

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR**

**MÉTODOS DE DESINFESTAÇÃO NO ISOLAMENTO E  
INDUÇÃO *IN VITRO* DE CLONES DE ERVA-MATE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DÉBORA CRISTINA PEREIRA PRADO**

**IRATI-PR**

**2018**

**DÉBORA CRISTINA PEREIRA PRADO**

**MÉTODOS DE DESINFESTAÇÃO NO ISOLAMENTO E INDUÇÃO *IN VITRO*  
DE CLONES DE ERVA-MATE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais, área de concentração Manejo Sustentável de Recursos Florestais, para obtenção do título de Mestre.

Fabiana Schmidt Bandeira Peres  
Orientadora

Evandro Vagner Tambarussi  
Co-orientador

IRATI-PR  
2018

Catálogo na Fonte  
Biblioteca da UNICENTRO

P896m	<p>PRADO, Débora Cristina Pereira. Métodos de desinfestação no isolamento e indução <i>in vitro</i> de clones de erva- mate / Débora Cristina Pereira Prado. – Irati, PR : [s.n], 2018. 72f.</p> <p>Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fabiana Schmidt Bandeira Peres Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação <i>stricto sensu</i> em Ciências Florestais. Área de concentração Silvicultura. Universidade Estadual do Centro- Oeste, PR.</p> <p>1. Engenharia Florestal – dissertação. 2. Cultivo <i>in vitro</i>. 3. Desinfestação inor- gânica. 4. Soluções orgânicas. I. Peres, Fabiana Schmidt Bandeira. II. UNICENTRO. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 631.75</p>
-------	---

## TERMO DE APROVAÇÃO

Defesa Nº 116

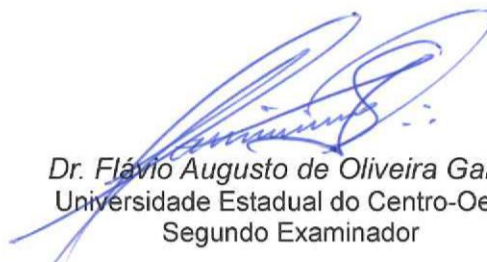
**Débora Cristina Pereira Prado**

### **“Métodos de desinfestação no isolamento e indução *in vitro* de clones de erva-mate”**

Dissertação aprovada em 05/03/2018 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Manejo Sustentável de Recursos Florestais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela seguinte Banca Examinadora:



*Dr. Ivar Wendling*  
Embrapa Florestas  
Primeiro Examinador



*Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia*  
Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Segundo Examinador

*Fabiana Schmidt Bandeira Peres*  
*Dra. Fabiana Schmidt Bandeira Peres*  
Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Irati - PR  
2018

Home Page: <http://www.unicentro.br>

À todas pesquisadoras e todos pesquisadores, à  
todas as produtoras e todos os produtores e à  
todas as consumidoras e todos os consumidores  
de erva-mate.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Toda vivência faz parte da jornada. Não apenas os acontecimentos diretamente ligados a caminhada do mestrado resulta em uma dissertação. A dissertação não é apenas o resultado da pesquisa, mas o resultado de um caminho trilhado e compartilhado com diversas pessoas ao longo do percurso (antes e durante o mestrado), pois o que nós somos e o que fazemos são resultados dessas vivências.

À Consciência Cósmica, pela centelha divina e pelo caminho cheio de aprendizados.

Aos meus queridos e amados pais Vera e Paulo, que tornaram possível minha vinda a este mundo e que me ofereceram um lar, uma família. Que tornaram possível a realização da minha graduação em Engenharia Florestal, que muito incentivaram minha carreira profissional e me deram total apoio para o regresso à academia e continuidade dos estudos.

À minha querida e amada irmã, Keyla, pelo apoio, pelos almoços, quitutes e longas conversas. Por muitas vezes me ajudar e ver além e a compreender o que se mostrava turvo.

À minha querida e amada companheira Fernanda, sem a qual nada disso seria possível, por ter me apoiado incondicionalmente durante todo o processo. E aos nossos dez gatinhos que sempre propiciam momentos de alegria e distração!

Às minhas amadas sobrinhas fofas, Gabriela e Lívia, pelos bons momentos juntas e pelas inúmeras revistas em quadrinhos emprestadas, pra quando eu já não aguentava mais ler artigos!

À Sonia e ao Paulo, pelo imensurável apoio na mudança do QG.

Ao colega Carlos Gonzaga, pelo apoio e incentivo.

À mestra Carolina e ao mestre Bruno (*in memoriam*), pelos ensinamentos passados, que sem dúvida foram de grande valia para toda a jornada!

Às queridas amigas Vimala Voar, Carla, Paula e eterna vizinha Paty, pelos incentivos e apoios tangenciais e incondicionais. Amo vocês!

À Dona Terezinha, ao Seu Roberto, à Dona Dete, ao Seu Cazuya, à Dona Cidinha, produtores, militantes e atores da causa agroecológica, pelas prosas, chimarrões e saborosos alimentos.

Aos queridos colegas Karina, Marina, Carla Mussio, Luciano, Reinaldo, Jocasta, Bell, Tiago, Fer Rocha, Alexandre e Carlos N. pelo compartilhar direto desta caminhada.

À professora e orientadora Dra Engenheira Florestal Fabiana Schmidt Bandeira Peres e ao professor e co-orientador Dr Evandro Vagner Tambarussi, pelo acompanhamento, incentivo, confiança e orientação deste trabalho.

Ao professor e colega Eduardo da Silva Lopes, pelas conversas, incentivo e orientações.

Ao professor e colega Flávio, pelo apoio, paciência e auxílio no isolamento e identificação dos fungos.

Ao professor e colega Rogério Bobrowski pela paciência, dedicação e ajuda na parte estatística.

Aos colegas Rodrigo Geroni, Carla Krulikowski, Rodrigo (Rodrighinho) pelas ideias compartilhadas e contribuições.

Aos professores Henrique, Júlio, Ana Paula e João pelos conhecimentos repassados e ideias compartilhadas, em especial aos professores Andrea, Gabriel, Kátia e Afonso, pelos compartilhamentos desde a graduação.

Ao professor Joelson Pereira, pelo apoio e incentivo.

Ao colega Adenilson, técnico do laboratório, pelas prosas, cafés e muitos auxílios! Ao William e Leonardo, pelas assistências durante a execução desta pesquisa e ao Ariel, pelo apoio no viveiro.

