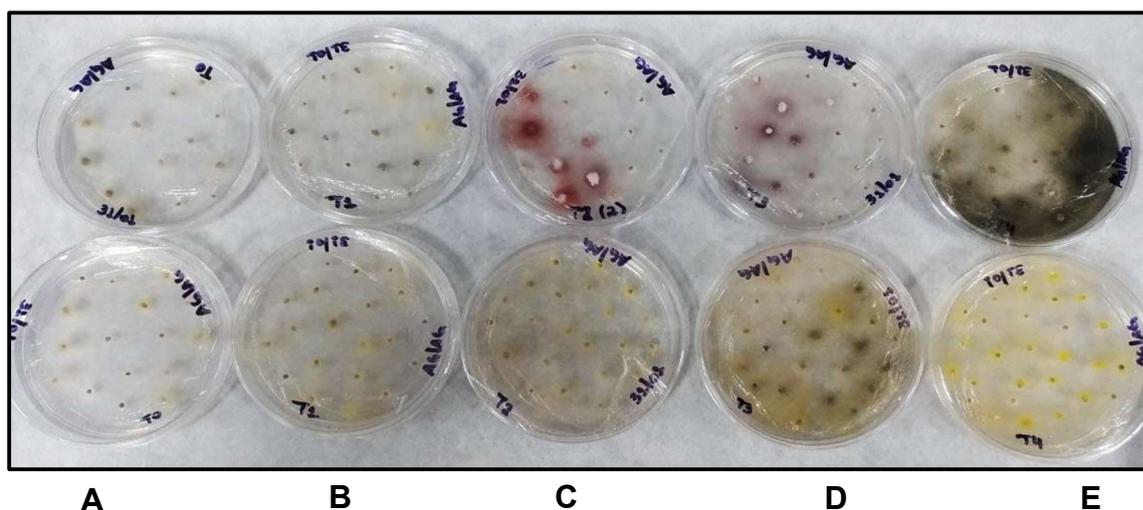


Figura 10. Sementes de erva-mate introduzidas em meio de cultura suplementado com água de coco após 60 dias. (A) Meio de cultura sem água de coco; (B) Meio de cultura suplementado com 50 mL L⁻¹ de água de coco; (C) Meio de cultura suplementado com 100 mL L⁻¹ de água de coco; (D) Meio de cultura suplementado com 150 mL L⁻¹ de água de coco; (E) Meio de cultura suplementado com 200 mL L⁻¹ de água de coco

A água de coco contém citocininas e pode fornecer açúcares e glicídeos ao explante (Taiz; Zeiger, 2004), podendo contribuir ao desenvolvimento de explantes introduzidos *in vitro*. Em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) a adição de 200 e 250 mL L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura, não influenciou na germinação dos embriões, mas essas concentrações favoreceram o comprimento da parte aérea das plântulas quando germinadas (Nunes et al., 2007). Em sementes de oliveira (*Olea europaea* L.) a germinação também não teve correlação com a suplementação do meio de cultura com água de coco, mas a dosagem de 100 mL L⁻¹ da substância resultou em plântulas com maior número de folhas e de entrenós (Souza, 2011). Como as sementes de erva-mate foram contaminadas com a adição de água de coco ao meio de cultura, não foi possível avaliar seu papel no fornecimento de nutrientes às plântulas.

5.1.7 Efeito do meio de cultura suplementado com PPM®

A fim de testar outros agentes de controle de contaminantes para a germinação das sementes de erva-mate, foi utilizado PPM® no meio de cultura. Sabe-se que a associação de patógenos às sementes pode acontecer de maneira superficial ou através de uma associação interna. Portanto, a desinfestação das sementes com NaOCl pode ser ineficiente no controle dos fungos. Os motivos da possível ineficiência de NaOCl incluem a colonização interna das sementes por microorganismos, a formação de bolhas de ar na solução de desinfestação, impedindo o contato entre os esporos do microorganismo e o NaOCl e/ou pela presença de rachaduras e de impurezas no tegumento da semente (Harmon; Pflieger, 1974; Neegaard, 1979; Sauer; Burroughs, 1986). De forma ao intensificar o processo de assepsia, a partir do presente experimento, esta passou a ser feita com solução comercial de NaOCl a 1 %, e o tempo de imersão passou a ser de 10 min.

O PPM® foi adicionado ao meio de cultura WPM nas concentrações 0 (tratamento 1), 100 (tratamento 2), 200 (tratamento 3) ou 300 µL L⁻¹ (tratamento 4). Após 45 dias da introdução, 83,3 % das sementes do tratamento 1 e 91,7 % dos tratamentos 2 e 4 não apresentaram contaminação ($n=12$). O tratamento 3 demonstrou ausência completa de agentes contaminantes. (Figura 11).

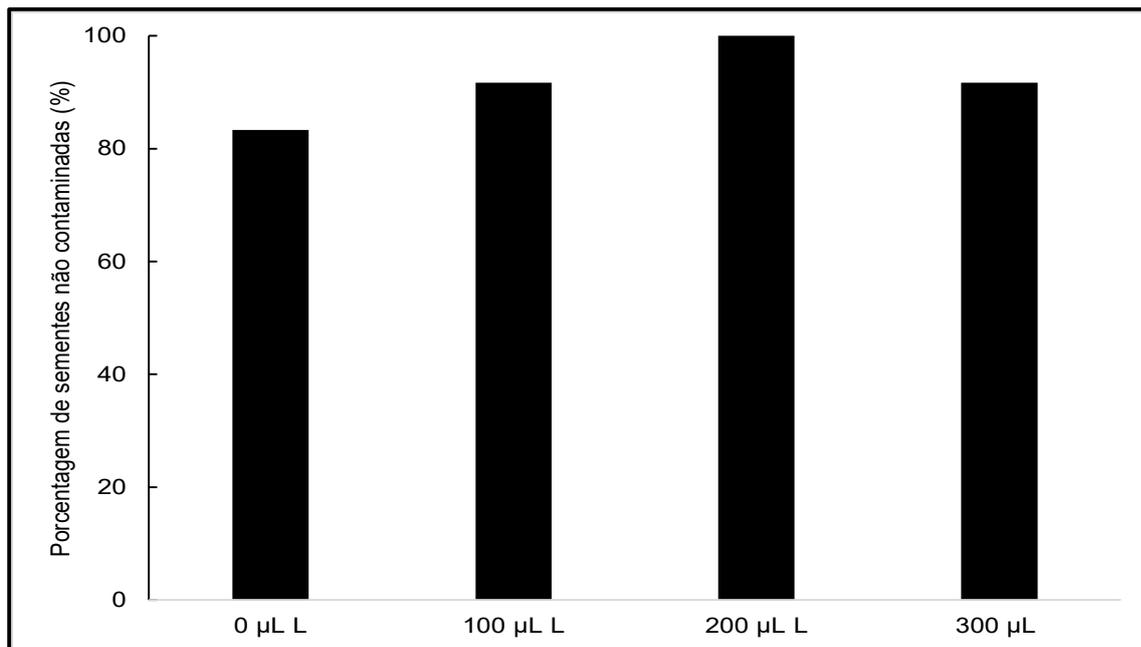


Figura 11. Porcentagem das sementes de erva-mate que não contaminaram, após 45 dias de introdução em meio de cultura suplementado com PPM[®]; ($n=12$). Legenda: Tratamento 1 – meio sem PPM[®] ($0 \mu\text{L L}^{-1}$); Tratamento 2 – meio suplementado com $100 \mu\text{L L}^{-1}$ de PPM[®]; Tratamento 3 – meio suplementado com $200 \mu\text{L L}^{-1}$ de PPM[®]; Tratamento 4 – meio suplementado com $300 \mu\text{L L}^{-1}$ de PPM[®]

Na segunda etapa do experimento, as sementes foram transferidas para meio WPM suplementado com GA₃ ($0; 144,5; 289; 578 \mu\text{M}$), para avaliar o efeito desse hormônio na germinação. Aos após 60 dias, nenhuma semente germinou, nem no meio controle (ausência de GA₃) (Figura 12).

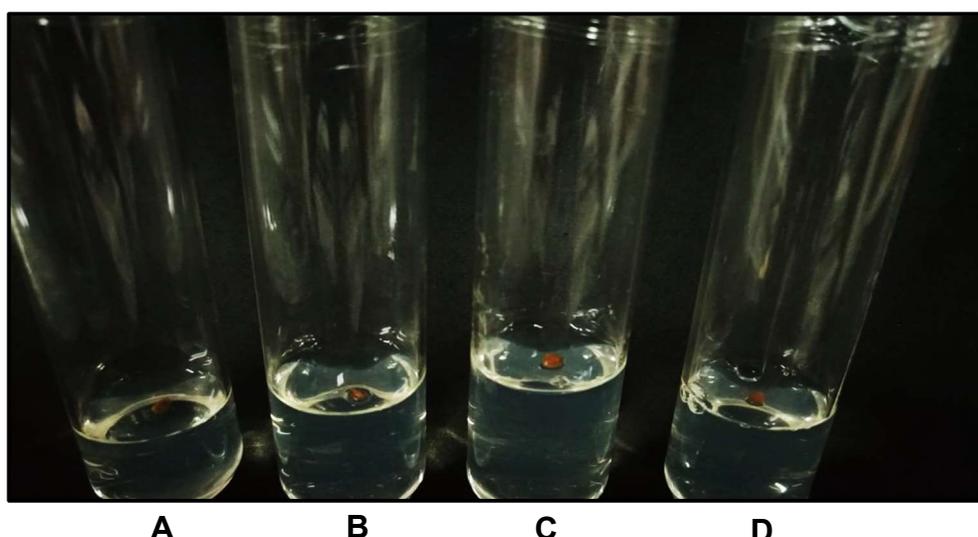


Figura 12. Sementes de erva-mate após 60 dias de cultivo em meio suplementado com GA₃ sem indícios de germinação. (A) Meio de cultura com $0 \mu\text{M}$ de GA₃; (B) Meio de cultura com $144,5 \mu\text{M}$ de GA₃; (C) Meio de cultura com $289 \mu\text{M}$ de GA₃; (D) Meio de cultura com $578 \mu\text{M}$ de GA₃

No cultivo *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*) com meio suplementado com GA₃ (0; 144,5; 289 ou 578 µM), não foram observados efeitos significativos na germinação das sementes, sendo que o controle foi suficiente para promover germinação (Moraes et al., 2012). Ainda, em sementes de *Tabernaemontana catharinensis*, árvore nativa do Rio Grande do Sul, a adição de GA₃ (0, 867 ou 1734 µM) ao meio de cultura não demonstrou efeito significativo na porcentagem de germinação *in vitro*, e o tratamento controle apresentou o mesmo índice do que o meio suplementado com 144,5 µM de GA₃ (Afonso et al., 2018). Em sementes de guavira (*Campomanesia adamantium*), árvore frutífera de ocorrência no Cerrado, o uso do ácido giberélico aumentou o potencial de germinação, independentemente da concentração testada, onde 2,89 µM adicionado ao meio de cultura, foi responsável por promover 100 % de germinação e 11,56 µM aumentou o desenvolvimento da parte aérea, mas não influenciou no comprimento das raízes das plântulas (Déo et al., 2014).

O ácido giberélico pode promover a germinação de sementes, e quando aplicado de forma exógena, favorecendo o alongamento celular (Braun et al., 2010). Entretanto, enquanto em diversas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência das plântulas, para outras, elas apresentam pequeno ou nenhum efeito (Soares et al., 2009). A aplicação de ácido giberélico (0; 173,4; 346,8 ou 520,2 µM) em sementes de porta-enxertos de cítricos não influenciou nos índices de germinação (Sousa et al., 2002). Em *Inga vera* (árvore frutífera do cerrado), as sementes germinadas sob diferentes concentrações de GA₃ não demonstraram diferenças significativas (Stein et al., 2007), enquanto que em mangabeira (*Hancornia speciosa*) o tratamento com meio de cultura suplementado com essa giberelina apresentou maior porcentagem de sementes germinadas (Soares, 2005). Essas diferenças de respostas indicam que cada espécie apresenta um comportamento. Além disso, as sementes podem não apresentar dormência intrínseca dependente de giberelina ou então, possuem adequados níveis endógenos da mesma (Afonso et al., 2018).

Embora as sementes de erva-mate tenham sido descontaminadas com sucesso, pelo uso de NaOCl comercial a 1 %, as sementes não germinaram em meio de cultivo com ou sem GA₃.

5.1.8 Efeito do meio de cultura líquido suplementado com GA₃

Considerando que a absorção de nutrientes em meio líquido ocorre mais rapidamente do que quando há presença de um agente gelificante (Coelho, 1999), para germinar as sementes de erva-mate, foram feitos testes com esse tipo de meio, suplementado com concentrações crescentes de GA₃ nas concentrações de 0; 5,78; 11,56 ou 17,34 µM. Ainda, visto que o meio líquido pode resultar na asfixia dos explantes, devido sua imersão (Coelho, 1999), a permanência nesse tipo de meio foi por 7 dias, sob agitação. Após a transferência para meio sólido com as mesmas concentrações de GA₃ e o controle, não foi observada a germinação das sementes. As sementes não apresentaram contaminação, mas também não ocorreu a germinação, adicionando ou não GA₃.

5.1.9 Influência da irradiação de raios gamas na germinação das sementes

Para testar a germinação de sementes de erva-mate, foi também empregado um método de irradiação de raios gama. As sementes foram irradiadas com 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 kGy de raios gamas, mas não apresentaram resposta aos tratamentos, sem induzir a germinação. Da mesma forma, em sementes de algodão, a irradiação não provocou efeito na germinação, sendo que o tratamento controle apresentou um índice de 97 %, enquanto que o tratamento com 25 kGy, o valor foi de 96,5 %, não diferindo-se estatisticamente (Araujo et al., 2018). Sementes de *Araucaria angustifolia* também não apresentaram diferença na germinação após receberem dosagens de radiação gama. Entretanto, as dosagens de 100, 200 e 400 R mostraram efeito estimulante sobre o desenvolvimento das plântulas (Ferreira et al., 1980).

Na maior parte dos experimentos realizados, a presença de contaminação fúngica comprometeu sua avaliação, impossibilitando a observação da influência dos tratamentos aplicados. Ainda, mesmo nos experimentos em que a assepsia foi eficaz e a contaminação foi controlada, as sementes não germinaram.

Sabe-se que alguns fungos associados às sementes de erva-mate favorecem a sua germinação, por atuarem na decomposição do tegumento. Assim, nas condições naturais da floresta, a ação desses fungos saprófitas são responsáveis por superar a dormência tegumentar (Grigoletti Junior et al., 1999; Fowler et al., 2007), fato esse que pode justificar a ausência da germinação *in vitro* nos experimentos sem contaminação fúngica. Na Tabela 7, é possível observar um resumo dos experimentos realizados nesta seção.

Tabela 7. Resumo dos experimentos de germinação *in vitro* de sementes de *Ilex paraguariensis*

Experimento	Semente	Diluição de solução comercial de NaOCl (%)	Tempo (min)	Meio de Cultura	Avaliação
5.1.1	Inteiras	0,3; 0,4; 0,5 ou 0,6	30, 40 e 50	¼ MS	100% contaminado
5.1.2	Autoclavadas	-	-	Ágar/Água	Sem germinação
5.1.3	Inteiras	Ca(ClO) ₂ a 1 e 2,5 %	10 e 20	Ágar/Água	100% contaminado
5.1.4	Cortadas ao meio	0,25	40	¼ MS sem sacarose	100% contaminado
5.1.4	Cortadas ao meio	0,25	60	¼ MS + BA	Sem germinação
5.1.5	Cortadas ao meio	0,25	40	MS + Midas BR®	Contaminação bacteriana
5.1.6	Cortadas ao meio	0,25	40	Ágar/Água + água de coco	100% contaminado
5.1.7	Inteiras	1	10	WPM + PPM® + GA ₃	Sem germinação
5.1.8	Inteiras	1	10	MS líquido + GA ₃	Sem germinação
5.1.9	Inteiras irradiadas	1	10	MS + BA	Sem germinação

5.2 Gemas Axilares

5.2.1 Cultivo dos segmentos nodais

Seguido dos experimentos com germinação de sementes *in vitro*, foi testado o cultivo de segmentos nodais. O primeiro teste de cultivo foi realizado com esterilização em NaOCl comercial, em solução aquosa de 0,25 %, em meio MS suplementado com

4,4 μM de BA. Nesse experimento, 80 % do material foi perdido por contaminação fúngica nos primeiros 30 dias ($n=80$). Isso demonstrou que a concentração de NaOCl usada no processo de assepsia não foi totalmente eficaz. Aos 90 dias após a introdução, o restante dos segmentos apresentou oxidação fenólica e o experimento foi descartado. Por se tratar de uma espécie lenhosa, a erva-mate libera compostos fenólicos quando cultivada *in vitro*, havendo um acúmulo de polifenóis, melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno do tecido injuriado, promovendo a oxidação da região e o desencadeamento da oxidação no explante inteiro (Andrade et al., 2000; Thomas, 2008). Para controlar a oxidação, é recomendável a utilização de antioxidantes como ácido ascórbico e cisteína, em soluções prévias à introdução *in vitro* e de PVP e carvão ativado adicionados ao meio de cultura. Além de cultivar os explantes no escuro, visto que a oxidação dos fenóis é intensificada pela luz (Grattapaglia; Machado, 1998). Outro trabalho demonstrou o controle da oxidação por meio da incubação dos explantes no escuro de 5 a 7 dias, após a introdução no meio de cultura (Alfenas et al., 2009). Entretanto, no cultivo de segmentos nodais de erva-mate, a manutenção dos explantes no escuro não impediu a oxidação (Figura 13).

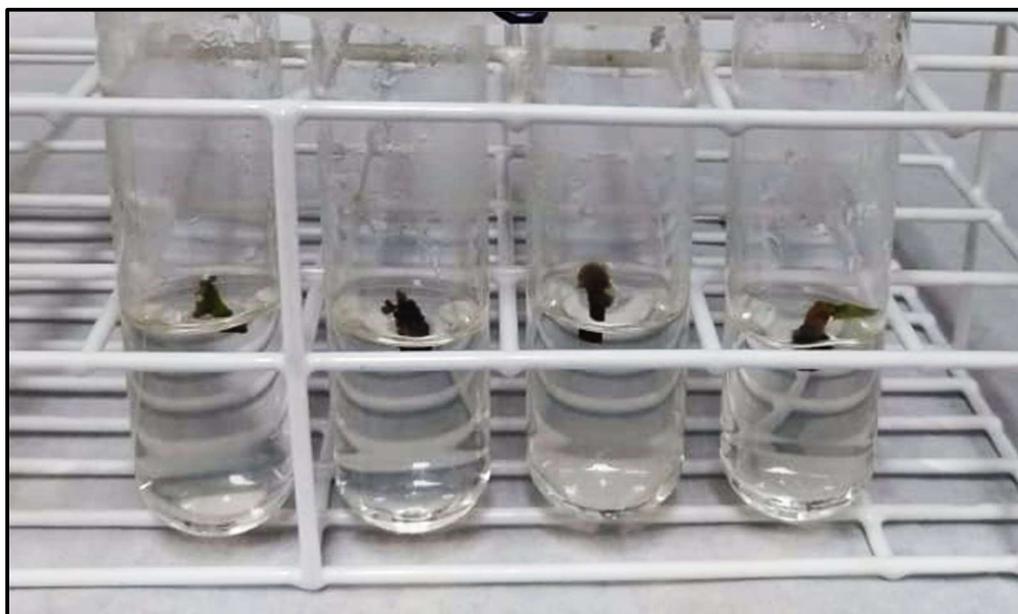


Figura 13. Explantes de erva-mate cultivados em meio MS suplementado com 4,4 μM de BA, apresentado oxidação fenólica após 90 dias de introdução *in vitro*

5.2.2 Efeito do PPM[®] no controle da contaminação no cultivo de segmentos nodais

Considerando-se que a oxidação de 100 % dos segmentos nodais, dentre os 20 % que não apresentam contaminação no experimento anterior, a concentração de NaOCl comercial foi mantida a 0,25 % e foi adicionado carvão ativado (3 g L^{-1}) ao meio de cultura WPM. O carvão ativado é capaz de adsorver as substâncias inibitórias produzidas pelo próprio explante ou pelo meio de cultura, além de liberar substâncias que podem beneficiar o crescimento *in vitro* das culturas. Além disso, o carvão é responsável por promover um ambiente escuro ao explante, favorecendo o enraizamento (George; Sherrington, 1984).

Para impedir a contaminação dos explantes, foi testado o efeito de PPM[®] nas concentrações 0 e $125 \mu\text{L L}^{-1}$ adicionando o produto ao meio de cultura. Contudo, aos 30 dias após a introdução dos segmentos, 100 % do experimento foi perdido por contaminação fúngica. Um estudo com segmentos nodais de erva-mate, demonstrou que o uso das concentrações entre $1 \text{ a } 2 \text{ mL L}^{-1}$ de PPM[®] associados à uma assepsia com 70 % etanol (1 min), seguido da imersão de solução 5 % de NaOCl por 20 min, resultou em índices de 93 e 98 % de sobrevivência. Entretanto, quando utilizada solução de 2,5 % de NaOCl o índice de sobrevivência foi nulo, indicando que o PPM[®] não foi suficientemente eficiente no controle de contaminação (Dutra et al., 2008).

5.2.3 Efeito da assepsia dos explantes com Kasumin e da suplementação do meio de cultura com 2iP e ANA no estabelecimento dos segmentos nodais

Para otimizar o processo de cultivo *in vitro* dos segmentos nodais de erva-mate, o meio de cultura WPM foi suplementado com 2iP e ANA. A fim de superar a ação dos agentes contaminantes, foi adicionada ao processo de assepsia, a imersão dos explantes em Kasumin (3 mL L^{-1}) por 10 min. A contaminação fúngica acometeu 75 % do experimento e 15 % apresentou contaminação bacteriana ($n=40$). Sendo assim, o experimento foi descartado, impossibilitando avaliar o efeito dos hormônios 2iP e ANA no desenvolvimento dos explantes. Os altos índices de contaminação podem ser consequência da concentração insuficiente do Kasumin na solução ou do pouco tempo de permanência dos explantes na mesma.

No cultivo *in vitro* de mamoeiro (*Carica papaya* L.), os explantes que foram previamente imersos em solução contendo 1 mL L⁻¹ de Kasumin por 24 h, apresentaram 62 % de contaminação após 33 dias de cultivo. Quando a mesma quantidade do produto foi adicionada diretamente ao meio de cultivo, a média de contaminação foi de 66 %, não diferindo estatisticamente da adição de Kasumin em solução (Vidal et al., 2015). Já no estabelecimento *in vitro* de acácia-negra (*Acacia mearnsii*), a suplementação do meio de cultura com 2 mL L⁻¹ de Kasumin apresentou 100 % de contaminação, após 14 dias de introdução (Ishibashi et al., 2017). Para o cultivo de segmentos nodais de erva-mate, a assepsia com 3 mL L⁻¹ de concentração de Kasumin, previamente a introdução no meio de cultura, não foi efetiva.

5.2.4 Efeito do carvão ativado e do PVP como agentes antioxidantes

Para evitar a oxidação dos explantes, foi realizado um experimento adicionando carvão ativado e PVP ao meio de cultura MS, para o cultivo de segmentos nodais. Para a assepsia, a concentração da solução de NaOCl comercial passou a ser de 0,5 % e PPM[®] foi adicionado ao meio, a fim de superar os entraves da contaminação. Em 20 tubos de ensaio foi adicionado carvão ativado (3 g L⁻¹), enquanto que em 20, foi adicionado PVP (3 g L⁻¹) ao meio de cultura. Aos 30 dias após a introdução dos segmentos nodais, 95 % dos explantes introduzidos em carvão ativado e 85 % em PVP foram contaminados por fungos e descartados. Ao final de 60 dias, os explantes que haviam sobrevivido, morreram por oxidação fenólica, sugerindo que a concentração de 3 g L⁻¹ de carvão ativado e 3 g L⁻¹ de PVP não foram suficientes para evitar a oxidação do meio de cultura durante o cultivo de segmentos nodais de erva-mate. Da mesma forma, em candeia (*Eremanthus incanus*), árvore endêmica do cerrado, o uso de PVP e carvão ativado nas concentrações de 1 e 2 g L⁻¹ não foi eficiente no controle da oxidação, apresentando taxas superiores a 60 %, sem diferirem estatisticamente entre si (Miranda et al., 2019).

5.2.5 Efeito do ácido ascórbico, PVP e carvão ativado com antioxidantes

Visto que a concentração da solução de NaOCl comercial no experimento anterior não foi suficiente para barrar a contaminação dos explantes, e isso não permitiu uma avaliação efetiva dos agentes antioxidantes, nesse experimento, a assepsia foi realizada com solução de 1 % de NaOCl comercial e o meio MS foi

suplementado com PPM[®] (2 ou 4 mL L⁻¹). Fora testados os antioxidantes carvão ativado (3 g L⁻¹), PVP (5 g L⁻¹) e ácido ascórbico (1 g L⁻¹).

Aos 60 dias após a introdução do explantes, o tratamento 3 (meio de cultura suplementado com PVP e 2 mL L⁻¹ de PPM[®]) possuía 20 % dos explantes vivos e sem contaminação. Já os tratamentos 4 (imersão dos explantes em solução de ácido ascórbico e introdução em meio com 4 mL L⁻¹ de PPM[®]) e 6 (meio de cultura suplementado com PVP e 4 mL L⁻¹ de PPM[®]) apresentaram 13,4 % e o tratamento 5 (meio de cultura suplementado com carvão ativado e 4 mL L⁻¹ de PPM[®]) apresentou apenas 10 %. Nos tratamentos 1 (imersão dos explantes em solução de ácido ascórbico e suplementação do meio de cultura com 2 mL L⁻¹ de PPM[®]) e 2 (meio de cultura suplementado com carvão ativado (3 g L⁻¹) e 2 mL L⁻¹ de PPM[®]), todos os explantes morreram por contaminação fúngica (Figura 14).

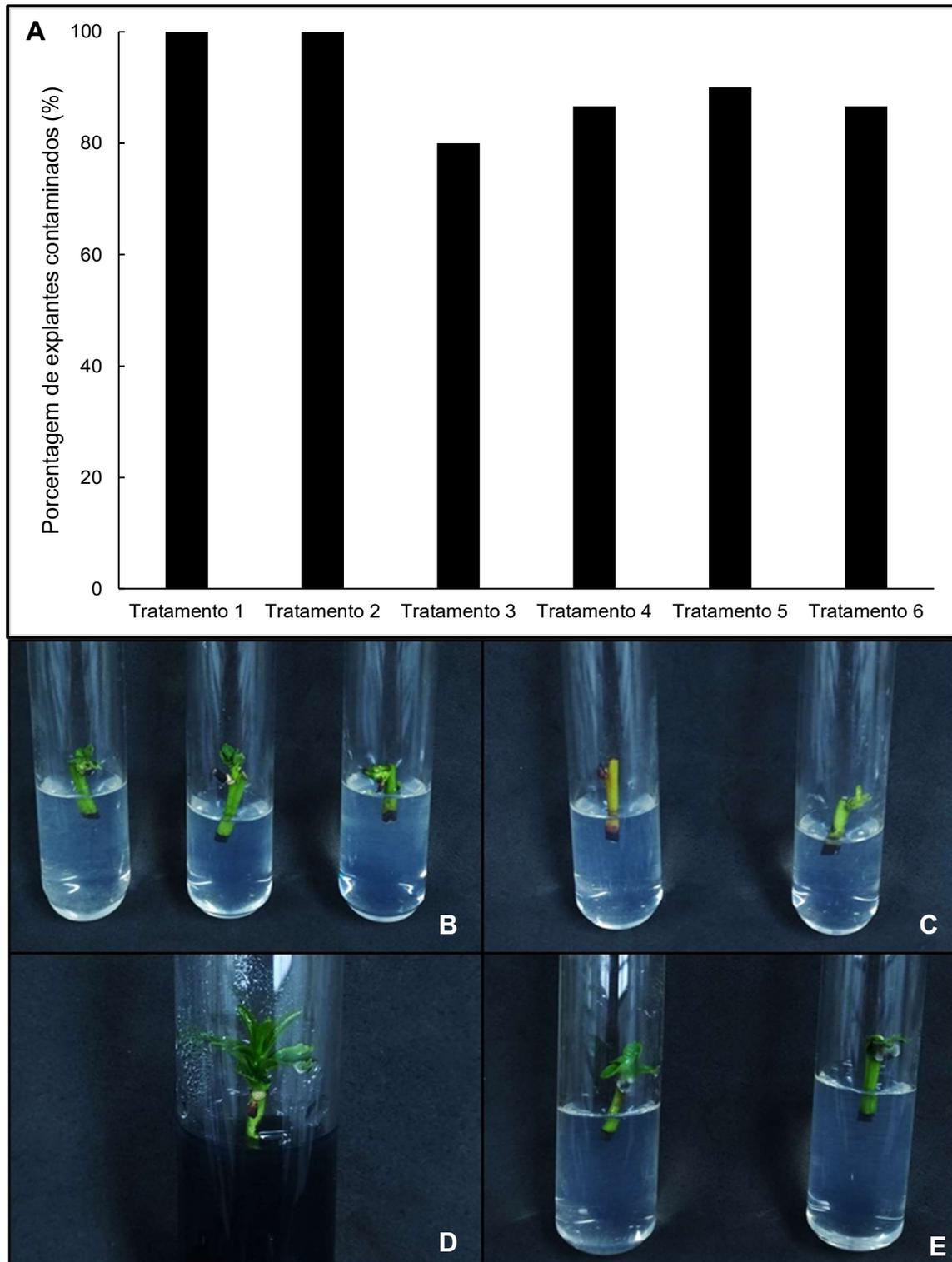


Figura 14. Avaliação dos segmentos nodais após 60 dias de introdução *in vitro*. (A) Porcentagem de contaminação dos segmentos nodais; ($n=15$); (B) Tratamento 3; (C) Tratamento 4; (D) Tratamento 5; (E) Tratamento 6. Legenda: Tratamento 1 - Imersão em ácido ascórbico (1 g L^{-1}) e meio de cultura suplementado com 2 mL L^{-1} de PPM[®]; Tratamento 2 - Meio de cultura suplementado com carvão ativado (3 g L^{-1}) e 2 mL L^{-1} de PPM[®]; Tratamento 3 - Meio de cultura suplementado com PVP (5 g L^{-1}) e 2 mL L^{-1} de PPM[®]; Tratamento 4 - Imersão em solução de ácido ascórbico (1 g L^{-1}) e introdução em meio com 4 mL L^{-1} de PPM[®]; Tratamento 5 - Meio de cultura suplementado com carvão ativado (3 g L^{-1}) e 4 mL L^{-1} de PPM[®]; Tratamento 6 - Meio de cultura suplementado com PVP (5 g L^{-1}) e 4 mL L^{-1} de PPM[®]

Aos 120 dias, os segmentos apresentaram brotações, mas não desenvolveram raízes (Figura 15A). Como é possível observar, o meio de cultura suplementado com carvão ativado (3 g L^{-1}) e 4 mL L^{-1} de PPM, apresentou um explante com bom desenvolvimento da parte aérea e índice de crescimento. Contudo, o explante apresentou contaminação por fungos, comprometendo sua sobrevivência e impossibilitando as próximas avaliações (Figura 15B).

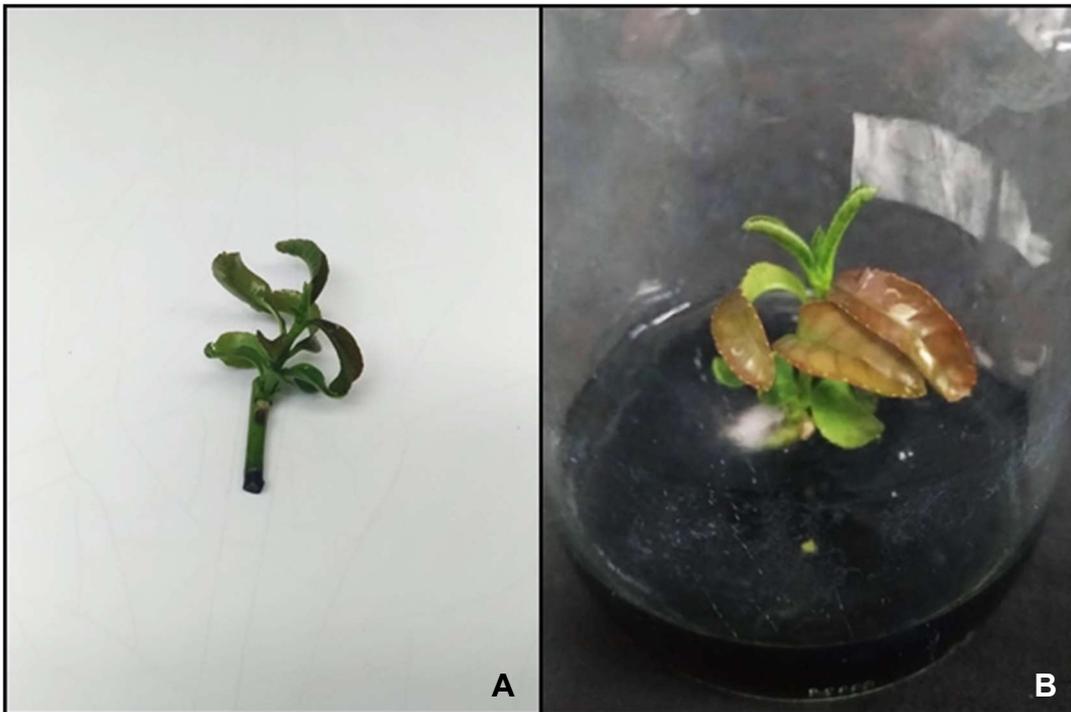


Figura 15. Segmento nodal cultivado em meio de cultura suplementado com carvão ativado (3 g L^{-1}) e 4 mL L^{-1} de PPM® (Tratamento 5). (A) Detalhe do segmento aos 120 dias, sem apresentar raízes. (B) Contaminação fúngica na base do explante que comprometeu a sobrevivência do mesmo

Apesar do uso da solução comercial de NaOCl a 1 % ter contido os agentes contaminantes de uma forma ligeiramente mais eficiente, ainda foi inviável realizar uma avaliação quanto aos efeitos dos antioxidantes no cultivo *in vitro* da espécie. Dutra et al. (2008) concluíram que o uso do hipoclorito de sódio de forma isolada na desinfestação não é suficiente para o estabelecimento ao longo prazo do explantes, devido à recontaminação dos mesmos, na maior parte dos casos, por bactérias.

5.2.6 Efeito de NaOCl e de PPM[®] no controle da contaminação

Objetivando otimizar as respostas dos experimentos anteriores e encontrar um protocolo adequado que fosse eficiente no controle da contaminação fúngica e bacteriana, um novo experimento de cultivo de segmentos nodais foi realizado com concentrações crescentes de NaOCl e com adição ou não de PPM[®] ao meio de cultura. Um estudo anterior demonstrou que o uso de PPM[®] em 1 ou 2 mL L⁻¹ de concentração, causou a recalcitrância dos explantes de erva-mate a longo prazo (Dutra et al., 2008). Portanto, no presente experimento, a concentração desse anticontaminante foi de 250 µL L⁻¹, visando buscar uma forma de manutenção dos explantes no meio MS suplementado com PPM[®], 8,8 µM de BA e 0,1 µM de ANA.

Os tratamentos consistiram de diluições de NaOCl comercial a 0,25; 0,5 ou 1 % para o processo de assepsia, associado com o meio de cultura suplementado com PPM[®] (0 ou 250 µL L⁻¹). Aos 60 dias após a introdução dos segmentos nodais, os tratamentos apresentaram diferença estatística para sobrevivência dos explantes (Tabela 8) e o tratamento 2 (NaOCl a 0,5 %, sem adição de PPM[®] ao meio) apresentou a maior porcentagem.

Tabela 8. Influência da concentração de NaOCl comercial e da presença de PPM[®] no meio de cultura ½ MS para o cultivo de segmentos nodais de erva-mate. Porcentagem de sobrevivência dos explantes ($n=20$), após 60 dias de cultivo

Tratamentos	Porcentagem (%)	
2 - NaOCl 0,5 % + 0 µL L ⁻¹ PPM [®]	40,0	a
6 - NaOCl 0,25 % + 250 µL L ⁻¹ PPM [®]	35,0	ab
3 - NaOCl 0,25 % + 0 µL L ⁻¹ PPM [®]	15,0	ab
5 - NaOCl 0,5 % + 250 µL L ⁻¹ PPM [®]	15,0	ab
1 - NaOCl 1 % + 0 µL L ⁻¹ PPM [®]	5,0	b
4 - NaOCl 1 % + 250 µL L ⁻¹ PPM [®]	5,0	b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em um estudo com erva-mate, Meneguzzi et al. (2016) testaram o efeito da assepsia de segmentos nodais, revelando uma taxa de sobrevivência dos explantes de 46,3 % ao serem imersos em solução diluída de 1 % de NaOCl comercial por 20 min. Já com o tempo de imersão de 10 min, somente 13,7 % dos explantes sobreviveram. No presente experimento, a sobrevivência dos explantes quando imersos em solução 1 % de NaOCl comercial por 10 min foi de apenas 5 %.