À Adriane, secretária da pós-graduação em Ciências Florestais pela ajuda e orientações nos processos burocráticos e pelos incontáveis cafés. E ao Fernando, secretário do departamento de Engenharia Florestal pelos auxílios prestados.

A todas as pessoas que tornaram possível o auxílio financeiro gerido pela CAPES e a mim repassado. À CAPES pela gestão dos recursos.

À empresa Baldo, que nos confiou o material para realização desse trabalho, bem como à Engenheira Florestal Raíssa e sua equipe por todo o apoio nas coletas do material.

Muitas pessoas fizeram parte desse caminho, todas colaboraram de alguma forma para os resultados aqui apresentados. Talvez minha memória, deveras falha às vezes, não me permita nomear todas aqui, mas mesmo àquelas que minha memória não me permite lembrar, à todas que fizeram parte da minha vida até o presente momento, gratidão, gratidão, gratidão!

*“Love is the answer and you know that for sure  
Love is a flower, you got to let it, you got to let it grow”*  
(John Lennon – Mind Games)

*“A busca do saber interior,  
orientada pela presença divina,  
traz a integração mais elevada.”*  
(Yogasutra de Patañjali)

Ao ser humano foi concedida a inteligência e o livre-arbítrio.  
Cabe-nos, deles, fazermos bom uso!



## RESUMO

*Ilex paraguariensis* (erva-mate), é uma espécie de grande importância ambiental, social e econômica, na região sul do país. Métodos de propagação vegetativa, como o cultivo *in vitro*, desde que se desenvolvam protocolos viáveis, podem ser utilizados para a produção de mudas a partir de clones selecionados, na formação de ervais com maior produtividade e uniformidade. Entretanto, a contaminação bacteriana e fúngica e a oxidação fenólica têm sido os maiores entraves para a propagação *in vitro* da erva-mate. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de soluções inorgânica e orgânicas em diferentes tempos de imersão (10; 20; 30 e 40 minutos), na etapa de isolamento e indução *in vitro* de gemas axilares em segmentos nodais e gemas axilares isoladas. A solução inorgânica utilizada nos experimentos constituiu-se de hipoclorito de sódio (NaOCl) (7,5; 10 e 20 mL. L<sup>-1</sup>), e as soluções orgânicas foram compostas por *Equisetum hyemale* L. (10 g. L<sup>-1</sup>), própolis (5 e 10 mL. L<sup>-1</sup>), óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* Cheel (melaleuca) (5 e 10 mL.L<sup>-1</sup>), *Menta arvensis* L. (hortelã-japonesa) (1,25; 2,5; 5 e 10 mL. L<sup>-1</sup>), *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (cravo) (1,25 e 10 mL. L<sup>-1</sup>) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão) (1,25; 2,5 e 5 mL. L<sup>-1</sup>), em diferentes combinações ou puros, de acordo com cada experimento. Ao meio de cultivo MS, contendo 100% e 25% da concentração de sais, acrescido de 3% de sacarose, 0,01% de mioinositol e BAP, adicionaram-se ou não os produtos utilizados para composição da solução orgânica. Avaliou-se ainda o tipo de propágulo utilizado na confecção dos explantes (segmento nodal e gemas axilares isoladas). No caso dos segmentos nodais, avaliou-se a origem dos propágulos (de brotações menores e maiores que 15 cm de comprimento), bem como a posição do explante na brotação (basal, mediana ou apical). Foi avaliado também o efeito de antioxidantes (ácido ascórbico, cisteína e carvão ativado); concentrações do regulador de crescimento BAP (1 e 2 mg. L<sup>-1</sup>) e extrato pirolenhoso; e condições de cultivo (câmara escura, sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e DBO). O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições constituídas de quatro tubos de ensaio, contendo um explante por tubo. As características avaliadas foram a porcentagem de contaminação bacteriana, de contaminação fúngica, de oxidação, de sobrevivência e de indução de brotações. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis (KW) e as médias foram comparadas pelo Teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os óleos essenciais de *M. arvensis* e *S. aromaticum* utilizados em solução desinfestantes foram eficientes na redução da contaminação fúngica e bacteriana. Quando utilizados no meio de cultivo, foram eficientes na obtenção de culturas livres de contaminação fúngica e bacteriana, contudo não houve brotação de gemas axilares. O tratamento de desinfestação que resultou em maior número de explantes com brotações foi a imersão dos explantes por 30 minutos em 7,5 mL. L<sup>-1</sup> de NaOCl. Os propágulos da região basal, independente do tamanho das brotações utilizadas (maior ou menor que 15 cm), resultaram em maior sobrevivência e brotações induzidas. Explantes de segmento nodal resultaram em maior brotação, enquanto as gemas axilares isoladas resultaram em menor contaminação. Não houve diferença significativa entre as doses de BAP aplicadas e não houve redução da oxidação pelos antioxidantes empregados, porém o ácido ascórbico auxiliou no controle de contaminação bacteriana. A melhor condição de cultivo dos explantes foi em sala de crescimento sem pré-isolamento em câmara escura. A oxidação foi o fator mais limitante ao sucesso do isolamento e indução *in vitro*, para os clones estudados.

**Palavras-chave:** desinfestação inorgânica, soluções orgânicas, oxidação, cultivo *in vitro*, erva-mate.

## ABSTRACT

*Ilex paraguariensis* (mate) is a species of significant environmental, social and economic importance in the southern region of Brazil. Methods of vegetative propagation, such as *in vitro* cultivation, provided that viable protocols are developed, can be used for the production of plantlets from selected clones, to form mate plantations with better uniformity. However, bacterial and fungal contamination and phenolic oxidation has been the major obstacle for an *in vitro* propagation of mate. The objective of this work was to evaluate the effect of chemical and organic solutions in different immersion times (10, 20, 30 and 40 minutes) in the isolation and *in vitro* induction of axillary buds in nodal segments and isolated axillary buds. A chemical solution used in the experiments consisted of sodium hypochlorite (NaOCl) (7.5, 10 and 20 mL.L<sup>-1</sup>), and as organic solutions were *Equisetum hyemale* L. (10 gL<sup>-1</sup>), propolis 5 and 10 mL.L<sup>-1</sup>), essential oils of *Melaleuca alternifolia* Cheel (melaleuca) (5 and 10 mL.L<sup>-1</sup>), *Menta arvensis* L. (Mint) (1.25; 2.5; 10 mL.L<sup>-1</sup>), *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. And LM Perry (clove) (1.25 and 10 mL.L<sup>-1</sup>) and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) (1.25, 2.5 and 5 mL.L<sup>-1</sup>) in different combinations or pure, according to each experiment. To the MS culture medium, 100% and 25% concentration of salts of the medium, plus 3% sucrose, 0.01% myoinositol and BAP, added or not the products for use composition of the organic solution. It was also evaluated the type of propagule used in the elaboration of the explants (nodal segment and caulinar apex). To the nodal segments, was evaluated the origin of the propagules, as well as to the position of explant at budding (basal, median or apical). It was also evaluated the effect of antioxidants (ascorbic acid, cysteine and activated charcoal); concentrations of the 6-benzylaminopurine growth regulator (BAP, 1 and 2 mg.L<sup>-1</sup>) and wood vinegar; and culture conditions (darkroom, growth room with photoperiod of 16 hours and BOD). The design was completely randomized, with five replicates consisting of four test tubes containing one explant per tube. Was evaluated the percentage of bacterial contamination, fungal contamination, oxidation, survival and sprout induction. Statistical analysis was executed through the Kruskal-Wallis test (KW) and the means were compared by the Duncan test at the 5% error probability level. The essential oils of *M. arvensis* and *S. aromaticum* use in disinfectants solution was efficient in the reduction of fungal and bacterial contamination. When added in culture medium was effective in obtaining cultures free from fungal and bacterial contamination, however there was no budding of axillary buds. The disinfection treatment that resulted in a greater number of budding explants was immersion of the explants for 30 minutes in NaOCl 7,5 mL.L<sup>-1</sup>. The propagules of the basal region, regardless of shoot size (bigger or smaller than 15 cm), resulted in higher survival and induced sprouts. Nodal segment explants resulted in greater budding, while isolated axillary buds resulted in lower contamination. There was no significant difference between applied doses of BAP and there was no reduction of the oxidation by antioxidants used, but the ascorbic acid promoted a control of bacterial contamination. The best culture condition of the explants was in a growth room without pre-isolation in a darkroom. Oxidation was the most limiting factor for the success of *in vitro* isolation and induction for the clones studied.

**Keywords:** chemical disinfection, organic solutions, oxidation, *in vitro* cultivation, mate.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
3.1. Caracterização, importância e propagação da <i>Ilex paraguariensis</i> Saint Hilaire .....	17
3.2. Micropropagação .....	19
3.2.1. Micropropagação de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	19
3.3. Agentes antioxidantes .....	21
3.4. Óleos essenciais e produtos naturais .....	22
3.5. Tipo de explante .....	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
4.1. Local de realização do estudo e material vegetal.....	25
4.2. Preparo das brotações e procedimentos padrões de desinfestação .....	26
4.3. Meio de cultivo.....	27
4.4. Isolamento de fungos e bactérias e teste de patogenicidade.....	28
4.5. Ambiente de cultivo .....	28
4.6. Avaliações .....	28
4.7. Experimento 1 – Desinfestação inorgânica e orgânica no isolamento de segmentos nodais <i>in vitro</i> , em diferentes tempos de imersão .....	29
4.8. Experimento 2 – Desinfestação inorgânica, em diferentes concentrações, e orgânica, em diferentes concentrações e composições, no isolamento de segmentos nodais <i>in vitro</i> . 30	
4.9. Experimento 3 – Desinfestação inorgânica, orgânica, adição de óleos essenciais ao meio e condições de cultivo no isolamento de segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	31
4.10. Experimento 4 – Efeito de composições da solução orgânica, de concentrações de óleo essencial adicionados ao meio de cultivo e uso de antioxidantes no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	32
4.11. Experimento 5 - Padronização de explantes e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	33
4.12. Experimento 6 – Concentrações de BAP, antioxidante e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	34
4.13. Experimento 7 – Tipo de explante e aditivos ao meio de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares <i>in vitro</i> .....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
5.1. Experimento 1 – Desinfestação inorgânica e orgânica no isolamento de segmentos nodais <i>in vitro</i> , em diferentes tempos de imersão .....	37
5.2. Experimento 2 – Desinfestação inorgânica, em diferentes concentrações, e orgânica, em diferentes concentrações e composições, no isolamento de gemas axilares em segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	41
5.3. Experimento 3 – Desinfestação inorgânica, orgânica, adição de óleos essenciais ao meio e condições de cultivo no isolamento de segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	44

5.4. Experimento 4 – Efeito de concentrações de óleos essenciais na solução desinfestante e na composição do meio de cultivo e uso de antioxidantes no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	48
5.5. Experimento 5 – Origem, tipos de explantes e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	51
5.6. Experimento 6 – Concentrações de BAP, antioxidante e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais <i>in vitro</i> .....	56
5.7. Experimento 7 – Tipos de explantes e aditivos ao meio de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares <i>in vitro</i> .....	59
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Isolamento e indução *in vitro* de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*... 27
- Figura 2** - Efeito das soluções inorgânica e orgânica em diferentes tempos de imersão das brotações (em minutos) para os clones avaliados, na desinfestação de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*. 38
- Figura 3** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) na desinfestação inorgânica e orgânica, em diferentes tempos de imersão, de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, após 30 dias de isolamento *in vitro*. 40
- Figura 4** - Efeito das diferentes composições e concentrações das soluções inorgânica e orgânica na desinfestação de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis* avaliados aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. 42
- Figura 5** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) na desinfestação inorgânica e orgânica, em diferentes concentrações e composições, de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, após 30 dias de isolamento *in vitro*. 44
- Figura 6** - Efeito de soluções inorgânica e orgânicas na desinfestação de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis* isolados em meio com e sem adição de óleo essencial, mantidos ou não em câmara escura na primeira semana após o isolamento, avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. 46
- Figura 7** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) na desinfestação inorgânica e orgânica de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, cultivados em meio com e sem óleo essencial, após 30 dias de isolamento *in vitro*. 48
- Figura 8** - Efeito das diferentes composições e concentrações de óleo essencial e de antioxidante adicionados ao meio de cultivo de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis* submetidos à desinfestação em soluções inorgânica e orgânica, avaliados aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. 50
- Figura 9** - Efeito de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, oriundos de diferentes regiões (apical, mediana e basal) e tamanho de brotações, submetidos a diferentes ambientes de cultivo, avaliados aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. 52
- Figura 10** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) em segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, oriundos de diferentes regiões (apical, mediana e basal) e tamanho de brotações (menor e maior que 15 cm), submetidos a diferentes ambientes de cultivo, após 30 dias de isolamento *in vitro*. 54
- Figura 11** - Sobrevivência e oxidação fenólica em segmentos nodais de clones adultos de *I. paraguariensis* em função do tamanho (maior ou menor que 15 cm) e região da brotação (apical, intermediária e basal), aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. 55
- Figura 12** - Efeito de concentrações de BAP, antioxidante e ambiente de cultivo no isolamento *in vitro* de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, aos 30 dias de isolamento *in vitro*. 57