Quando o NaOCl comercial foi diluído a 0,5 %, a sobrevivência passou a ser 40 %. Isso ocorreu, devido aos altos índices de oxidação dos explantes, correlacionado ao aumento da dosagem de hipoclorito de sódio. Os resultados aqui obtidos corroboram com os de Dutra e Silva (2009), que demonstraram que apenas 5,25 % dos explantes sobreviveram, após a assepsia com solução diluída de NaOCl comercial a 1 % por 10 min. Também em explantes de erva-mate, foi obtido uma menor taxa de mortalidade quando os explantes foram imersos por 25 min em solução contendo 2 % de NaOCl (Horbach, 2008). Por sua vez, Zaniolo e Zanette (2001) obtiveram os melhores resultados em 0,5 % de NaOCl durante 15 min e 0,75 % durante 10 min, obtendo 72,9 e 68,7 % de sobrevivência, respectivamente. Esses resultados demonstram que o protocolo de assepsia com relação à concentração e tempo de imersão de NaOCl ainda não está bem definido para erva-mate.

Aos 120 dias após a introdução *in vitro*, os explantes apresentavam brotações (Figura 16). Esses resultados corroboram com os obtidos por Zaniolo e Zanette (2001), onde o maior índice de formação de brotações foi obtido em meio suplementado com 8,8 μM de BA, mesma dose utilizada nesse experimento. Contudo, já foi obtido regeneração de brotações de erva-mate em meio $\frac{1}{4}$ MS na ausência de reguladores de crescimento (Sansberro et al., 1999).

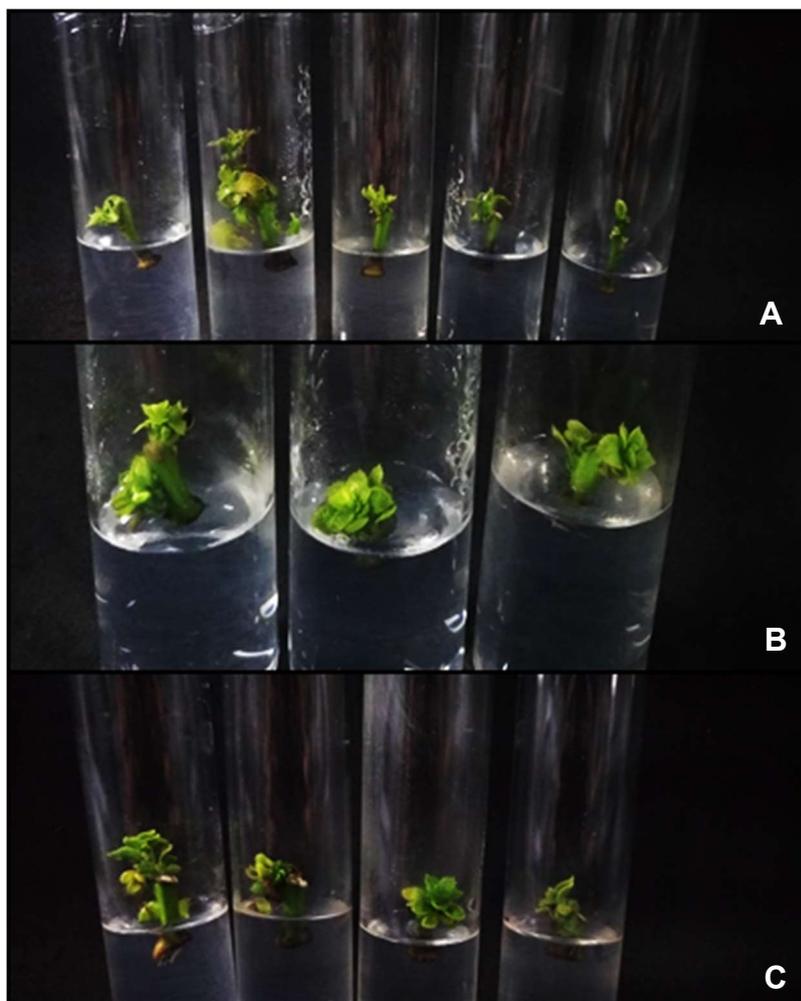


Figura 16. Segmentos nodais aos 120 dias após a introdução *in vitro*. (A) Segmento nodal desinfestado com NaOCl a 0,5 % e introduzido em meio sem PPM[®] (Tratamento 2); (B) Segmento nodal desinfestado com NaOCl a 0,25 % e introduzido em meio sem PPM[®] (Tratamento 3); (C) Segmento nodal desinfestado com NaOCl a 0,25% e introduzido em meio com 250 µL L⁻¹ de PPM[®] (Tratamento 6)

Para induzir o crescimento de raízes, os segmentos foram transferidos para meio ½ MS, suplementado com 5,37 µM de ANA, ou sem hormônios. Nesse novo meio, o PPM[®] não foi adicionado, para evitar a recalcitrância dos explantes. Aos 150 dias, os explantes introduzidos em meio sem hormônio apresentaram oxidação fenólica, ocasionando sua morte. Já os explantes introduzidos em meio suplementado com ANA, demonstraram uma estagnação do crescimento e não produziram raízes (Figura 17). Em erva-mate, já foram observados o crescimento interrompido e a coloração mais clara das brotações quando subcultivadas por longos períodos em meio de cultura ascrecido de BA (Zaniolo; Zanete, 2001). Isso indica que para o desenvolvimento de explantes de

erva-mate com brotações e raízes, é necessário encontrar um balanço adequado entre citocinina e auxina, visto que a suplementação dos meios de cultura somente com BA ou ANA, não proporciona o desenvolvimento adequado do explante.

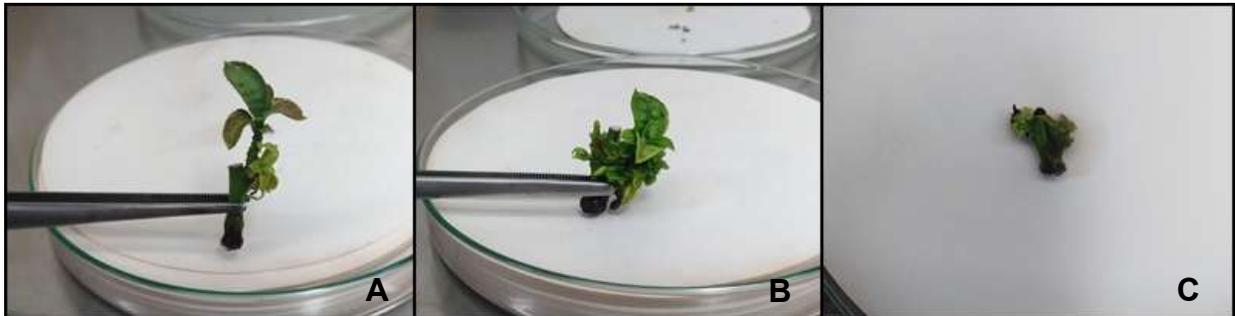


Figura 17. Segmentos nodais transferidos para meio suplementado com $5,37 \mu\text{M}$ de ANA, aos 150 dias. (A) Segmento nodal oriundo do Tratamento 2 (0,5 % de NaOCl e 0 de PPM[®]); (B) Segmento nodal oriundo do Tratamento 3 (0,25 % de NaOCl e 0 de PPM[®]); (C) Segmento nodal oriundo do Tratamento 6 (0,25 % de NaOCl e $250 \mu\text{L L}^{-1}$ de PPM[®])

Ainda, os segmentos nodais que permaneceram vivos, apresentaram contaminação bacteriana após 6 meses de subcultivo (Figura 18).



Figura 18. Segmento nodal de erva-mate em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com $5,37 \mu\text{M}$ de ANA, após 6 meses de subcultivo

A presença de bactérias na parte de contato do explante com o meio de cultivo após um certo período de subcultivos sucessivos, é um fato comumente observado em trabalhos com erva-mate. Alguns estudos demonstraram que se tratam de microrganismos endofíticos (Santos; Wendling, 2003; Horbach, 2011). Em geral,

essas bactérias não são patogênicas, mas podem comprometer a multiplicação, o crescimento e o enraizamento do explante, ao competir pelos nutrientes do meio de cultura (Grattapaglia; Machado, 1998). A recomendação para esse caso, é o descarte do material contaminado (Grattapaglia; Machado, 1998).

Os experimentos realizados com segmentos nodais de erva-mate, estão resumidos na Tabela 9. Não foi possível determinar um método eficiente para cultivo de segmentos nodais *in vitro*, além disso, foi observado um comportamento bastante diversificado entre os experimentos. Com relação aos processos de assepsia, sabe-se que além da concentração e do tempo de imersão em agentes desinfetantes, outros fatores podem influenciar. Por exemplo, como a época do ano, visto que a presença de patógenos no explantes é menor nos meses de primavera e verão (Paula, 1992; Bernasconi et al., 1998). Além do tamanho do explante, que é diretamente proporcional à presença de contaminantes (Bernasconi et al., 1996).

No que diz respeito ao uso dos antioxidantes, o carvão ativado, apesar de ser comumente utilizado em espécies lenhosas e em frutíferas como morangueiro, abacaxizeiro e bananeira, pode também inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizado (George; Sherrington, 1984; Roy, 1995). O uso do carvão ativado pode ser prejudicial às culturas, pois ele pode ser responsável por adsorver outras substâncias do meio nutritivo, como os reguladores de crescimento, acarretando consequências indesejáveis ao cultivo *in vitro* (Galdiano Junior, 2010). Como forma de contornar esse problema, sugere-se o aumento da concentração de auxina no meio de cultura (Paiva; Paiva, 2001). Esses fatos podem justificar a ausência de formação de raízes, nos experimentos em que foi utilizado carvão ativado.

Embora o estabelecimento *in vitro* de erva-mate já tenha sido reproduzido (Mroginski et al., 1997; Sansberro et al., 1999; Zaniolo; Zanette, 2001), ainda não há um protocolo de multiplicação definido. Dutra e Silva (2009) consideraram inviável a manutenção dos explantes por tempo superior a 30 dias, conclusão semelhante com a de Dutra et al. (2008), onde em função das altas taxas de contaminação e recalcitrância após o estabelecimento, presumem que a multiplicação *in vitro* de erva-mate é inexecutável.

Tabela 9. Resumo dos experimentos realizados de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais

Experimento	Diluição de solução comercial de NaOCl (%)	Meio de cultura	Avaliação
5.2.1	0,25	¼ MS + BA	100% de contaminação
5.2.2	0,25	WPM + Carvão ativado + PPM®	100% de contaminação
5.2.3	0,25 + Kasumin	WPM + 2 iP + ANA + Carvão ativado	100% de contaminação
5.2.4	0,5	MS + PPM® + Carvão ativado ou PVP	Contaminação fúngica na maior parte dos explantes, além da oxidação fenólica
5.2.5	1	MS + Carvão ativado ou PVP + PPM®	O hipoclorito de sódio puro foi eficiente na assepsia. Não houve enraizamento
5.2.6	0,25; 0,5 ou 1	½ MS + BA + ANA + PPM®	O tratamento de desinfestação a 0,5% e meio sem PPM® foi mais eficiente. Não houve enraizamento

5.3 Pré-teste com botões florais

Com relação a reprodução do protocolo de indução de embriogênese somática utilizando botões florais, conforme protocolo descrito por Li et al. (1998) e Maximova et al. (2002), a contaminação fúngica comprometeu o experimento inteiro aos 15 dias (Figura 19) sendo necessário realizar o descarte deste experimento.

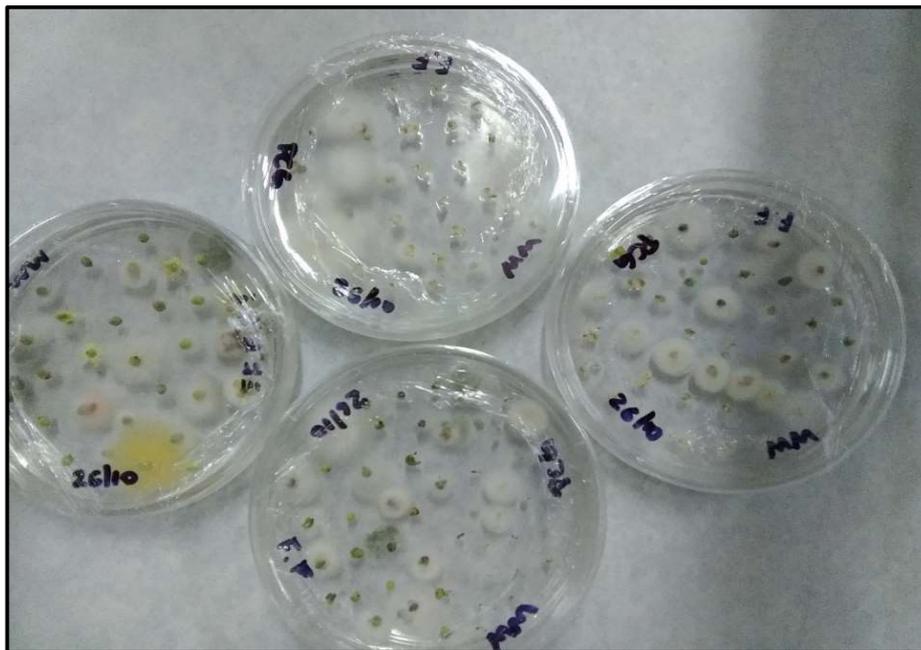


Figura 19. Presença de contaminantes fúngicos nos botões florais de erva-mate, após 15 dias de introdução *in vitro*

Além disso, um grande quesito foi a distância para coletar os botões florais e o tempo de deslocamento, com isso dificultando a execução de repetições do experimento. Da coleta dos botões florais até o momento de introdução *in vitro*, passaram-se cerca de 24 horas. Seria indicado nesse caso, manter as plantas em fase de florescimento acondicionadas em casa de vegetação próxima ao laboratório, para facilitar a condução dos experimentos e diminuir os índices de contaminação. A reprodução do protocolo de obtenção de embriogênese somática do cacauzeiro foi considerada, portanto, inviável. Sendo assim, o protocolo foi adaptado e passou a ser testado com explantes oriundos das folhas.

5.4 Obtenção de calogênese através de explantes foliares

Os métodos de cultura de tecidos como organogênese e embriogênese somática têm sido pouco explorados para erva-mate (Rey et al., 2002). Além disso, a cultura de calos é uma técnica utilizada para a produção de metabólitos secundários, úteis para as indústrias farmacêuticas (Dias; Degenhardt-Golbach, 2018) e para a produção de células para manipulações genéticas, como hibridizações somáticas e transformações (Venturieri; Venturieri, 2004). Esses fatos demonstram a importância de investir em pesquisas que propiciem o cultivo *in vitro* de erva-mate através dessas técnicas.

Para os experimentos que serão detalhados nos tópicos a seguir, a sobrevivência dos explantes e a formação de calos, foram avaliadas por meio da mensuração por notas de zero a dois: 0 - oxidação do explante ou presença de agentes contaminantes; 1 - explante vivo, mas sem apresentar formação de calos; 2 - explante com formação de calo, conforme ilustrado na Figura 20.

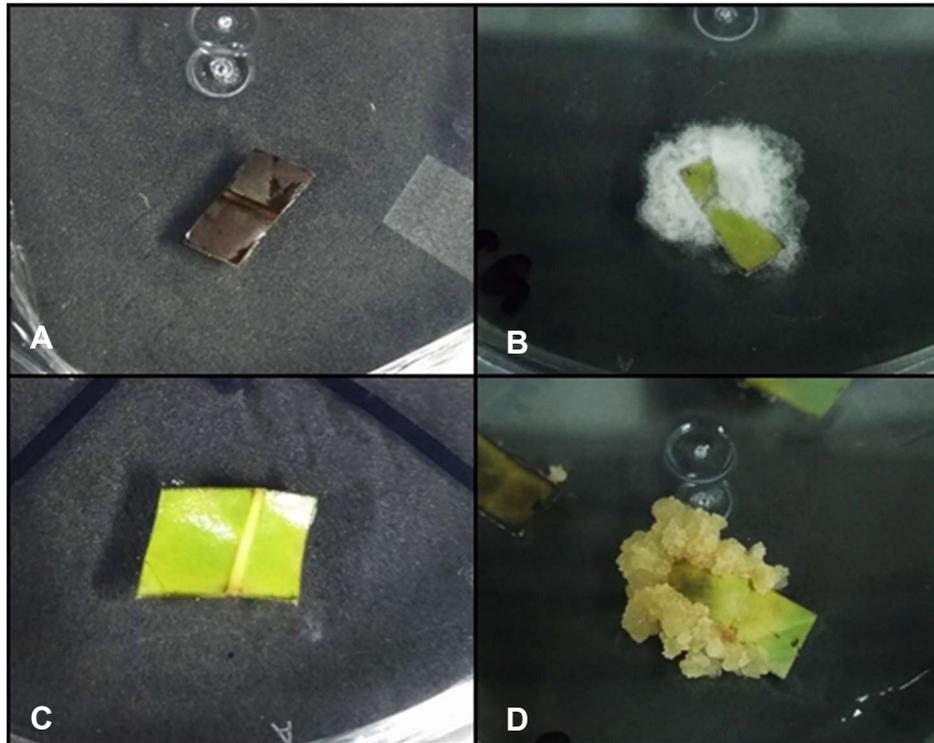


Figura 20. Classificação dos calos de erva-mate. (A) explante oxidado, nota 0 (B) explante contaminado, nota 0; (C) explante sadio sem presença de calos, nota 1; (D) explante contendo calos, nota 2

5.4.1 Efeito de diferentes concentrações de NaOCl na assepsia das folhas

Para testar um método eficiente de assepsia de folhas para o estabelecimento da calogênese, foi utilizado NaOCl nas concentrações 0,25; 0,5 e 1 % a partir da solução comercial, por 10 min. Na Tabela 10 é apresentado o teste de médias após a análise de variância da eficiência do NaOCl na assepsia das folhas. Observou-se que não houve diferença estatística entre o uso do NaOCl a 1 e 0,5 %, com maiores médias de notas indicando menor contaminação e maior sobrevivência. Por outro lado, o uso de solução a 0,25 % mostrou-se inferior e pouco eficiente para o controle de agentes contaminantes.

Tabela 10. Influência da concentração de NaOCl no controle de agentes contaminantes ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes), após 30 dias de cultivo, avaliada por meio de notas

Concentração de diluição de solução comercial de NaOCl (%)	Médias das Notas de Calogênese
1 %	(¹)0,775 a
0,5 %	0,6 a
0,25 %	0,15 b

(1) Médias das notas variando entre 0 (morte do explante), 1 (explante vivo, sem formar calos) e 2 (explantes com formação de calos).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os explantes do presente experimento apresentaram índices de contaminação de 85, 40 e 22 % diluído nas soluções de 0,25; 0,5 e 1% de NaOCl, respectivamente (Figura 21). Stachevski et al. (2011) avaliaram o uso de NaOCl na assepsia de folhas de erva-mate, nas concentrações de 5; 7,5 e 10 %, por 20 min de imersão na solução. Os autores observaram após 7 dias de introdução, índices de contaminação de 40, 32 e 6 %, relativos as concentrações de 5; 7,5 e 10% respectivamente.