<b>Figura 13</b> -Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) de segmentos nodais de clones de <i>I. paraguariensis</i> , cultivados em diferentes concentrações de BAP, antioxidante e ambientes de cultivo, após 30 dias de isolamento <i>in vitro</i> .....	58
<b>Figura 14</b> -Efeito de diferentes tipos de explantes de clones de <i>I. paraguariensis</i> , cultivados em meio básico com ou sem carvão ativado ou extrato pirolenhoso, após 30 dias de isolamento <i>in vitro</i> .....	60
<b>Figura 15</b> -Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) de clones (C1 e C2) e tipos de explantes (gema axilar isolada e segmento nodal) isolados de clones de <i>I. paraguariensis</i> , cultivados em meio básico com ou sem carvão ativado ou extrato pirolenhoso, após 30 dias de isolamento <i>in vitro</i> .....	61



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Desinfestação de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, utilizando soluções inorgânica (à base de NaOCl) e orgânicas (à base de *E. hyemale*, propólis e óleos essenciais de *M. alternifolia* e *S. aromaticum*). ..... 30
- Tabela 2** - Desinfestação de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, utilizando soluções inorgânica (à base de NaOCl) e orgânicas (à base de *E. hyemale*, propólis e óleos essenciais de *M. alternifolia*, *S. aromaticum* e *M. arvensis*), isolados em meios de cultivo com ou sem aditivo em sua composição..... 32
- Tabela 3** - Desinfestação de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, em solução inorgânica (NaOCl) ou orgânica (com óleos essenciais de *M. arvensis*, *S. aromaticum* e *C. citratus*) e isolamento em meios de cultivo contendo concentrações de óleo essencial de *M. arvensis* e *C. citratus* e antioxidante. .... 33
- Tabela 4** - Padronização de segmentos nodais excisados de diferentes posições de brotos de diferentes tamanhos de clone de *I. paraguariensis*, coletados de minicepas estabelecidas em minijardim clonal localizado em São Mateus do Sul ou de minicepas cultivadas em vasos localizados em Irati, acondicionados em sala de crescimento ou incubadora tipo DBO. .... 34
- Tabela 5** - Concentrações de BAP, antioxidante e condições de cultivo no isolamento e indução *in vitro* de clones de *I. paraguariensis*..... 35
- Tabela 6** - Tipos de explantes (segmento nodal e gema axilar isolada) e aditivos (carvão ativado e extrato pirolenhoso) incorporados ao meio de cultivo para o isolamento e indução *in vitro* de clones de *I. paraguariensis*. ..... 36
- Tabela 7** - Análise de Kruskal-Wallis (KW) em segmentos nodais de diferentes clones de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes tempos de imersão das brotações, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. 37
- Tabela 8** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes concentrações e composições, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. .... 41
- Tabela 9** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes concentrações e composições, com ou sem óleo essencial no meio de cultivo, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. .... 45
- Tabela 10** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes concentrações e composições, com ou sem adição de óleo essencial ou antioxidante ao meio de cultivo, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. .... 49
- Tabela 11** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, oriundos de diferentes regiões (apical, mediana e basal) e tamanho de brotações, submetidos a diferentes ambientes de cultivo, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. ..... 51
- Tabela 12** - Análise de Kruskal-Wallis (KW) em segmentos nodais de diferentes clones de *I. paraguariensis* isolados em meio com concentrações de BAP, com ou sem ácido ascórbico, mantidos em diferentes ambientes de crescimento, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. .... 56
- Tabela 13** - Análise de Kruskal-Wallis (KW) para diferentes tipos de explantes isolados de clones de *I. paraguariensis*, cultivados em meio acrescido ou não com carvão ativado ou extrato pirolenhoso, para as variáveis avaliadas após 30 dias do isolamento *in vitro*..... 59

## ABREVIATURAS

AIA	ácido-3-indolacético
BAP	6-benzilaminopurina
BDA	batata, dextrose e ágar (meio de cultivo para fungos e bactérias)
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
MS	Murashige & Skoog (1962), meio de cultivo <i>in vitro</i>
HCl	ácido clorídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	água oxigenada
HgCl <sub>2</sub>	cloreto de mercúrio
KW	Teste de Kruskal-Wallis
NaOCl	hipoclorito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
pH	potencial hidrogeniônico (indica acidez ou basicidade de uma solução)
SAFs	Sistemas Agroflorestais
KIN	cinetina
ZEA	zeatina
PVP - 10	polivinilpirrolidona
Unicentro	Universidade Estadual do Centro-Oeste



## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) ocupa destaque no mercado brasileiro, principalmente no sul do país, em que além de ser muito consumida na forma de infusão (chá), chimarrão e tereré, as folhas têm sido utilizadas como matéria prima para fabricação de cosméticos e medicamentos. Devido seu caráter nativo, é uma espécie de boa adaptabilidade para o consorciamento em sistemas agroflorestais, tendo grande importância na agricultura familiar.

Os ervais manejados atualmente estão aquém do potencial de produção, pois a maioria das mudas implantadas em campo são oriundas de propagação seminal (DANIEL, 2009; SANTIN et al., 2017). A produção de mudas a partir de sementes requer longo período de estratificação das sementes devido a dormência por imaturidade do embrião e são de difícil obtenção, devido a irregularidade da produção de sementes de *I. paraguariensis* de um ano para outro (ZANON, 1988; MENNA, 1995; DANIEL, 2009).

A regularidade da produção de mudas de *I. paraguariensis* de qualidade superior poderia ser solucionada por meio de técnicas de propagação vegetativa (SANTIN et al., 2017). Contudo, a taxa de enraizamento de estacas de *I. paraguariensis* ainda é variável, sendo influenciada por diversos fatores, desde a nutrição da planta matriz ao genótipo (AGUIAR et al., 2017; FAUERHARMEL et al., 2017).

Dentre as modernas técnicas de biotecnologias, a propagação *in vitro* (ou micropropagação), que consiste em uma técnica de produção de mudas em ambiente asséptico, a partir de qualquer parte do tecido vegetal, gerando plantas livres de contaminação e idêntica à original (HARTMANN, 1997), pode melhorar o enraizamento de plantas de difícil propagação por estaquia (XAVIER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012) sendo uma alternativa que poderá vir a ser empregada diretamente na produção de clones selecionados de *I. paraguariensis* ou na formação de microjardins clonais.

A micropropagação, em sua fase inicial de isolamento e indução, é influenciada principalmente pela origem e tipo do explante, esterilização dos explantes e condições de cultivo (OLMOS et al., 2010) e embora alguns pesquisadores, tenham obtido sucesso na produção de mudas de *I. paraguariensis* por micropropagação (HÖRNER, 2001; ZANIOLO; ZANETTE, 2001 e HORBACH, 2008), desafios ainda persistem, principalmente atrelados à contaminação por microrganismos e oxidação, sendo os maiores entraves para o sucesso da propagação *in vitro* de muitas espécies lenhosas (VELTILARI; QUISEN, 2012).

Diante do exposto evidencia-se a necessidade de estudos adicionais da propagação *in vitro* de *I. paraguariensis* avaliando o isolamento e indução de diferentes tipos de

explantes submetidos a desinfestação com produtos alternativos e isolamento em meio contendo diferentes biocidas e antioxidantes.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a etapa de desinfestação no isolamento e indução *in vitro* no processo de micropropagação de clones adultos de *I. paraguariensis* com o uso de substâncias orgânicas e inorgânicas na desinfestação de diferentes tipos de explantes cultivados em diferentes ambientes.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Avaliar e analisar a eficiência da desinfestação inorgânica e orgânica, no estabelecimento *in vitro* e indução de gemas axilares de clones adultos de *I. paraguariensis*;
- b) Avaliar e analisar o uso de óleos essenciais na composição do meio de cultivo na etapa de isolamento e indução de gemas axilares nos segmentos nodais de clones adultos de *I. paraguariensis*;
- c) Avaliar e analisar o uso de antioxidantes na composição do meio de cultivo para o isolamento e indução de gemas axilares nos segmentos nodais de clones adultos de *I. paraguariensis*;
- d) Avaliar e analisar os tipos de explantes e condições de cultivo na etapa de isolamento e indução de gemas axilares na micropropagação de clones adultos de *I. paraguariensis*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Caracterização, importância e propagação da *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire

*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire, comumente conhecida como erva-mate, é uma espécie de distribuição geográfica concentrada no sul do continente Sul-Americano, abrangendo territórios brasileiro, argentino e paraguaio, por cerca de 540.000 km<sup>2</sup>, área esta localizada entre as coordenadas geográficas de latitudes 21°S e 30° S e longitudes 48°30'W e 56°10'W. As regiões onde *I. paraguariensis* ocorrem, variam de altitude entre 500 a 1.000 metros, e apresentam clima temperado sem estação seca (Köpen-Geiger – Cfb) (DE OLIVEIRA; ROTTA, 1983).

Planta de hábito arbustivo-arbóreo, tolerante a solos com baixos teores nutricionais e com alto teor de alumínio. Geralmente ocupa o estrato médio da floresta, com altura variando de 4 a 10 m, podendo chegar a 25 metros em condições naturais (OLIVEIRA, 1985; LORENZI, 2002; DANIEL, 2009). É uma planta dicotiledônea, de flores hermafroditas, quais são unissexuais por aborto. Suas folhas são simples, glabras, obovadas, com base cuneada, de borda dentadas, alternas, cujo comprimento varia de 8 a 10 centímetros e largura de 4 a 5 centímetros (DANIEL, 2009).

Suas folhas, muito apreciadas para infusões (chás) e chimarrão, são ainda utilizadas como matéria prima na fabricação de corante natural, cosméticos e medicamentos, e possuem propriedades antioxidante, tônica, estimulante, diurética e protetora de processos degenerativos (PASINATO, 2002; MACHADO, 2007; DANIEL, 2009).

A cultura da *I. paraguariensis* remonta ao período da colonização européia, por volta de 1554 e foi repassada pelos índios aos colonizadores (PASINATO, 2002). Na região Sul do país, caracteriza-se por um dos sistemas agroflorestais mais antigos e tradicionais, assumindo grande importância ambiental, social e econômica na região (PENTEADO et al., 2000).

A espécie, devido ao seu caráter nativo, presente na Mata Atlântica, desenvolve-se bem em sistemas de consorciamento com outras plantas (Sistemas Agroflorestais - SAFs), contribuindo para a preservação da entomofauna e auxiliando no equilíbrio dos ecossistemas locais (PASINATO, 2002). Ocorre naturalmente em solos de baixa fertilidade, sendo muitas vezes recomendada também para a recuperação de ecossistemas degradados (CARVALHO, 2003).

O Brasil é o segundo maior produtor de *I. paraguariensis*, com mais de 616 mil toneladas de *I. paraguariensis* verde. O Rio Grande do Sul é o estado de maior produção de ervais plantados, enquanto o Paraná caracteriza-se por ser o estado que mais produz *I. paraguariensis* de ervais nativos (IBGE, 2016).

A maioria dos ervais plantados são estabelecidos com mudas de origem seminal (FAUERHARMEL et al., 2017), quais são de difícil produção devido à baixa germinação e produção irregular de sementes.

A baixa germinação das sementes, em que, de forma geral apenas 20% das sementes germinam (CUQUEL et al., 1994; GRIGOLETTI JUNIOR et al., 1999; DANIEL, 2009), está relacionada ao fato de suas sementes apresentarem dormência causada pela imaturidade do embrião zigótico, o que torna necessária a etapa de estratificação das sementes, acarretando em demasiado tempo no processo de produção das mudas no viveiro, que pode chegar a 18 meses (ZANON, 1988; MENNA, 1995; DANIEL, 2009).

A problemática da propagação da *I. paraguariensis* por semente, não se concentra apenas na baixa maturidade dos embriões, em torno de 0,5% a 0,9% (NIKLAS, 1987; DUBOC; FRANÇA, 2015). A espécie ainda apresenta limitações quanto à produção de sementes, muito irregular de um ano para o outro, além de apresentar maturação heterogênea dos frutos, sendo comum encontrar frutos verdes, fisiologicamente maduros e já em avançado grau de maturação, na época considerada “normal” de maturação dos frutos, correspondente aos meses de dezembro a abril (ZANON, 1988; MENNA, 1995; DANIEL, 2009).