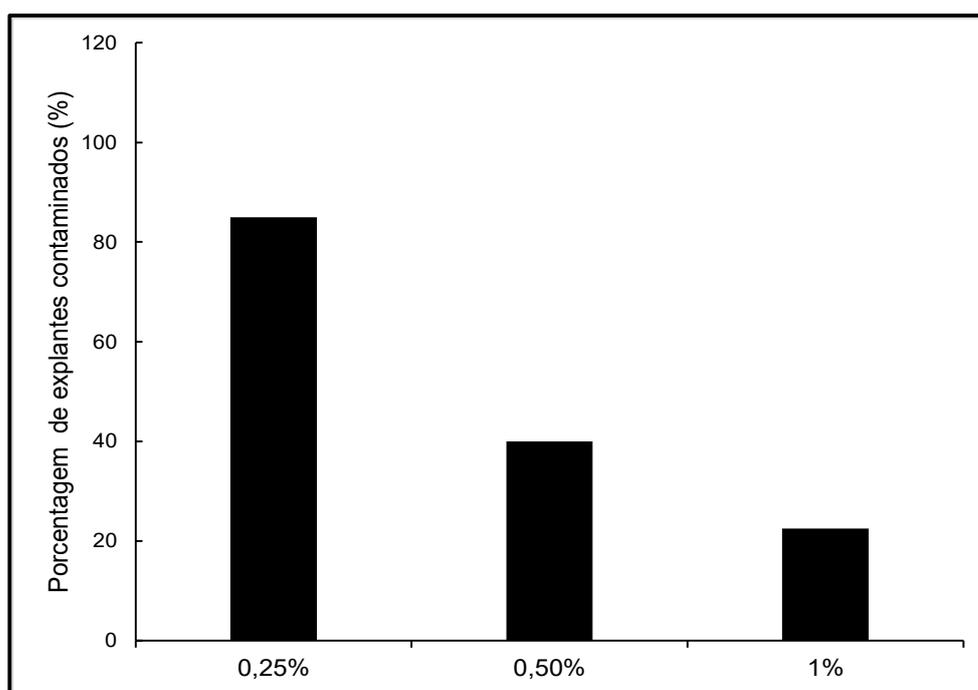


Figura 21. Porcentagem de contaminação de explantes aos 30 dias, respectiva à assepsia dos explantes com soluções de NaOCl comercial a 0,25; 0,5 e 1 %; ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes)

Ademais, a imersão das folhas em NaOCl comercial a 1 % por 10 min não causou oxidação às mesmas e nem comprometeu a confecção dos explantes (Figura 22).

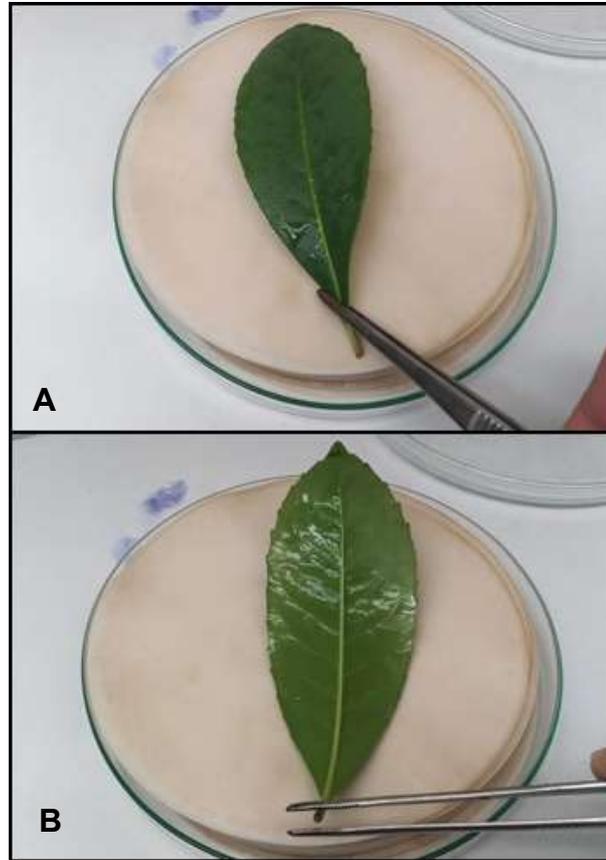


Figura 22. Folha de erva-mate após o processo de assepsia com NaOCl comercial a 1 %, sem apresentar tendências à oxidação. (A) Face adaxial; (B) Face abaxial

Esses resultados indicam, que o uso de NaOCl comercial com a solução a 1 % por 10 min de imersão, fornece índices satisfatórios para a assepsia das folhas, podendo ser empregado no desenvolvimento do protocolo de desinfestação.

5.4.2 Efeito da posição no meio de cultura, do modo de recorte e do tamanho dos explantes na sobrevivência e indução de calos *in vitro*

Para otimizar a introdução de explantes foliares de erva-mate *in vitro*, visando maximizar as taxas de sobrevivência e indução de calos, foi realizado um experimento de introdução de explantes em variadas posições, modo de recorte e tamanho. Com relação à influência da posição do explante em contato com o meio, os mesmos foram introduzidos com a face adaxial ou abaxial em contato com o meio de cultura PCG. A face adaxial apresentou menor mortalidade de explantes e maior formação de massa calogênica em comparação à face abaxial (Tabela 11; Figura 23).

Tabela 11. Influência da posição do explante em contato com o meio de cultura ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes), após 90 dias de cultivo, avaliada por meio de notas

Face do explante em contato com o meio	Médias das Notas de Calogênese
adaxial	⁽¹⁾ 2,275 a
abaxial	0,45 b

(1) Médias das notas variando entre 0 (morte do explante), 1 (explante vivo, sem formar calos) e 2 (explantes com formação de calos).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

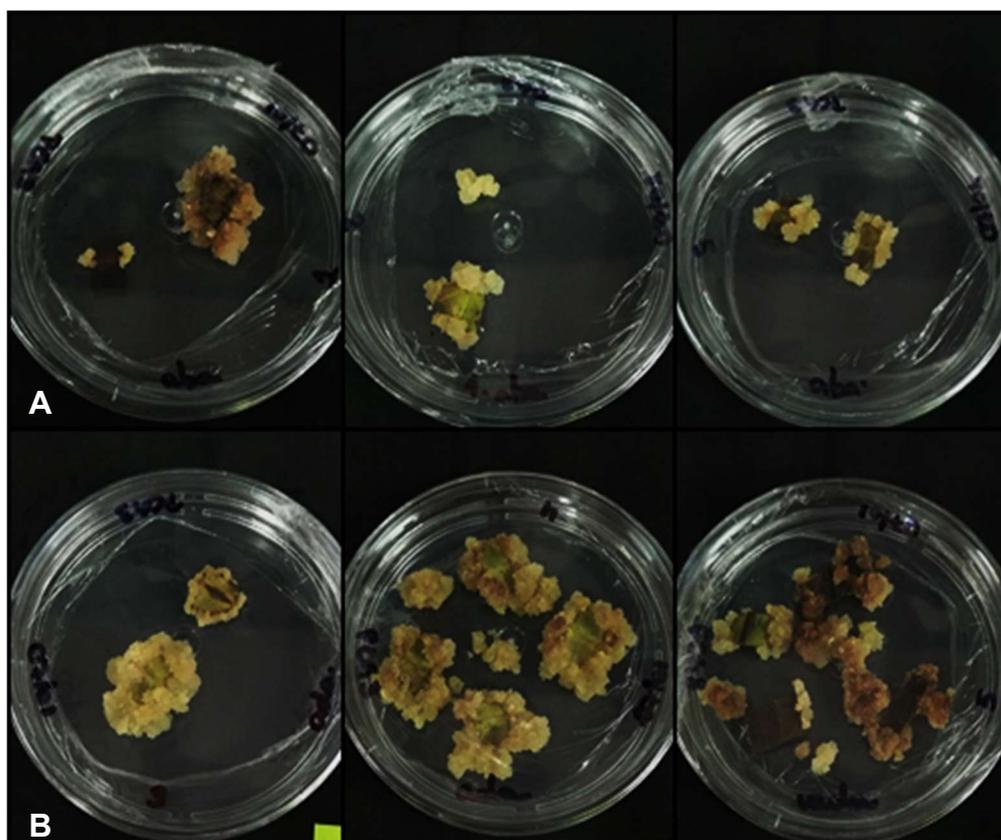


Figura 23. Calos foliares de erva-mate, aos 90 dias após a introdução. (A) Painel superior: Explantes introduzidos com o lado abaxial em contato com o meio; (B) Painel inferior: Explantes introduzidos com o lado adaxial em contato com o meio

Já com respeito aos recortes dos explantes, foi avaliada a introdução de explantes do limbo foliar com a nervura e apenas do limbo, em meio de cultura PCG. Foi observado a mortalidade de 75 % dos explantes recortados com a nervura central, e 25 % sobreviveram e formaram calos, aos 90 dias. Já os explantes constituídos

apenas do limbo foliar apresentaram oxidação em 50 % e os outros 50 % foram contaminados por fungo (Figura 24). Portanto, apesar do índice baixo de sobrevivência nesse experimento em questão, é possível concluir que somente os explantes foliares com nervura conseguiram se desenvolver e formar calos.

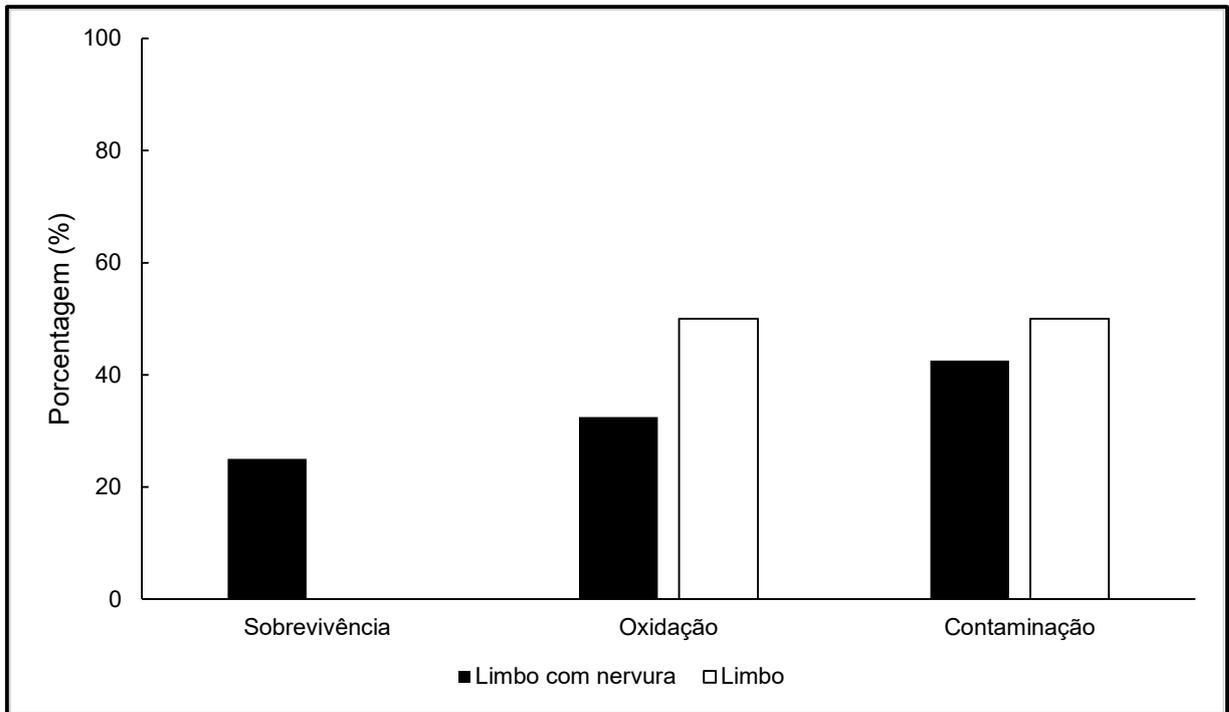


Figura 24. Porcentagem de sobrevivência, oxidação e contaminação dos explantes recortados com a nervura central ou apenas com o limbo foliar, aos 90 dias de introdução; ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes)

Quando um órgão da planta é seccionado em partes, os vários segmentos diferem na sua capacidade morfogênética (Tang et al., 2002). A capacidade regenerativa pode estar relacionada à presença de um gradiente de fitorreguladores endógenos ou à interação entre os fitorreguladores endógenos e os reguladores de crescimento exógenos, responsáveis pela diferente regeneração dos distintos segmentos da folha (Tang et al., 2002).

Com relação à influência do tamanho do explante, foram introduzidos explantes de tamanho 0,5 ou 1 cm², em meio de cultura PCG. A análise de variância demonstrou que não há diferença estatística na sobrevivência e formação de calos, entre explantes maiores (1 cm²) e explantes menores (0,5 cm²) (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito do tamanho do explantes foliares de erva-mate na sobrevivência e na indução de calos ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes), após 90 dias de cultivo, avaliada por meio de notas

Tamanho do Explante	Médias das Notas de Calogênese
0,5 cm ²	⁽¹⁾ 0,975 a
1 cm ²	0,6 a

(1) Médias das notas variando entre 0 (morte do explante), 1 (explante vivo, sem formar calos) e 2 (explantes com formação de calos).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os resultados demonstraram que o recorte dos explantes foliares contendo a nervura central e a introdução com a face adaxial voltada para o meio de cultura, apresentaram maior sobrevivência e indução de calos. Dessa forma, os experimentos descritos a seguir foram todos realizados com os explantes contendo a nervura ao serem recortados, introduzidos com a face adaxial em contato com o meio de cultura e com tamanho padronizado de 0,5 cm².

5.4.3 Respostas dos explantes foliares ao cultivo em meio PCG, SCG e ED

Considerando que durante a introdução de botões florais (ver item 5.3) reproduzindo o protocolo de embriogênese somática de cacauero (Li et al., 1998; Maximova et al., 2002) não foi possível observar a formação de calos, o mesmo protocolo foi testado para segmentos foliares de erva-mate. Os explantes foram introduzidos em meio PCG, após 14 dias foram transferidos para meio SCG e passados mais 14 dias, transferidos para meio ED, onde foram mantidos até o final do experimento. Os calos de erva-mate não apresentaram formação de embriões somáticos após 90 dias de introdução (Figura 25). Teixeira et al. (2002) ao reproduzirem o protocolo de embriogênese somática de cacauero, observaram a formação de embriões ao final da segunda semana de cultivo em meio ED, apresentando embriões desde a fase cordiforme até o início da fase cotiledonar.

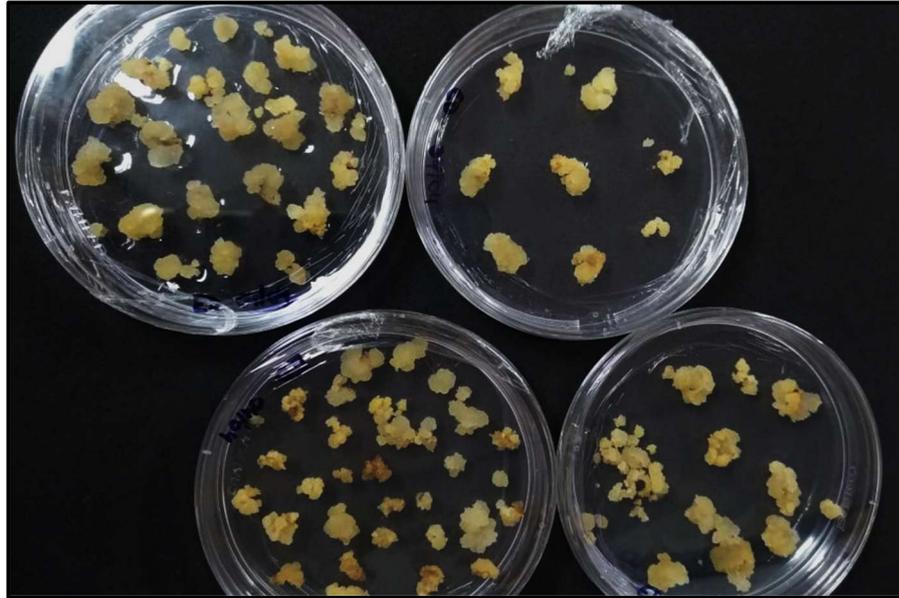


Figura 25. Calos foliares de erva-mate em meio ED, após 90 dias de introdução, sem resposta à indução de embriões somáticos

O meio de cultivo ED que não possuía suplementação hormonal, foi então alterado e adicionado GA₃ (1,44 µM) em um fatorial de concentrações de ANA (0; 5, 37 ou 10,74 µM) e BA (0; 4,44 ou 8,88 µM) a fim de estimular o desenvolvimento dos calos. Os tratamentos também foram transferidos para condição de fotoperíodo. Aos 150 dias após a introdução, os calos dos tratamentos 6 (1,44 µM de GA₃, 4,44 µM de BA e 10,74 µM de ANA) e 8 (1,44 µM de GA₃, 8,88 µM de BA e 5,37 µM de ANA) destacaram-se dos demais tratamentos, por apresentarem a coloração verde (Figura 26). Nota-se que o balanço entre auxina e citocinina nos tratamentos que apresentaram calos com coloração verde são diferentes, no tratamento 6 a proporção é de 2:1 e no tratamento 8, é de 1:2. Isso demonstra que o contraste nos níveis de citocinina e auxina disponíveis no meio de cultura, podem afetar no desenvolvimento do calo e conferir diferentes resultados à aparência dos mesmos.