Apesar das limitações da produção de mudas de *I. paraguariensis* por sementes, esta ainda tem sido amplamente utilizada devido a maior facilidade com relação ao domínio da técnica e pela falta de ciência e tecnologia envolvidas no processo de propagação vegetativa (EMBRAPA, 2014).

A propagação vegetativa a partir de indivíduos selecionados de *I. paraguariensis* possibilita reduzir as barreiras relacionadas à sazonalidade da produção e à dormência das sementes, além de permitir o estabelecimento de plantios de maior uniformidade, produtividade e qualidade (GRAÇA, et al., 1990; EMBRAPA, 2014).

Embora a propagação vegetativa de *I. paraguariensis* a partir de estacas seja uma alternativa à produção de mudas, o enraizamento é variável, apresentando taxas de 10% a 87,5%, dependendo da planta fornecedora de propágulo (idade e genótipo), da utilização ou não de indutores de enraizamento e ainda da época do ano (INOUE; PUTTON, 2007; BITENCOURT et al., 2009; STUEPP et al., 2017).

Ante este contexto, a micropropagação constitui-se de uma técnica de propagação vegetativa que, para espécies lenhosas como *Eucalyptus*, tem apresentado um resultado satisfatório, possibilitando o rejuvenescimento e a propagação de genótipos difíceis de enraizar (XAVIER; COMÉRIO, 1997; SOTELO; MONZA, 2007; ARYA et al., 2009; GALLO et al., 2017).

### 3.2. Micropropagação

A micropropagação ou propagação *in vitro* é uma técnica de propagação vegetativa de cultivo em ambiente controlado, sob condições assépticas. Difere das demais técnicas de propagação vegetativa, pois as etapas de desenvolvimento biológico são realizadas separadamente, sendo possível manipulá-las e programá-las por meio da seleção dos explantes (fragmento vegetal utilizado para iniciar a cultura) e do ambiente de cultivo (GEORGE et al., 2008; HARTMANN et al., 1997).

A técnica baseia-se no princípio da totipotência celular, a capacidade que toda célula vegetal tem de se organizar e gerar um novo indivíduo, mantendo as características do indivíduo original. Basicamente existem dois sistemas de micropropagação: formação de brotos a partir de gemas axilares e formação de brotos a partir de tecidos da planta (HARTMANN et al., 1997).

Dentre as vantagens da micropropagação, destacam-se a produção de plantas livre de contaminação e melhoria no enraizamento de plantas de difícil propagação pelo enraizamento de estacas (XAVIER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012). A micropropagação é geralmente executada em cinco etapas: preparação de plantas matrizes, estabelecimento e indução dos explantes *in vitro*, multiplicação, formação de raízes e aclimatização (HARTMANN et al., 1997; GEORGE et al., 2008).

A etapa de estabelecimento e indução dos explantes *in vitro* é de fundamental importância para que seja possível o avanço na micropropagação de qualquer espécie, permitindo assim a criação de um protocolo para resgate e produção de mudas de qualidade (HANSEL et al., 2005). Um dos maiores entraves no estabelecimento e indução dos explantes *in vitro*, é a obtenção de cultivo viável e axênico, devido à ocorrência de organismos endofíticos, e o controle da oxidação causada por compostos fenólicos (BARRUETO CID; JORDAN ZIMMERMAN, 2006; DUTRA; SILVA, 2009). Estes problemas podem ser minimizados com o controle da origem e tipo de explante, esterilização dos explantes e condições de cultivo (OLMOS et al., 2010). Por vezes alguns patógenos, em geral oriundos do sistema vascular da planta, persistem no cultivo, para que se faz necessário o uso de antibióticos no meio de cultivo (OLMOS et al., 2010)

#### 3.2.1. Micropropagação de *Ilex paraguariensis*

Estudos conduzidos com *I. paraguariensis*, demonstram o potencial de uso da micropropagação na produção de mudas da espécie. Todavia, dos entraves frequentemente encontrados no estabelecimento das culturas *in vitro*, merecem destaque a contaminação

fúngica e bacteriana e a oxidação fenólica dos explantes (HÖRNER et al., 2001; ZANIOLO; ZANETTE, 2001; HORBACH, 2008; SUN et al., 2010; ROSS et al., 2017).

Zaniolo; Zanette (2001) no cultivo de segmentos nodais de *I. paraguariensis* oriundos de mudas seminais de dois anos de idade observaram menor contaminação quando da imersão em NaOCl ( $7,5 \text{ mL. L}^{-1}$ ) por 15 minutos, porém culminou em alta mortalidade dos explantes. A maior sobrevivência foi obtida com a imersão dos explantes em igual solução por 10 minutos.

Santos; Wendling (2010) avaliaram diversos desinfestantes (hipoclorito de sódio - NaOCl, cloreto de mercúrio -  $\text{HgCl}_2$  e água oxigenada -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), antioxidantes (polivinilpirrolidona - PVP 10; l-cisteína; carvão ativado e ácido cítrico) e reguladores de crescimento BAP (benzilaminopurina) e o ANA (ácido naftalenoacético) na desinfestação e cultivo *in vitro* de *I. paraguariensis*. O melhor procedimento para desinfestação de explantes foi a imersão em álcool 70% por dois minutos seguido de imersão em hipoclorito de sódio ( $15 \text{ mL. L}^{-1}$ ) por 30 minutos, o carvão ativado foi eficiente para redução da oxidação e não houve diferença no desenvolvimento dos explantes quando do uso dos reguladores de crescimento.

Horbach (2008) estudou diferentes formas de desinfestação de segmentos nodais de *I. paraguariensis*, oriundos de minicepas formadas a partir de propágulos de árvores de 10 anos de idade e tratadas com os fungicidas Captan<sup>®</sup> ( $2 \text{ mL.L}^{-1}$ ) e Cercobin<sup>®</sup> ( $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). A maior sobrevivência dos explantes (42,5%) foi obtida com o tratamento em que os explantes permaneceram imersos em álcool por quatro minutos e em NaOCl por 25 minutos. Após 15 dias, a contaminação foi maior por fungos (de 40% a 47%) que bactérias (de 22,5% a 30%), e a oxidação fenólica dos explantes variou de 15% a 52,5%.

Ross et al. (2017) avaliaram a desinfestação de explantes de dois genótipos de *I. paraguariensis* (genótipo comercial selecionado e nativo não selecionado) empregando-se o NaOCl nas concentrações de 1% e 2% (v/v), nos tempos de 15 e 25 minutos e a adição de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) ao meio de cultivo como agente biocida. Não houve diferença entre as concentrações e tempo de exposição dos explantes ao NaOCl. O nitrato de prata teve maior eficiência no controle de contaminação e oxidação, favorecendo a sobrevivência dos explantes. Em relação aos genótipos avaliados, observou-se que o material selecionado apresentou menor contaminação e maior oxidação que o material não selecionado.

Ante ao exposto, a etapa de isolamento e indução *in vitro* em espécies de *Ilex* ainda constitui um desafio, considerando-se a elevada contaminação por fungos e bactérias, e a oxidação fenólica dos explantes culminando na morte das culturas. Estes entraves justificam o desenvolvimento de mais pesquisas relacionando estes temas.

### 3.3. Agentes antioxidantes

O escurecimento dos explantes é comum em plantas lenhosas, principalmente devido à existência de elevada concentração de compostos fenólicos em seus tecidos. Na micropropagação de plantas lenhosas é comum o acúmulo de polifenóis e produtos da oxidação, tais como a melanina, suberina, lignina e cutina ao redor da superfície incisada (ANDRADE et al., 2000). Em alguns casos a oxidação pode ser tão intensa, causando escurecimento inclusive do meio de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A oxidação prejudica a absorção dos nutrientes oriundos do meio de cultivo e conseqüentemente o crescimento e a multiplicação do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), sendo um sério problema na micropropagação de plantas lenhosas.

Dentre as substâncias conhecidas como antioxidantes destacam-se o ácido ascórbico, a cisteína e o carvão ativado, que têm sido utilizadas no meio de cultivo com sucesso para inibição e redução da oxidação de explantes na micropropagação *in vitro* (GUERRA et al., 2016).

O ácido ascórbico é um antioxidante biológico, presente em abundância em muitas plantas. Age como antioxidante nas plantas removendo o peróxido de hidrogênio formado pela fotoredução de oxigênio (SMIRNOFF, 1996; LARSON, 1998). A eficiência do ácido ascórbico no controle da oxidação é relatada em explantes de *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinaheira-santa) (FLORES et al., 1998), *Olea europaea* L. (oliveira) (GONÇALVES et al., 2013), *Eugenia uniflora* (pitangueira) (LATTUADA, 2010), *Persea americana* Mill. (abacateiro) (BIASI et al., 1994) e *Musa* sp (bananeira) (ANICEZIO, 2012). Porém doses elevadas podem causar intoxicação nos explantes (ANICEZIO, 2012).

A cisteína, além do ácido ascórbico, é outro antioxidante utilizado na propagação *in vitro* e caracteriza-se por um aminoácido regulador de processos metabólicos e pode ser utilizado para promover o aumento na produção de culturas agrícolas ou para diminuir a fitotoxidez oriunda da aplicação de herbicidas e ainda como agente redutor, atuando na rápida remoção das quinonas que se formam ao redor da incisão do explante, além de atuar na redução da peroxidação (GEORGE et al., 2008; RINALDUCCI et al., 2008; CASTRO; CARVALHO, 2014; GUERRA et al., 2016). O controle da oxidação com o uso da cisteína, foi possível na micropropagação de *Psidium guajava* L. (goiaba) (CONCEPCIÓN et al., 2005), *Diospyros kaki* L. (caqui) (TELLES; BIASI, 2005) e de *Peltogyne purpurea* Pittier (CORREA; BOTERO, 2015).

O carvão ativado também tem sido utilizado com sucesso na micropropagação e caracteriza-se por um pó fino de coloração escura com alto poder de absorção de sólidos coloidais, gases e vapores, comumente utilizado para absorção de compostos fenólicos



ligados à oxidação dos explantes em cultivo *in vitro* (THOMAS, 2008; GUERRA et al., 2016), podendo inibir ou estimular o crescimento *in vitro*, prevenindo o desenvolvimento de plântulas anormais e melhorando a regeneração *in vitro* de plantas (GEORGE et al., 2008; THOMAS, 2008). Costa et al. (2006) observaram que o carvão ativado no meio de cultivo foi eficiente não só para reduzir a oxidação de explantes de *Musa* sp (bananeira), como também teve influência positiva na multiplicação e enraizamento *in vitro*. A utilização do carvão ativado em micropropagação de *Aloysia virgata* Juss. (lixa-branca) (FREITAS et al., 2009), *Rubus idaeus* L. (framboesa) (WANG et al., 2005), *Salix caprea* L. (salgueiro) (LIESEBACH; NAUJOKS, 2004), *Cedrus atlantica* Endl. (SALAZAR et al., 2016) foi eficiente para redução da oxidação dos explantes.

Para *I. paraguariensis*, os estudos ainda são incipientes, contudo, Mroginski et al. (1999) ao avaliar a adição de 1 mg. L<sup>-1</sup> de carvão no meio de cultivo, observaram ação antioxidante além de estimular o enraizamento dos explantes. Santos; Wendling (2010) ao comparar o efeito dos antioxidantes ácido ascórbico, cisteína, carvão ativado, polivinilpirolidona (PVP) e ácido cítrico, constataram que o carvão ativado proporcionou melhor resultado, reduzindo a oxidação dos explantes.

### 3.4. Óleos essenciais e produtos naturais

Os óleos essenciais são metabólitos secundários formados principalmente por isoprenóides e fenilpropanóides, a partir do metabolismo da glicose por meio do ácido chiquímico e do acetato, respectivamente (SANTOS, 2007). São de estrutura complexa, tendo como constituintes hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, álcoois simples e terpênicos, fenóis, éteres, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e compostos com enxofre (SIMÕES; VOLKER, 2007). Localizados em diversos órgãos das plantas (flores, folhas, frutos, sementes, caules, raízes, rizomas) ou em estruturas secretoras especializadas (pêlos glandulares, canais oleíferos, bolsas lisígenas), apresentam-se em baixas concentrações e possuem atividades biológicas específicas, podendo desempenhar papéis importantes em mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos, competição entre plantas, atração de polinizadores, entre outras funções (PERES, 2004; SIMÕES; VOLKER, 2007; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

*Melaleuca alternifolia* (melaleuca) é uma planta medicinal de hábito arbóreo, cujo óleo essencial extraído de suas folhas contém cerca de 100 componentes, sendo terpinen-4-ol (ao qual a atividade antimicrobiana é atribuída) e  $\gamma$ -terpinene os mais abundantes (CARSON et al., 2006; YADAV et al., 2016). Possui propriedade antimicrobiana comprovada para diversos fungos e bactérias (CARSON et al., 2006). Martins et al. (2010) constataram a eficácia na redução do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos à partir



da concentração de 0,2% (v/v). Souza et al. (2015) constataram que concentrações à partir 0,13% (v/v) inibiram o crescimento de *Cercospora beticola*, sendo que a dose de 0,8% (v/v), além de inibir o crescimento do fungo, resultou em maior incremento em peso e diâmetro das plantas, em todos os tratamentos avaliados.