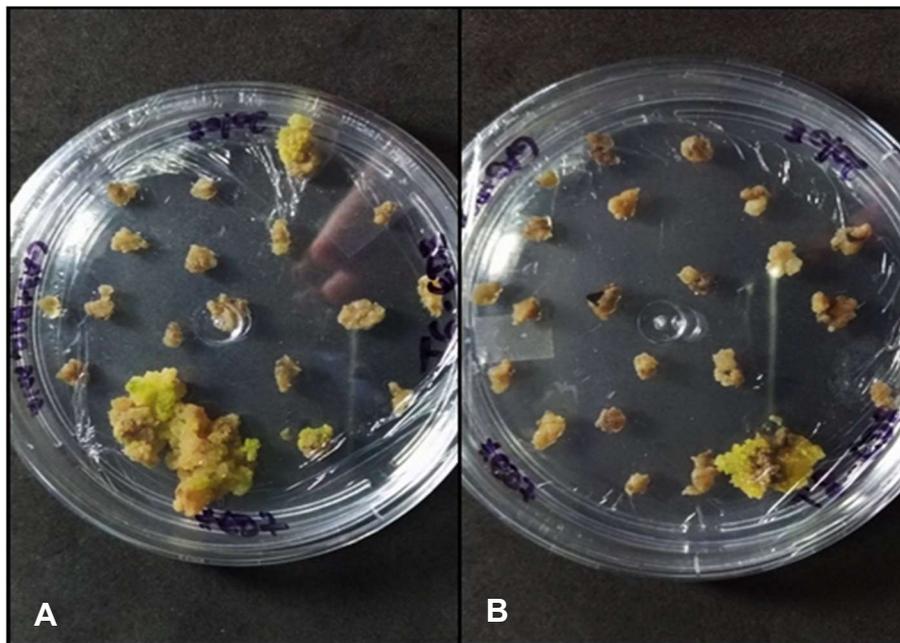


Figura 26. Aparência dos calos aos 150 dias, mantidos em condição de fotoperíodo. (A) Calos mantidos em meio ED com adição de $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 , $4,44 \mu\text{M}$ de BA e $10,74 \mu\text{M}$ de ANA (Tratamento 6). (B) Calos mantidos em meio ED com adição de $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 , $8,88 \mu\text{M}$ de BA e $5,37 \mu\text{M}$ de ANA (Tratamento 8)

Entretanto, depois de 8 meses sendo subcultivados no mesmo meio de cultura, os calos perderam a coloração verde e não exibiram resposta ao tratamento hormonal, seja na formação de embriões, de brotações ou de raízes (Figura 27).

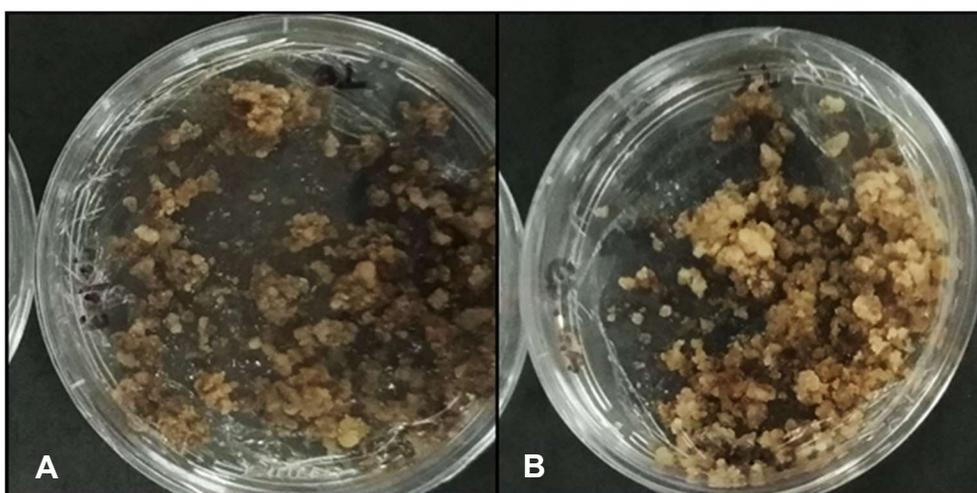


Figura 27. Aparência dos calos aos 12 meses de condução do experimento, mantidos em condição de fotoperíodo. (A) Calos mantidos em meio ED com adição de $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 , $4,44 \mu\text{M}$ de BA e $10,74 \mu\text{M}$ de ANA (Tratamento 6). (B) Calos mantidos em meio ED com adição de $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 , $8,88 \mu\text{M}$ de BA e $5,37 \mu\text{M}$ de ANA (Tratamento 8)

Os protocolos descritos por Lopez Baez et al. (1993) e Li et al. (1998), para embriogênese somática de cacaueteiro, formam dois tipos de calo (1 e 2). O calo tipo 1 é friável, esbranquiçado e bem desenvolvido, além de pouco embriogênico; já o calo tipo 2 é pouco desenvolvido, com crescimento restrito ao local de corte do explante e com maior tendência à oxidação, além de serem mais embriogênicos, com o embrião surgindo na porção mais oxidada (Teixeira et al., 2002). No caso dos calos observados no presente experimento, oriundos de explantes foliares de erva-mate, a aparência se assemelha à descrição do calo tipo 2 de cacaueteiro, com altos índices de oxidação. Contudo, após o décimo segundo mês de manutenção no meio ED, os calos não apresentaram mais multiplicação celular e estagnaram o crescimento, indicando uma possível morte celular (fase de declínio). Portanto, o protocolo de embriogênese somática de cacaueteiro possibilitou a formação de calos a partir dos explantes foliares de erva-mate, mas a multiplicação desses calos cessou após 8 meses da introdução *in vitro*.

5.4.4 Efeito dos meios PCG e SCG com variação nos reguladores hormonais

No experimento executado para determinar a influência dos meios PCG e SCG, na calogênese *in vitro* de erva-mate, os explantes foram introduzidos e mantidos por 30 dias em meio PCG suplementado com 2,4-D (0; 4,5; 9 ou 13,5 μM) e TDZ (0,011; 0,022 ou 0,033 μM) e depois, transferidos para meio SCG suplementado com BA (0; 1,4 ou 2,8 μM) e 2,4-D (0; 9,04 ou 18,08 μM), todos gelificados com Phytigel. Após 30 dias cultivados em meio PCG, os explantes apresentaram uma produção de 50 % em calos. Os tratamentos não apresentaram diferença estatística quanto à sobrevivência dos explantes. Aos 60 dias, já em meio SCG, os explantes que foram introduzidos no tratamento 12 (meio PCG contendo 13,56 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ) e que foram transferidos para tratamento 1 (Meio SCG suplementado com 1,4 μM de BA e sem 2,4-D) apresentaram formação de raízes adventícias (Figura 28A). Contudo, aos 90 dias, essas raízes não apresentaram crescimento e permaneceram estagnadas (Figura 28B). A formação de raízes em explantes foliares de erva-mate já foi observada quando cultivados em meio WPM suplementado com zeatina (4,56 μM) e 2,4-D (4,52 μM) (Stachevski et al., 2013). Vale destacar que no presente experimento, as raízes se formaram na ausência de auxinas, enquanto o trabalho citado, descreveu um balanço positivo para citocinina em relação à auxina no meio de cultura.

Aos 90 dias, os calos cultivados no tratamento 2 (meio suplementado apenas com 2,4-D) não se mostraram responsivos e apresentaram uma estagnação no desenvolvimento (Figura 28C). Já os calos subcultivados nos tratamentos 3 (1,4 μM de BA e 9,04 μM de 2,4-D) e 4 (2,8 μM de BA e 18,08 μM de 2,4-D) apresentaram coloração esverdeada, ambos os tratamentos possuíam um balanço positivo para auxina em relação à citocinina no meio de cultura (Figura 28 D e E).

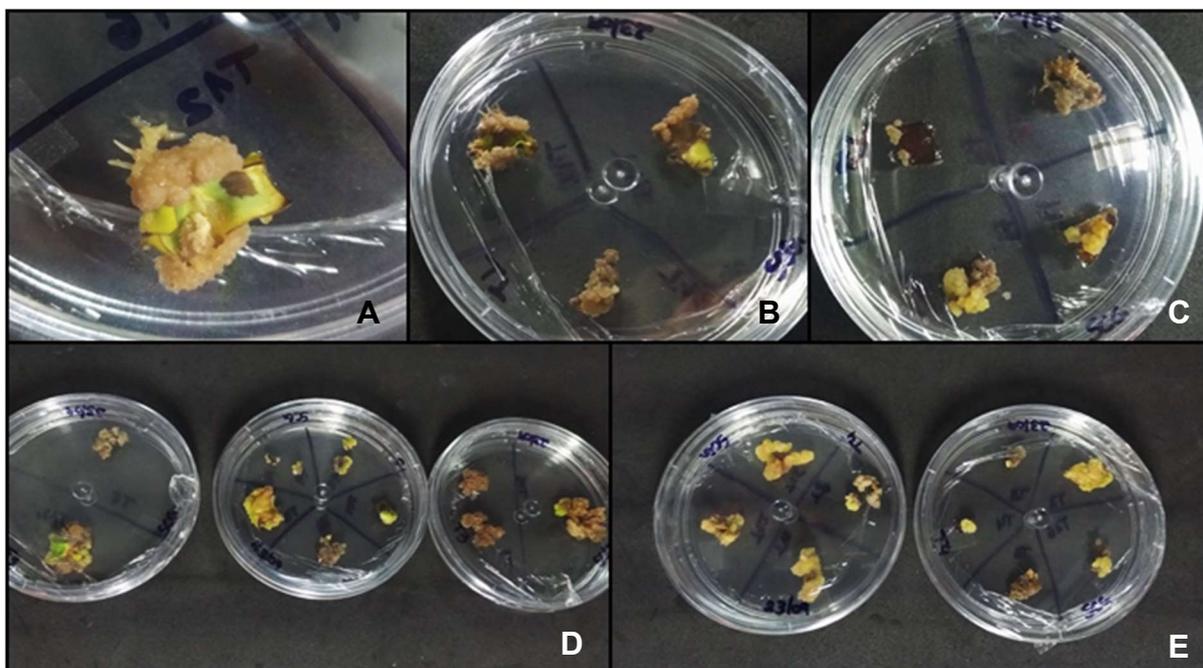


Figura 28. Calos foliares de erva-mate cultivados em meio SCG em condição de fotoperíodo. (A) Calo com presença de raízes, cultivado em meio SCG suplementado com 1,4 μM de BA (Tratamento 1) aos 60 dias. (B) Calos do tratamento 1 aos 90 dias. (C) Calos cultivados em meio SCG suplementado com 9,04 μM de 2,4-D (Tratamento 2) aos 90 dias. (D) Calos cultivados em meio SCG suplementado com 1,4 μM de BA e 9,04 μM de 2,4-D (Tratamento 3) aos 90 dias. (E) Calos cultivados em meio SCG suplementado com 2,8 μM de BA e 18,08 μM de 2,4-D (Tratamento 4) aos 90 dias

Após 12 meses sendo subcultivados no meio de mesma composição, os calos não apresentaram nenhuma resposta ou desenvolvimento morfológico, além de perderem a tonalidade inicial e passarem a uma tonalidade escura e indicativa de oxidação fenólica (Figura 29).

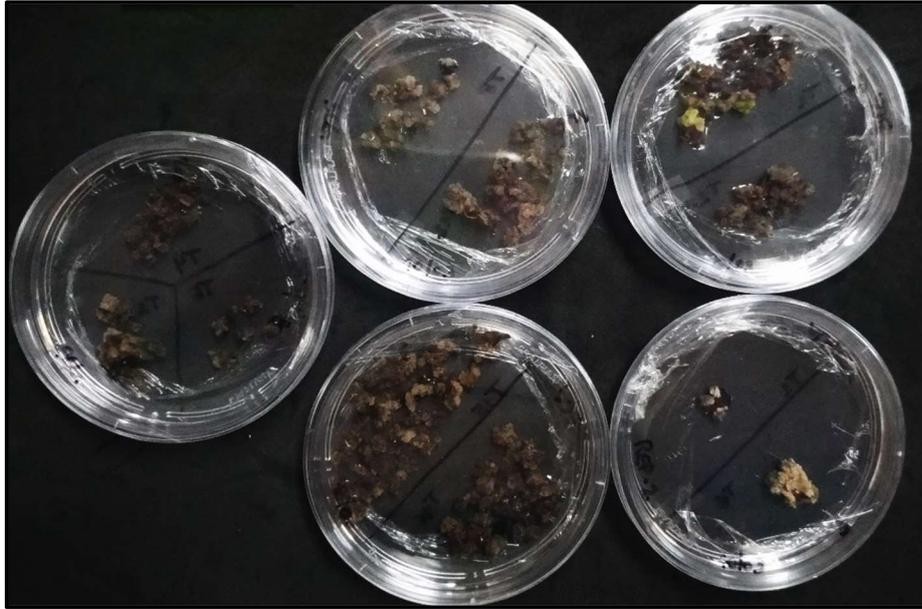


Figura 29. Aspecto dos calos ao final dos 12 meses de subcultivo

5.4.5 Efeito do ágar como agente gelificante

Ao avaliar a influência do ágar como agente gelificante no processo de indução de calos, os explantes foliares foram introduzidos em meio de idêntica composição ao do experimento anterior, PCG suplementado com 2,4-D (0; 4,5; 9 ou 13,5 μM) e TDZ (0,011; 0,022 ou 0,033 μM), gelificado com ágar. Aos 30 dias após a introdução *in vitro*, houve mortalidade total dos explantes, por oxidação fenólica. Esse resultado demonstrou que o uso do ágar como agente gelificante não é indicado para o cultivo *in vitro* de explantes de erva-mate, sendo recomendada a utilização do Phytigel.

Para algumas espécies, o ágar é capaz de induzir o desenvolvimento de calos nos explantes, sendo então, utilizado como agente gelificante nas técnicas de calogênese (Jin et al., 1997). Em *Grateloupia doryphora* M. A. Howe, *Kappaphycus alvarezii* Doty e *Gelidiella acerosa*, foram observadas correlações positivas entre a concentração de ágar e a formação de calos (Robaina et al., 1990; Reddy et al., 2003; Kumar et al., 2004). Já no crescimento *in vitro* de brotos de rosa (*Rosa* sp.), quando estudado o efeito dos agentes gelificantes, um maior número de brotos, de número de folhas por broto e de massa fresca foram obtidos com o uso de Phytigel, (Nestáková et al., 2000). As variações de resposta quanto ao uso de diferentes agentes solidificantes no crescimento *in vitro* podem ser atribuídas às características físico-químicas de cada um, que interferem na taxa de difusão dos nutrientes do meio (Debergh, 1983; Nairn et al., 1995).

5.4.6 Efeito dos meios PCG e ED com balanço dos reguladores hormonais

Este experimento foi conduzido visando encontrar um balanço hormonal em que os calos fossem responsivos e observar o efeito da adição do extrato de malte ao meio de cultura. Os explantes foram introduzidos em meio PCG suplementado com 2,4-D (2,26; 4,52 ou 9,04 μM), TDZ (0,022 μM) e extrato de malte (0,5 g L^{-1}). Após 30 dias da introdução *in vitro*, os explantes do tratamento 1 (9,04 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ) apresentaram 70 % de sobrevivência, e desses, 44,5 % com formação de calos; o tratamento 2 (4,52 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ) apresentou 85 % de sobrevivência, onde 33,3 % desses formaram calos; o tratamento 3 (2,26 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ) apresentou 62,5 % de sobrevivência dos explantes, onde 11,2 % formaram calos (Figura 30).

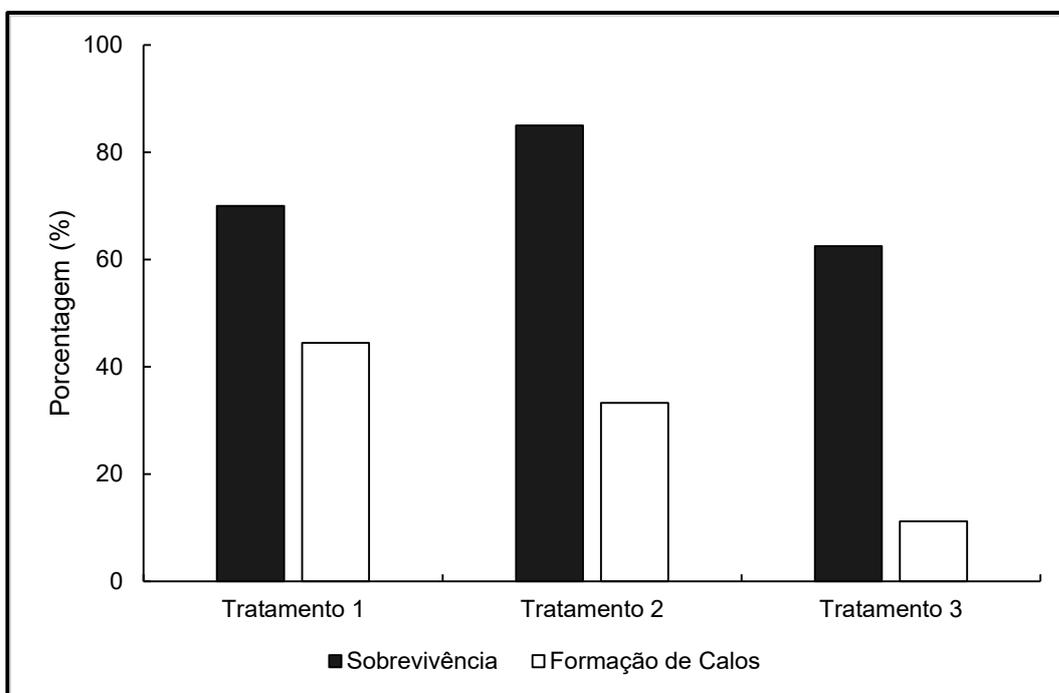


Figura 30. Porcentagem de sobrevivência e de formação de calos de explantes cultivados em meio PCG, aos 30 dias; ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes). Legenda: Tratamento 1 - 9,04 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ; Tratamento 2 - 4,52 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ; Tratamento 3 - 2,26 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ

O TDZ é uma substância com efeito de citocinina com grande potencial de estímulo de formação de calos em plantas lenhosas (Huetteman; Preece, 1993). Segundo Eapen et al. (1998), o TDZ é capaz de aumentar a disponibilidade da citocinina endógena. Em explantes de macieira cultivados em meio de cultura sem TDZ, observou-se uma proliferação celular nula, indicando que o processo é

dependente desse hormônio (Micheluzzi, 2007). Já o 2,4-D é uma auxina sintética comumente utilizada para a indução de calos. Além de ser uma auxina mais ativa, pode substituir o ácido indolacético (auxina natural), pois esta é rapidamente degradada no meio de cultura (Santos, 1998). Em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) quando o TDZ foi combinado com 2,4-D não foi observada a iniciação de calos friáveis (Cavalcante, 2001). Já em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), não se verificou efeito positivo na utilização de BA ou TDZ em interação com 2,4-D na indução de calos (Nogueira et al., 2007).

Aos 60 dias, os calos foram subcultivados em meio ED suplementado com BA 0; 4,44 ou 8,88 μM), ANA (0; 5,37 ou 10,74 μM) e extrato de malte (0,5 g L⁻¹) e divididos entre condição de escuro ou fotoperíodo. Nesse meio de nova composição, alguns tratamentos foram encerrados, pois os explantes morreram por contaminação (81,8 %) e por oxidação fenólica (18,2 %). Foram eles, dos cultivados no escuro: oriundos do meio PCG (T2): T5 e T6 e do meio PCG (T3): T9. Cultivados em fotoperíodo: oriundos do meio PCG (T1): T1 e T8, do meio PCG (T2): T5, T6 e T7 e meio PCG (T3): T1, T3 e T9. As maiores diferenças na aparência puderam ser observadas entre os calos que foram cultivados em fotoperíodo (Figura 31) e no escuro (Figura 32). Os calos cultivados em fotoperíodo possuíam uma textura aquosa. Segundo Grando et al. (1993), calos aquosos são formados por tecido esponjoso branco translúcido sem consistência e não apresentam capacidade de regeneração. De Lima (2006) também observou essa aparência aquosa nos calos de *Vanilla planifolia* (Baunilha) cultivados em condição de fotoperíodo.

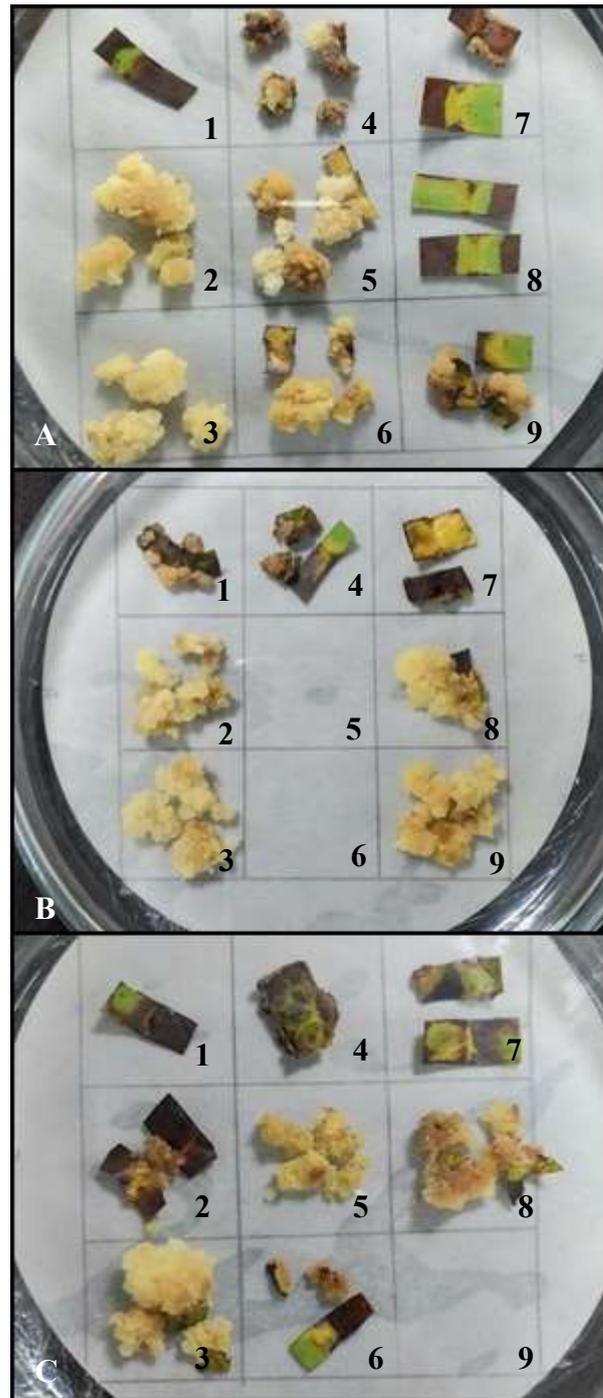


Figura 31. Calos de erva-mate que permaneceram no escuro aos 60 dias após a introdução. (A) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 9,04 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 1); (B) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 4,52 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 2); (C) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 2,26 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 3). Legenda: 1- meio ED sem hormônios; 2- meio ED + ANA (5,37 μM); 3- meio ED + ANA (10,74 μM); 4- meio ED + BA (4,44 μM); 5- meio ED + BA (4,44 μM) + ANA (5,37 μM); 6- meio ED + BA (4,44 μM) + ANA (10,74 μM); 7- meio ED + BA (8,88 μM); 8- meio ED + BA (8,88 μM) + ANA (5,37 μM); 9- meio ED + BA (8,88 μM) + ANA (10,74 μM)

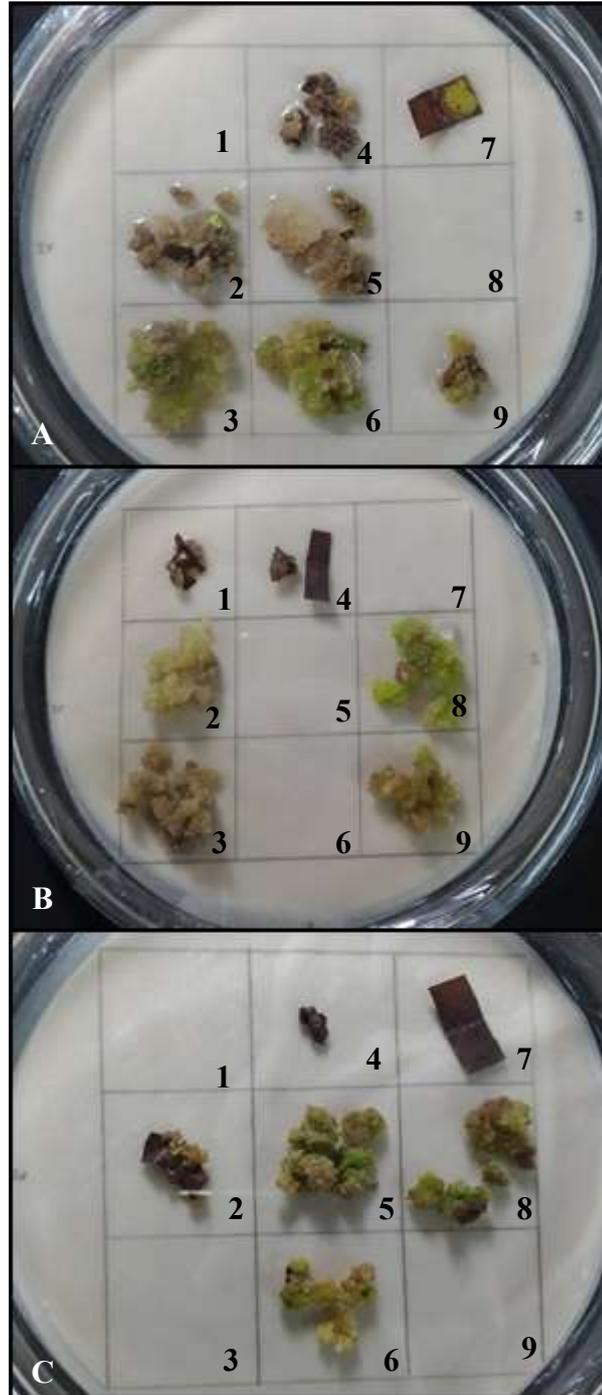


Figura 32. Calos de erva-mate que permaneceram em condição de fotoperíodo aos 60 dias após a introdução. (A) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 9,04 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 1); (B) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 4,52 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 2); (C) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 2,26 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 3). Legenda: 1- meio ED sem hormônios; 2- meio ED + ANA (5,37 μM); 3- meio ED + ANA (10,74 μM); 4- meio ED + BA (4,44 μM); 5- meio ED + BA (4,44 μM) + ANA (5,37 μM); 6- meio ED + BA (4,44 μM) + ANA (10,74 μM); 7- meio ED + BA (8,88 μM); 8- meio ED + BA (8,88 μM) + ANA (5,37 μM); 9- meio ED + BA (8,88 μM) + ANA (10,74 μM)

Aos 120 dias, os calos que foram cultivados no escuro, apresentaram oxidação fenólica e perderam a tonalidade clara e o aspecto friável (Figura 33).

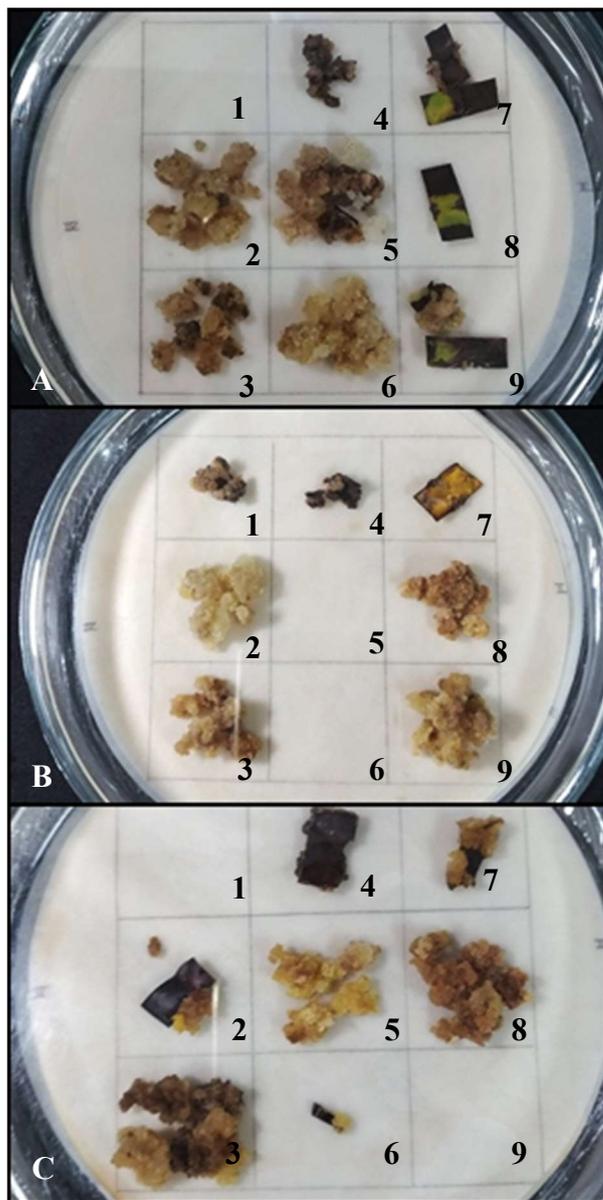


Figura 33. Calos de erva-mate que permaneceram no escuro aos 120 dias após a introdução. (A) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 9,04 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 1); (B) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 4,52 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 2); (C) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de 2,26 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ (Tratamento 3)). Legenda: 1- meio ED sem hormônios; 2- meio ED + ANA (5,37 μM); 3- meio ED + ANA (10,74 μM); 4- meio ED + BA (4,44 μM); 5- meio ED + BA (4,44 μM) + ANA (5,37 μM); 6- meio ED + BA (4,44 μM) + ANA (10,74 μM); 7- meio ED + BA (8,88 μM); 8- meio ED + BA (8,88 μM) + ANA (5,37 μM); 9- meio ED + BA (8,88 μM) + ANA (10,74 μM)

O extrato de malte é uma forma orgânica de nitrogênio, que fornece um conjunto de aminoácidos capaz de estimular o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de muitas espécies (Torres et al., 1998). Na indução de calos embriogênicos de cafeeiro, a suplementação do meio de cultura com extrato de malte apresentou 18 % de formação desse tipo de calo, já o tratamento sem esse componente não apresentou calos embriogênicos (Bartos, 2012). Contudo, na indução de calos de explantes foliares de erva-mate, o extrato de malte não induziu a formação de calos embriogênicos.

Com relação ao o efeito da luz na indução de embriogênese somática em cacauero, o cultivo dos estaminóides em condição de fotoperíodo teve um efeito inibitório na indução dos calos embriogênicos e no número de embriões formados (Teixeira et al., 2002). Como nos calos de erva-mate, nenhum tratamento induziu a formação de embriões, não foi possível afirmar que as condições de escuro ou fotoperíodo influenciaram nesse sentido. As diferenças observadas entre os tratamentos (luz x escuro) foram apenas na coloração e consistência dos calos.

Após 9 meses sendo subcultivados no mesmo meio de cultura, os calos de todos os tratamentos adquiriram uma consistência dura (não friável) e passaram a ter uma cor escura (Figura 34). Os calos também, apresentaram estagnação no crescimento, indicando que não havia mais multiplicação celular.

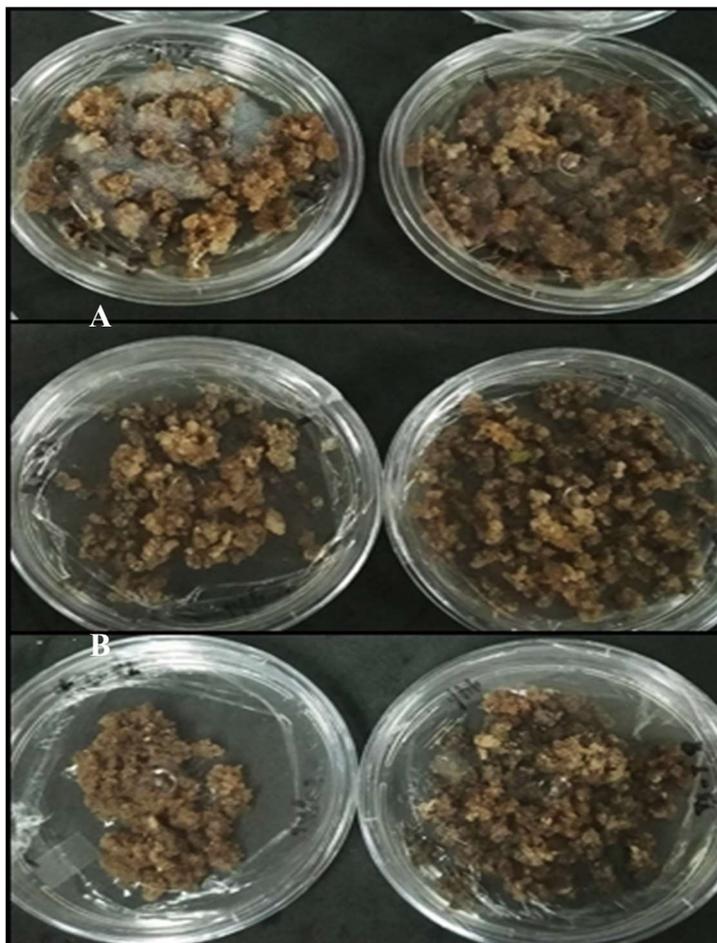


Figura 34. Calos de erva-mate com 9 meses de subcultivo. (A) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de $9,04 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $0,022 \mu\text{M}$ de TDZ (Tratamento 1); (B) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de $4,52 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $0,022 \mu\text{M}$ de TDZ (Tratamento 2); (C) Calos que foram introduzidos em meio PCG com adição de $2,26 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $0,022 \mu\text{M}$ de TDZ (Tratamento 3)

5.4.7 Influência de meios de cultura suplementados com cinetina ou zeatina e 2,4-D

Ao testar o efeito dos meios de cultura e a resposta dos calos à cinetina e à zeatina, explantes foliares foram introduzidos em meio MS, PCG, DKW suplementado com sacarose ou DKW suplementado com glicose. Ainda, os meios foram suplementados com 2,4-D ($4,52$ ou $18,05 \mu\text{M}$), zeatina ($4,56 \mu\text{M}$) ou cinetina ($9,3 \mu\text{M}$). Os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas quanto à sobrevivência e à indução de calos aos 90 dias (Tabela 13). Contudo, foi possível observar diferenças quanto à aparência dos calos, nos diferentes tratamentos (Figura 35). Cabe também ressaltar, que a avaliação desse experimento foi parcialmente comprometida, pois o tratamento 2 (MS + Kin) foi totalmente contaminado por bactérias e por isso, descartado.

Tabela 13. Influência da composição do meio de cultura suplementados com 2,4-D, cinetina ou zeatina, em explantes foliares de erva-mate aos 90 dias ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes)

Tratamentos	Médias das Notas de Calogênese	
Meio 4 – DKW + Kin	⁽¹⁾ 0,875	a
Meio 6 – PCG + Kin	0,75	a
Meio 7 – Controle	0,725	a
Meio 5 – PCG + Zea	0,4	a
Meio 3 – DKW + Zea	0,25	a
Meio 1 – MS + Zea	0,2	a
Meio 2 – MS + Kin	0	a

⁽¹⁾ Médias das notas variando entre 0 (morte do explante), 1 (explante vivo, sem formar calos) e 2 (explantes com formação de calos). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

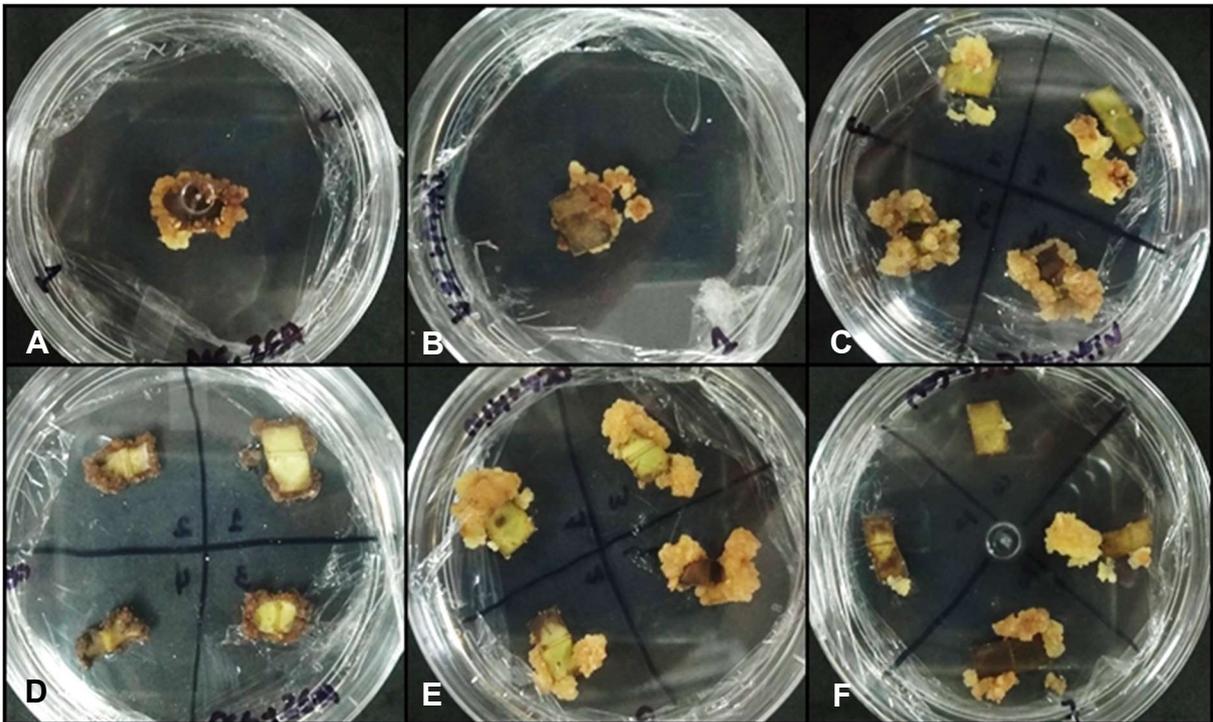


Figura 35. Calos de erva-mate 90 dias após a introdução *in vitro*. (A) Meio 1: MS suplementado com 2,4-D (4,52 μM) e Zea (4,56 μM); (B) Meio 3: DKW suplementado com 2,4-D (4,52 μM) e Zea (4,56 μM); (C) Meio 4: DKW suplementado com 2,4-D (18,05 μM) e Kin (9,3 μM); (D) Meio 5: PCG suplementado com 2,4-D (4,52 μM) e Zea (4,56 μM); (E) Meio 6: PCG suplementado com 2,4-D (18,05 μM) e Kin (9,3 μM); (F) Meio 7: controle – Meio PCG com 2,4-D (9 μM) e TDZ (0,022 μM)

Em específico, o tratamento 4 (meio DKW suplementado com Kin), apresentou visualmente, calos bem desenvolvidos e de aspecto friável (Figura 36).

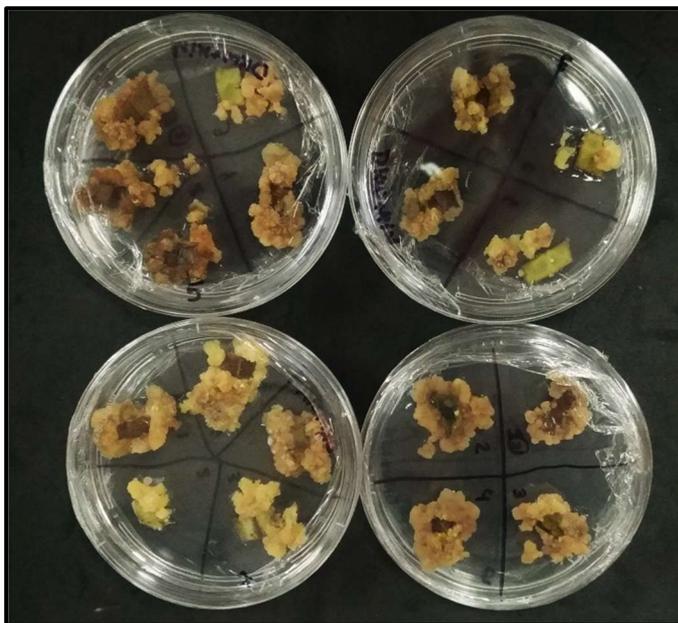


Figura 36. Calos de erva-mate introduzidos em meio DKW suplementado com 2,4-D (18,05 μM) e Kin (9,3 μM), aos 90 dias de subcultivo

No cultivo de explantes foliares em *Coffea arabica* L.CV. OBATÃ, a introdução realizada em meio contendo ação combinada de 2,4-D (18,05 μM) e cinetina (9,3 μM), razão 2:1 entre auxina/citocinina, foi responsável por induzir 80,5 % da formação de calos primários mistos (Maciel et al., 2003). Esses calos primários podem conter duas distintas populações de células, uma de células alongadas e vacuolizadas, e outra, de células cilíndricas e com citoplasma denso, que são as células embriogênicas (Berthouly; Michaux-Ferrieri, 1996). Essa combinação hormonal (18,05 μM de 2,4-D e 9,3 μM de Kin) é representada pelos tratamentos 2, 4 e 6 no presente experimento, sendo que os meios 4 e 6 apresentaram as melhores médias de notas.

Já em erva-mate, a introdução de explantes foliares em meio $\frac{1}{4}$ MS contendo zeatina (4,56 μM) e 2,4-D (4,52 μM) apresentou maior formação de calos (60 %) com aspecto friável e de coloração bege claro (Stachevski; Degenhardt-Goldbach, 2011). No presente experimento, essa composição foi representada pelo meio 1, e a mesma combinação hormonal foi utilizada nos meios 3 e 5, e todos apresentaram notas inferiores aos demais tratamentos. Já o meio controle, representado pelo protocolo utilizado em cacauero (meio PCG suplementado com 9 μM de 2,4-D e 0,022 μM de TDZ), não se diferenciou estatisticamente dos demais.

5.4.8 Efeito do tempo de permanência em meio PCG e da variação dos reguladores hormonais

Objetivando avaliar a influência do tempo de permanência dos explantes no meio primário, os mesmos foram introduzidos em meio PCG e foram subcultivados para o meio ED aos 5, 10 ou 15 dias após a introdução *in vitro*. Contudo, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 14). Um segundo fator foi avaliado, quanto às combinações de 2,4-D e TDZ no meio primário. O meio primário utilizado era constituído de meio PCG suplementado com 2,4-D (2,26; 4,52 ou 9,04 μM) e TDZ (0,0055; 0,011 ou 0,022 μM). Mais uma vez, não foi obtida diferença estatística entre os meios na sobrevivência e indução de calos (Tabela 15).

Tabela 14. Influência do tempo de permanência em meio de cultura primário (Fator A) em explantes foliares de erva-mate ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes)

Fator A (Influência do tempo em meio primário)	Médias das Notas de Calogênese
5 dias	⁽¹⁾ 0,56 a
10 dias	0,57 a
15 dias	0,39 a

Tabela 15. Influência do balanço hormonal entre 2,4-D e TDZ em meio de cultura de explantes foliares de erva-mate ($n=40$; 10 repetições com 4 explantes)

Fator B (Combinação de 2,4-D e TDZ)	Médias das Notas de Calogênese
2,26 μM de 2,4-D + 0,0055 μM de TDZ	⁽¹⁾ 0,6 a
4,52 μM de 2,4-D + 0,0055 μM de TDZ	0,5 a
9,04 μM de 2,4-D + 0,0055 μM de TDZ	0,65 a
2,26 μM de 2,4-D + 0,011 μM de TDZ	0,48 a
4,52 μM de 2,4-D + 0,011 μM de TDZ	0,43 a
9,04 μM de 2,4-D + 0,011 μM de TDZ	0,41 a
2,26 μM de 2,4-D + 0,022 μM de TDZ	0,64 a
4,52 μM de 2,4-D + 0,022 μM de TDZ	0,40 a
9,04 μM de 2,4-D + 0,022 μM de TDZ	0,49 a

⁽¹⁾ Médias das notas variando entre 0 (morte do explante), 1 (explante vivo, sem formar calos) e 2 (explantes com formação de calos). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Aos 90 dias, os calos também não apresentaram diferença no aspecto ou na coloração (Figura 37).

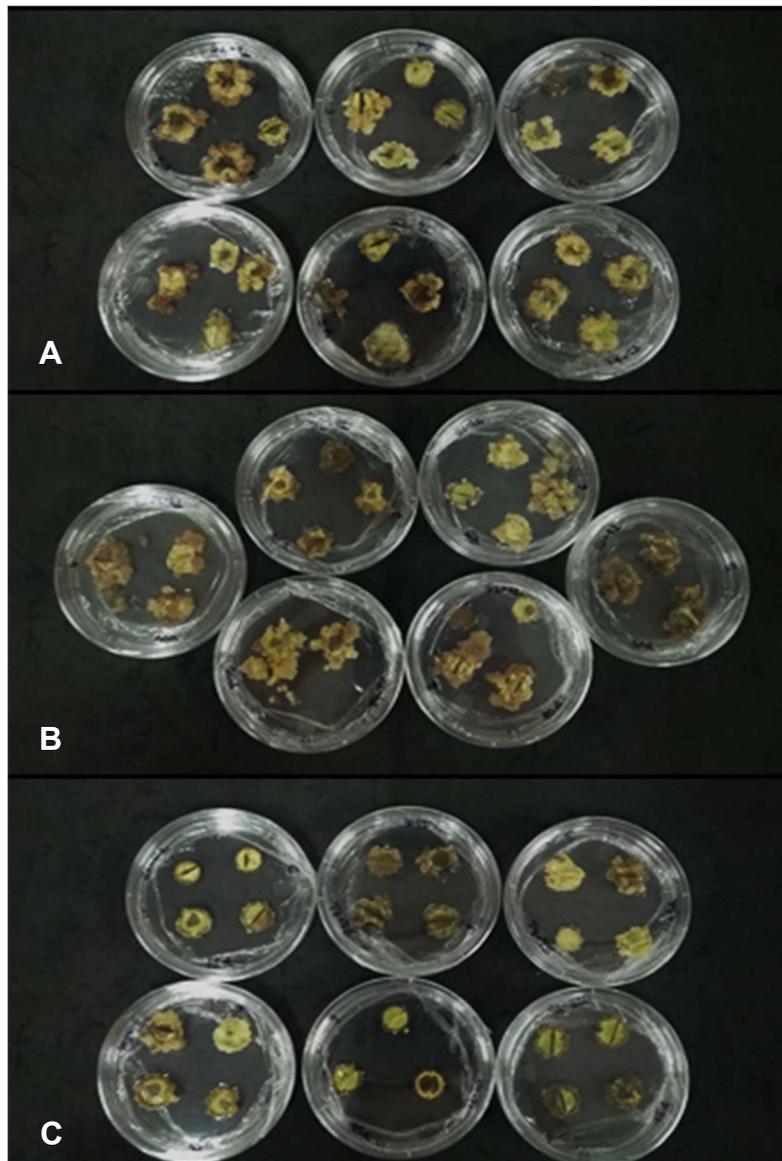


Figura 37. Calos de erva-mate aos 90 dias após a introdução. (A) Calos transferidos ao meio ED com 5 dias; (B) Calos transferidos ao meio ED com 10 dias; (C) Calos transferidos ao meio ED com 15 dias

Huetteman e Preece (1993) indicam que a concentração adequada de TDZ para formar calos em plantas lenhosas seria igual ou superior a 1 μM . Essa concentração é superior à utilizada no presente experimento, de forma que pode justificar os resultados limitados obtidos.

Com relação ao tempo de permanência dos explantes de erva-mate em meio básico, Dias e Degenhardt-Goldbach (2018) observaram que o período de 90 dias resultou em 42 % de formação de calos, indicando como período mínimo até a passagem para o meio secundário.

Os experimentos realizados nesta seção, estão resumidos na Tabela 16. De um modo geral, foi possível determinar alguns passos iniciais para o desenvolvimento de um protocolo de introdução de explantes foliares de erva-mate, visando a indução de calos. Entretanto, a diferença visual entre os calos nos variados tratamentos, sugere a necessidade de pesquisas futuras que expliquem os processos fisiológicos envolvidos na formação e da composição dos calos, visando encontrar a composição dos meios de cultura e a forma de cultivo ideais.

Tabela 16. Resumo dos experimentos realizados visando a calogênese foliar de erva-mate

Experimento	Diluição de solução comercial de NaOCl (%)	Meio de cultura	Avaliação
5.4.1	0,25; 0,5 ou 1	MS	NaOCl a 1 e 0,5 % não diferiram estatisticamente
5.4.2	1	PCG	Face adaxial em contato com o meio produz mais calos; apenas os explantes que possuíam nervura sobreviveram; O tamanho dos explantes não apresentou diferença estatística
5.4.3	1	PCG, SCG e ED	Não foram obtidos embriões somáticos
5.4.4	1	PCG + 2,4-D + TDZ e SCG + BA + 2,4-D	Calos com aspecto esverdeado e apresentaram raízes
5.4.5	1	PCG + 2,4-D + TDZ	Nenhum explante formou calo

5.4.6	1	PCG + 2,4-D + TDZ e ED + BA + ANA	Os calos apresentaram diferentes tonalidades e aspectos
5.4.7	1	MS ou DKW ou PCG + 2,4-D, Zea ou Kin	Os meios não apresentaram diferença estatística quanto à indução de calos
5.4.8	1	PCG + 2,4-D + TDZ e ED + ANA + BA	Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o tempo

6. CONCLUSÕES

- O uso de NaOCl comercial puro (2,5 % de cloro ativo) por 10 min, associado à imersão em 70 % etanol por 1 min é suficientemente eficaz na assepsia de sementes, segmentos nodais e explantes foliares para a introdução *in vitro*.
- Ainda é necessário definir condições que possibilitem a germinação *in vitro* das sementes. A realização de estudos de histologia e fisiologia de sementes poderiam auxiliar a definir tratamentos eficazes para acelerar o processo de maturação e germinação.
- A permanência no escuro após a introdução *in vitro* e os antioxidantes ácido ascórbico, PVP e carvão vegetal, nas concentrações testadas, não contribuíram com a inibição da oxidação dos segmentos nodais.
- Os hormônios vegetais BA (8,8 μM) e ANA (5,37 μM) não foram eficientes na manutenção *in vitro* dos segmentos nodais.
- Os explantes foliares recortados contendo a nervura, introduzidas com a face adaxial em contato com o meio e com tamanho de 0,5 cm² apresentaram melhores resultados para sobrevivência e indução de calos.
- O uso de 2,4-D e TDZ foram eficientes na indução de calos primários e o uso de BA e ANA não foi eficaz na manutenção dos calos secundários.
- O uso de cinetina ou zeatina associados ao 2,4-D em diversos meios de cultura não diferiram estatisticamente na indução de calos primários, mas diferiram na aparência dos mesmos, onde a cinetina induziu a formação de calos friáveis e de aspecto promissor.
- O meio de cultura DKW suplementado com 2,4-D (18,05 μM) e Kin (9,3 μM) demonstrou ser o mais eficiente na indução de calos de aspecto friável.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. V.; PARANHOS, J. T.; TABALDI, L. A.; SORIANI, H. H. Germinação *in vitro* de sementes e parâmetros morfofisiológicos de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, p. 39-45, 2018.
- AGROFIT. **Bula Midas BR®, Dupont**. 2019. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/midas030320.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças de eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.
- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121-144, 1987.
- ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; OLIVEIRA, A. B.; HERNANDEZ, F. F. F. Propagação *in vitro* de mussaenda (*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 2, p. 206-212, 2010.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ARAUJO, A. L.; ARTHUR, P. B.; ROSSI, R. S.; FRANCO, C. F. O.; ARTHUR, V. Eficiência da radiação gama em sementes de algodão. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 12, n. 1, p. 51-55, 2018.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. 1. ed. Rio de Janeiro: Instituto Souza Cruz, 2002. 326 p.
- BAGGIO, A. J.; MONTOYA VILCAHUAMAN, L. J.; CORREA, G. **Arborização da cultura da erva-mate: aspectos gerais, resultados experimentais e perspectivas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 24 p. (Documentos, 161).
- BAGGIO, A. J.; SCHREINER, H. G. Erva-mate e agrossilvicultura, análise dos sistemas tradicionais e perspectivas. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE, 10., 1983, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, CNPF, 1985. p. 71-74. (Documentos, 15).
- BARTOS, P. M. C. **Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo**. 2012. 151 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.
- BENEDETTI, E. L. **Tolerância da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ao alumínio**. 2012. 72 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

BERKAI, D.; BRAGA, C. A. **500 anos de história da erva-mate**. Canoas, RS: Editora Cone Sul, 2000. 97 p.

BERNASCONI, N. K. et al. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil): efecto del tipo de explante en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. **Phyton**, v. 58, n. 1/2, p. 23-31, 1996.

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**, v. 2, n. 1/2, p. 95-99, 1998.

BERTÉ, K. A. S.; FREITAS, R. J. S.; RUCKER, N. G. A.; RAPACCI, M. Vida de prateleira: microbiologia da erva-mate chimarrão. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 95-98, 2006.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 169-176, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **AGROFIT**. Consulta Aberta. Disponível <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 maio 2020.

BRASIL. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços – MDIC. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

BRAUN, H.; LOPES, J. C.; SOUZA, L. T.; SCHMILDT, E. R.; CAVATTE, R. P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 539-546, 2010.

BRONDANI, G. E.; BACCARIN, F. J. B.; WIT ONDAS, H. W.; STAPA, J. L.; GONÇALVES, A. N.; ALMAEIDA, M. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 23, n. 4, p. 583-592, 2012.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 39 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. v. 1, 1039 p.

CARVALHO, P. E. R. *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire. In: EMBRAPA. **Espécies florestais brasileiras**. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1994. p. 280-287.

CAVALCANTE, A S. L. **Resposta morfogênéticas *in vitro* de acaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum.)**. 2001. 124 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

CEDERVA. **Fatos em imagens sobre a erva-mate**. Curitiba, 2017. Disponível em: <<http://www.cederva.com/curiosidades.html>>. Acesso em: 15 maio 2020.

CHANG, M. Y. **Sistema Faxinal: uma forma de organização camponesa em desagregação no Centro-Sul do Paraná**. Londrina: IAPAR, 1988. (Boletim Técnico, 22).

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J. Desinfestação de explantes de *prunus* cv. Mr. S. com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira Agrociência**, v.10, n. 2, p. 249-250, 2004.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *In vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth)]**. 1999. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 1999.

COLUSSI, J.; PRESTES, N. P. Frugivoria realizada por aves em *Myrciaria trunciflora* (Mart) O. Berg. (myrtaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Ilex paraguariensis* St. Hil. No norte do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.

COSTA, S. G. **A erva-mate**. Curitiba: Coleção Farol do Saber, 1995. 132 p.

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados, MS: Universidade Federal da Grande Dourados, 2009. 288 p.

DE LIMA, K. K. D. **Obtenção de compostos do aroma de baunilha através do cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia***. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

DEBERGH, P. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 270-276, 1983.

DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; STACHEVSKI, T. W.; FRANSCISCON, L.; BUSS, S.; WENDLING, I.; DUTRA, L.F. Calogênese *in vitro* a partir de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) mantidas em casa de vegetação. In: CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 5., 2011, Posadas. **Actas...** Posadas: Instituto Nacional de la Yerba Mate, 2011.

DÉO, T. G.; GOELZER, A.; SILVA, L. D.; DAMIANI, C. R. Germinação e multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium*. In: ENCONTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UFGD, 8., 2014, Dourados. **Anais...** Dourados, MT: Universidade Federal de Grande Dourados, 2014.

DIAS, A. R.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Indução de calogênese *in vitro* em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). In: EVINCI - EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 17., 2018, Colombo, PR.... Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2018. (Documentos, 332).

DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDOZO JR., E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE, 3., 2000, Encantado, RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of parodox walnut rootstock. **HortScience**, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "in vitro" et amelioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, v. 28, n. 4, p. 231-244, 1984.

DUTRA, L. F.; HANSEL, F.A.; WENDLING, I. **Introdução ao cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008. 33 p.

DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. **Estabelecimento *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 7 p.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p. 217-220, 1998.

ELDRIDGE, K; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. V. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon, 1994. p. 228-246.

EMBRAPA. **Erva mate**. Perguntas e respostas. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/erva-mate/perguntas-e-respostas>>. Acesso em: 05 mar. 2020.

ERVA MATE CATANDUVAS. **Benefícios da erva mate**. Catanduvas, SP, 2018. Disponível em: <http://www.catanduvas.com/erva-mate/>. Acesso em: 10 maio 2020.

FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; PADILHA, L. S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 1, p. 14-17, 1997.

FERRAZ, H. M. R. da. **Situação da atividade ervateira no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS, 1995. 50 p.

FERREIRA A.G., KASPARY R., FERREIRA H.B., ROSA L.M. Sex proportion and pollination in *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Flor**, n. 53, p. 29-33, 1983.

FERREIRA, A.G. Erva-mate & chimarrão: seleção genética aprimora tradição secular. **Ciência Hoje**, v. 19, n. 111, p. 47-50, 1995.

FERREIRA, C. A.; NASCIMENTO, V. F.; FERREIRA, M.; VENCOCOSKY, R. Efeito de baixas doses de radiação gama na conservação do poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. **IPEF**, n. 21, p. 67-82, 1980.

FILIP, R.; SEBASTIAN, T.; FERRARO, G.; ANESINI, C. Effect of Ilex extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 649–655, 2007.

FAO. **FAOSTAT**. Rome, 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 20 maio 2020.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2000. 5 p.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 54, p. 105-108, 2007.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. Morfologia do fruto, semente e propagação *in vitro* de *Caularthron bicornutum* (Orchidaceae). **Revista EPeQ/ Fafibe**, p. 64-68, 2010.

GEOGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exergetics, 1984. 709 p.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008. v.1, p. 38-64.

GERHARDT, M. **História ambiental da erva-mate**. 2003. 209 f. Tese (Doutorado em História) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in Southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 352-369, 2005.

GRANDO, M. F.; EICHLER, L. TANABE, C. R.; SANTOS, J. F.; SANTOS, C. M. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 139-144, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/ Embrapa-CNPq, 1990. p. 99-169.

GRIEBELER, A. G.; CONSATTI, G.; FREITAS, E. M.; SPEROTTO, R. A. Optimal culture conditions for the initial development of *Ilex paraguariensis* St. Hil. explants. **Acta Botanica Brasílica**, v. 28, n. 4, p. 548-551, 2014.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; IEDE, E. T.; SOARES, C. M. S. **Manual de identificação de pragas e doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 24 p.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; ZANON, A.; AUER, C. G.; FOWLER, J. A. P. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes, na emergência de plântulas de erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 39, p. 31-39, 1999.

HARMON, G. G.; PFLEGER, F. L. Pathogenicity and infection sites of *Aspergillus* species in stored seeds. **Phytopathology**, v. 64, p. 1339-1344, 1974.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 928 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 847 p.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HEINRICHS, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 781-785, 2001.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, K. M.; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v. 41, n.1, p. 113-119, 2011.

HU, C. Y. Holly (*Ilex* spp.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in agriculture and forestry 5: Trees II**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. v. 5, p. 412-427.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.

IEDE, E. T.; MACHADO, D. C. Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 18/19, p. 51-60, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes, ano base 2014**. v. 41. Rio de Janeiro, 2015. 100 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. v. 32. Rio de Janeiro, 2017. 8 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura – 2018**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

ISHIBASHI, V.; KOGUTA, K. V.; FLÔRES JUNIOR, P. C.; HIGA, A. R. Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 13, n. 1, p. 15-20, 2017.

JIN, H.; SEO, G.; CHO, Y.C.; HWANG, E.; SOHN, C.H.; HONG, Y. Gelling agents for tissue culture of the seaweed *Hizikia fusiformis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 489-493, 1997.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa SPI, 1999. v. 2, p. 519-532.

KÖPPEN, W. **Klassifikation der klimate nach érum cias, niederschlag und jahreslauf**. **Petermanns Geographische Mitteilungen**. Gotha, v. 64, p. 193-203, 1918.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 27, p. 47-51, 1991.

KUMAR, G. R.; REDDY, C. R. K.; GANESAN, M.; THIRUPPATHI, S.; DIPAKKORE, S.; ESWARAN, K.; SUBBA RAO, P.V.; JHA, B. Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). **Phycologia**, v. 43, p. 596-602, 2004.

LAZIER, H. **Paraná: terra de todas as gentes e de muitas histórias**. Francisco Beltrão, PR: Editora Grafit, 2004. 319 p.

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. J. Somatic emryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron, **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 34, n. 4, p. 293 - 299, 1998.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of Annual Meetings of International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MACCARI JUNIOR, A. **Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão**. 2005. 199 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C.; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. CV. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 107-116. 2003.

MARQUES, A. C. **As paisagens do mate e conservação socioambiental: um estudo junto aos agricultores familiares do planalto norte catarinense**. 2014. 434 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MARTINS-CORDER, M. P.; JUNIOR BORGES, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

MATTOS, N. F. Revisão taxonômica da erva-mate – *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE, 10., 1983, Curitiba. **Anais** Curitiba, PR: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1985. p. 37-46.

MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; TRORE, A.; GUILTINAN, M. Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 3, p. 252-259, 2002.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba, PR: EMATER- PR, 1989. 104 p.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate**. 2. ed. Curitiba, PR: ACARPA, 1991. 104 p.

McDONALD, M. D.; KHAN, A. A. Acid scarification and protein synthesis during seed germination. **Agronomy Journal**, v. 2, n. 75, p. 111-114, 1983.

MENEGUZZI, A.; NAVROSKI, M. C.; CAMARGO, S. S.; PEREIRA, M. O.; NASCIMENTO, B.; BUENO, D. H.; RUFATO, L. Efeito da assepsia com NaOCl no estabelecimento *in vitro* de erva-mate. In: SEMINÁRIO ERVA-MATE XXI: MODERNIZAÇÃO NO CULTIVO E DIVERSIFICAÇÃO DO USO DA ERVA-MATE, Curitiba. **Anais...Colombo**, PR: Embrapa Florestas, 2016.

MICHELIZZI, F, C. **Estudo da organogênese *in vitro* de explantes foliares de macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv. Galaxy**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MIRANDA, N.; TITON, M.; PEREIRA, I.; FERNANDES, J.; SANTOS, M. Estabelecimento *in vitro* de *Eremanthus incanus*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, n. 1, 2019.

MIRANDA, N.; URBAN, T. **Engenhos e barbaquás**. Curitiba, PR: Posigraf, 1998. 120 p.

MORAES, F. K. C.; LEMOS, O. F.; PINHEIRO, H. A.; SANTOS, L. R. R.; POLTRONIERI, M. C. Efeito de GA₃ na germinação *in vitro* de sete cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém. **Anais... Brasília**, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

MORAIS, E. C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; BOAVENTURA, B. C. B.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E. DI PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E. L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316–8324, 2009.

MROGINSKI, L.; DOLCE, N.; SANSBERRO, P.; LUNA, C.; GONZALEZ, A.; REY, H. Cryopreservation of *Ilex* Immature Zygotic Embryos. In: THORPE, T. A.; YEUNG, E. C. **Plant Embryo Culture: Methods and Protocols**. Springer Science + Business Media, 2011. p. 215-225.

MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; REY, H.; COLLAVINO, M. Micropropagación 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, PR: EMBRAPA– CNPF, 1997. p. 141-152.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

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

NAIRN, B. J.; FURNEAUX, R. H.; STEVENSON, T. T. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 43, p. 1-11, 1995.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The Mac-Millan, 1979. 1183 p.

NEŠTÁKOVÁ, M.; HAVRLETOVÁ, M. FARAGÓ, J. Effect of gelling agents on in vitro multiplication of two ornamental plants. **Biologia**, v. 55, p. 409-411, 2000.

NEŠTÁKOVÁ, M.; HAVRLETOVÁ, M. FARAGÓ, J. Effect of gelling agents on *in vitro* multiplication of two ornamental plants. **Biologia**, v. 55, p. 409-411, 2000.

NEVES, J. M. G; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; SILVA, H. P.; BRANDÃO, A. A.; SALES, N. L. P. Padrão de absorção de água em sementes de cutieira. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 190-195, 2010.

NIKLAS, C. O. Estudios embriológicos y citológicos en la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Bonplandia**, v.6, n. 2, p. 225-233, 1987.

NIKLAS, C. O. Injertacion de yerba mate. **Citrusmisiones**, n. 20, p. 7-9, 1990.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NORIEGA, C.; SONDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993. Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p. 73-81.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; SANTOS, A. M. Efeito de diferentes concentrações de água de coco e carvão ativado no cultivo *in vitro* de pinhão manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 16.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 3., 2007, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2007.

OLISZESKI, A.; NEIVERTH, D. D. Recuperação de erveiras nativas por enxertia. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 44, p. 133-134, 2002.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10., 1983, Curitiba. **Anais...** Curitiba, PR: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p. 17-36.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. Lavras, MG: UFLA, 2001. 97 p.

PAULA, S. R. DE. **Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e comparação das folhas de plantas *in vitro* com as originadas em casa de vegetação**. 1992. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

PENTEADO JUNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. **Erva 20**: sistema de produção de erva-mate. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 152 p.

PIERSON, E. S.; VAN LAMMENRN, A.; SCHEL, J. H.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v. 115, n. 2/3, p. 208-216, 1983.

PRAT KRICUN, S. D. Principales aspectos de la producción e investigación yerbatera Argentina. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE A CULTURA DA ERVAMATE, 3., 1990, Erechim. **Anais...** Erechim, RS: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 1990. p. 17-30.

PRAT KRICUN, S. D. Propagación vegetativa de plantas adultas de yerba mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIÍTA, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (Org.) **Erva-mate**: biología e cultura no Cone Sul. Porto Alegre, PR: Ed. Da UFRGS, 1995. p. 137-150.

PRAT KRICUN, S. D.; BELINGHERI, L. D. Disposición, distanciamiento y densidade de plantación de yerba mate en las provincias de Misiones y Corrientes, Argentina. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E. DE A.; TARASCONI, L.C. (Org.) **Erva-mate**: biología e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995. p. 73-79.

QUADROS, K. M. **Propagação vegetativa de erva-mate** (*Ilex paraguariensis* – Saint Hilaire – Aquifoliaceae), 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 18 maio 2020.

RACHWAL, M. F. G.; COELHO, G. C.; DEDECEK R. A.; CURCIO, G. R.; SCHENKEL, E. P. **Influência da luminosidade sobre a produção de massa foliar e teores de macronutrientes, fenóis totais, cafeína e teobromina em folhas de erva-mate**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2002. 5 p.

REDDY, C. R. K.; KUMAR, G. R. K.; SIDDHANTA, A. K.; TEWARI, A. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). **Journal of Phycology**, v. 39, p. 610-616, 2003.

REDIG, A. P. L. A importância econômica atual da erva-mate. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil), 10., 1985, Curitiba. **Anais...** Curitiba, PR: EMBRAPA/CNPF, 1985. 146 p.

REISSMANN, C. B.; DÜNISCH, O.; BOEGER, M. R. Beziehung Zwischen Ernährungsbiologischen (Fe, Mn, Ca) und Strukturellen Merkmalen Ausgewählter Morphotypen Der Mate-Pflanze (*Ilex paraguariensis* St. Hil). In: HÜTTTL, R. F. **Boden, Wald und Wasser**. Germany: Kluver, 2003. p. 146-171.

RESENDE, M. D. V de; SIMEAO, R. M.; STURION, J. A. **Fundamentos de genética de populações para conservação de germoplasma da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 1997. 35 p.

RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P. DE; SIMEÃO, R. M.; FERNADES, J. S. C. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2000. 66 p.

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.

REY, H. Y.; SANSBERRO, P. A.; COLLAVINO, M. M.; DAVINA, J. R.; GONZALEZ, A. M.; MROGINSKI, L. A. Colchicine, trifuralin and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Euphytica**, v. 123, p. 49-56, 2002.

ROBAINA, R. R.; GARCIA, P.; GARCÍA-JIMENEZ, P.; LUQUE, A. Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. **Journal of Phycology**, v. 2, p. 137-143, 1990.

ROSA, F. C.; DUTRA, L. F.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de erva-mate: efeitos da desinfestação no estabelecimento de segmentos nodais. In: REUNIÓN TÉCNICA DE LA YERBA MATE; EXPOSICIÓN DE AGRONEGOCIOS DE LA YERBA MATE, **Actas...** Posadas, Argentina, 2006. p. 184-187.

ROSA, F. C.; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; QUADROS, K. M. **Micropropagação de erva mate**: efeito de diferentes épocas do ano no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006.

ROY, G. M. **Activated carbon applications in the food and pharmaceutical industries**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 19-42.

SANBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. *In vitro* culture of zygotic embryos of *Ilex* species. **Hort Science**, n. 36, p. 351-352, 2001.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. *In vitro* culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, p. 101-105, 1998.

SANSBERRO, P.; REY, H.; BERNARDIS, A.; LUNA, C.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by *in vitro* culture of nodal segments. **Biocell**, v. 24, n. 1, p. 53-63, 2000.

SANSBERRO, P.; REY, L.; MROGINSKI, L.; COLLAVINO, M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v. 35, p. 401-402, 1999.

SANTIN, D. **Produtividade, teor de minerais, cafeína e teobromina em erva-mate adensada e adubada quimicamente**. 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ALMEIDA, I. C.; BARROS, N. F.; WENDLING, I. Calagem melhora a fertilidade do solo, produtividade e nutrição de cultivos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 6.; Simposio Internacional de Yerba Mate y Salud, 2., 2014, Montevideo. **Actas...** Montevideo, 2014. p. 1-6.

SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; REISSMANN, C.B. Nutrição e recomendação de adubação e calcário para a cultura da erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília, DF: Embrapa, 2015.

SANTIN, D.; WENDLING, I.; BENEDETTI, E. L.; MORANDI, D.; DOMINGOS, D. M. Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por miniestacas juvenis e por sementes. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 571- 579, 2015.

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. Hil). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3.; FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVA-MATE, 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó, SC: EPAGRI, 2003.

SANTOS, M. R. A. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga Grisebach***. 1998. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

SAUER, D. B.; BURROUGHS, R. Desinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. **Phytopathology**, v. 76, n. 7, p. 745-749, 1986.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171 p.

SOARES, F. P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 137 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

SOUSA, H. U.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; FERREIRA, E. A. Efeito do ácido giberélico sobre a germinação de sementes de porta-enxertos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 496-499, 2002.

SOUZA, R. A. V. **Conservação de sementes, cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e taxa de polinização cruzada de oliveira (*Olea europaea* L.)**. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

STACHEVSKI, T. W.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. Assepsia em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) em casa de vegetação utilizadas para calogênese *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 18.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 5., 2011, Joinville. **Resumos...** Joinville, SC: Sociedade Brasileira de Plantas Ornamentais e Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 2011.

STACHEVSKI, T. W.; FRANCISCON, L.; GOLDBACH, J. D. Efeito do meio de cultura na calogênese *in vitro* a partir de folhas de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 75, p. 339-342, 2013.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of coffea. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; EMRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, 2007.

STRACHULSI, J. **Momentos de sorver o mate**: a prática do chimarrão como elemento de união comunal entre os moradores da comunidade rural Linha Criciumal, Cândido de Abreu – PR. **Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales**, abril-junio 2016. Disponível em: <<https://www.eumed.net/rev/cccss/2016/02/chimarrao.html>>. Acesso em: 05 maio 2020.

STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate**. Curitiba, PR: EMBRAPA, 1988. 10 p.

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V de. **Melhoramento genético de erva-mate**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2001. 10 p.

STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Genetic parameters estimates and visual selection for leaves production in *Ilex paraguariensis*. **Bragantia**, v. 76, n. 4, p. 492-500, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2004. 719 p.

TANG, H.; REN, Z.; REUSTLE, G.; KRCZAL, G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 93, p. 235-244, 2002.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S.; SANTOS, M. O. **Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 33 p. (Documentos, 79).

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618-631, 2008.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R. J.; KUROZAWA, C. Ação “*In vitro*” de fungicidas no crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta do tomateiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 3, p. 337-345, 2003.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa – SPI; Embrapa – CNPH, 1998. 509 p.

TREVIZAM, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. 167 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Indução de brotações e assepsia de explantes de mamoeiro cv. Tainung visando à micropropagação. **Agropecuária Catarinense**, v. 28, n. 1, p. 57-60, 2015.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. Produção de mudas de erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 195 p.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 54 p.

WENDLING, I.; DUTRA, L. E.; GROSSI, E. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 289-292, 2007.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; SANTIN, D. **BRS 408 e BRS 409**: cultivares clonais de erva-mate para produção de massa foliar. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2017. 5 p.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new ex vitro method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, v. 39, n. 3, p. 343-353, 2010.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; REIS, C. A. F.; STUEPP, C. A.; PEÑA, M. L. P. Indirect and expedite assessment of *Ilex paraguariensis* comercial yield. **CERNE**, v. 22, p. 241-248, 2016.

WENDLING, I.; SANTIN, D.; NAGAOKA, R.; STURION, J. A. **BRS BLD Aupaba e BRS BLD Yari**: cultivares clonais de erva-mate para produção de massa foliar de sabor suave. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2017. 6 p.

WENDT, S. N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 2005. 165 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I**: Princípios e técnicas de propagação vegetativa. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 2002. 64 p.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia in vitro de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. p. 55-74.

XAVIER, A.; WENDLING I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

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

ANEXOS

Anexo A - Composição dos meios de cultura utilizados

Componente (*)	MS	PCG	SCG	ED
Macronutrientes				
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	112,5	-	112,5
KH ₂ PO ₄	170,0	265,0	17,0	265,0
KNO ₃	1900,0	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	361,49	180,3	361,49
NH ₄ NO ₃	1650,0	1416,0	400,0	1416,0
Ca(NO ₃) ₂	-	1367,0	-	1367,0
CaCl ₂ anidro	-	-	72,5	-
K ₂ SO ₄	-	1559,0	990,0	1559,0
Micronutrientes				
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25	0,25	0,25
H ₃ BO ₃	6,2	4,8	6,2	4,8
KI	0,83	-	-	-
MnSO ₄ .7H ₂ O	22,3	33,5	22,3	33,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,39	0,25	0,39
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	17,0	8,6	17,0
Fe(SO ₄).7H ₂ O	27,8	33,8	27,8	33,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2	45,4	37,3	45,4
NiSO ₄ .5H ₂ O	-	0,005	-	0,005
Orgânicos				
Ácido nicotínico	0,5	1,0	1,0	1,0
Glicina	2,0	2,0	-	2,0
Mio-inositol	100,0	200,0	100,0	100,0
Piridoxina.HCl	0,5	-	1,0	-
Tiamina.HCl	0,5	2,0	10,0	2,0
Glutamina	-	250,0	-	-
Sacarose (g L ⁻¹)	30	-	-	20
Glucose (g L ⁻¹)	-	20	20	10

(*) Concentração em mg L⁻¹, exceto quando especificado