*Syzygium aromaticum*, comumente conhecido como cravo-da-índia, é uma planta da família Myrtaceae, de hábito arbóreo, cujo óleo essencial extraído de seus botões florais contém como principal componente o eugenol, possuindo potencial nematicida, bactericida e fungicida (TSAO et al., 2000; DELESPAUL et al., 2000). Seu potencial para inibir o crescimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*) foi constatada por Guynot et al. (2003) e Martinez et al. (2007).

*Mentha arvensis* (hortelã-japonesa), planta herbácea, rica em mentol, cujo óleo essencial é eficaz no controle de fungos e bactérias fitopatogênicos em concentrações à partir de 1 mL. L<sup>-1</sup> (GADELHA et al., 2003; DINIZ et al., 2008; CHAUSSÉ et al., 2011).

*Cymbopogon citratus*, comumente conhecido como capim-limão, de hábito herbáceo, possui como principal componente químico o citral (mistura dos isômeros neral e geranial) (GOMES; NEGRELLE, 2003; LIMA et al., 2008). Sua eficiência no controle de fungos fitopatogênicos foi constatada por Valarani et al. (1994), Schwan-Estrada et al. (2000) e Fiori et al. (2000).

Além dos óleos essenciais, foco principal desta pesquisa, utilizados na desinfestação e estabelecimento inicial de explantes de *I. paraguariensis*, outros produtos naturais foram utilizados como coadjuvantes no processo de propagação *in vitro*: a *Equisetum hyemale* L, a própolis e o extrato pirolenhoso.

*Equisetum hyemale* L. (cavalinha) tem sido utilizada para o controle de fitopatógenos em sistemas agroecológicos por possuir propriedades fortificantes para a planta e tem demonstrado potencial no controle de fungos do solo (ASSESOAR, 2014).

A própolis, substância resinosa, produzida por abelhas através da modificação de materiais exsudados de ramos, flores, folhas, pólen e brotos de diversas plantas. Possui propriedades no controle do crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicos (BIANCHINI; BEDENDO, 1998; VARGAS, 2004).

O extrato pirolenhoso (EP) contém mais de 200 compostos químicos, é um subproduto da carbonização da madeira, produzido a partir da condensação durante os processos de carbonização em carvoarias, para o fábriço de carvão vegetal. Possui potencial para ser utilizado na agricultura para diversos fins, desde fertilizante à desinfetante do solo, e possui propriedades fungicidas e nematicidas (ZANETTI, 2003). O EP favorece o

desenvolvimento e sobrevivência de plantas (SCHNITZER et al., 2010; WANDERLEY et al., 2012; SHEN et al., 2012; FERNANDES et al., 2015) e seu potencial biocida natural foi relatado no controle dos fitopatógenos *Fusarium* sp, *Pythium* sp, *Rhizoctonia* sp (YAGI; TSUKAMOTO, 1991), *Alternaria mali* (JUNG, 2007), *Coleosporium plectranthi* (Kumar et al., 2011), *Puccinia nakanishikii* Dietel (ferrugem) (LORENZETTI et al., 2012) e *Phytophthora* sp (DONDE et al., 2013).

Os malefícios do surgimento de pragas secundárias, danos ao meio ambiente e ao ser humano e a aquisição de resistência por parte dos fitopatógenos, decorrentes do uso indiscriminado de compostos químicos sintéticos, torna imprescindível a busca por alternativas naturais de baixo impacto para seus controles (MARQUES et al., 2004; SILVA et al., 2005; ADEYEMI, 2010; HILLEN et al., 2012).

No cultivo *in vitro*, a obtenção de culturas axênicas constitui um desafio (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998; LUNA et al., 2013). A adição de antibióticos ao meio de cultivo é uma alternativa para a eliminação de bactérias e redução da contaminação da cultura (REED et al., 1998; LUNA et al., 2013), contudo podem exercer apenas efeito bacteriostático, induzir efeitos fitotóxicos nas plantas e resistência de microorganismos ao antibiótico (FALKINER, 1997). Por outro lado, os óleos essenciais são considerados potenciais biocidas naturais, e desta forma podem ser utilizados em protocolos de estabelecimento de tecidos vegetais *in vitro*, com vistas a obtenção de culturas livres de contaminações.

### **3.5. Tipo de explante**

De acordo com Grattaplagia; Machado (1998), qualquer tecido vegetal, devido à totipotencialidade das células, pode ser utilizado como explante. Dentre as técnicas de micropropagação, a proliferação de gemas axilares é uma prática comum na propagação *in vitro* de espécies lenhosas (OLIVEIRA et al., 2013), tendo como vantagem maior estabilidade genética das plantas micropropagadas, por envolver órgãos meristemáticos pré-formados (GEORGE et al., 2008).

O sucesso da propagação vegetativa é influenciado por diversos fatores, dentre eles a posição do propágulo na planta mãe e o tamanho do explante (GEORGE et al., 2008; WENDLING, 2013). Geralmente propágulos maiores tem maior chance de sobrevivência e desenvolvem-se mais rapidamente que propágulos de menores dimensões (GEORGE et al., 2008), contudo quanto menor o explante, maior a probabilidade de se obter culturas livres de contaminação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ERIG; FORTES, 2002).

Alguns pesquisadores (ERIG; SCHUCH, 2003; BIANCHI et al., 2003) obtiveram sucesso na micropropagação de espécies lenhosas (*Malus domestica* Borkh. - macieira - e *Cydonia oblonga* Mill. - marmeleiro) quando da confecção de explantes à partir de gemas, para a obtenção de culturas com menor contaminação, sendo uma prática de cultivo muito empregada na propagação *in vitro* de citros (ZAFFARI et al., 2013). Erig; Fortes (2002), avaliando dois tipos de explantes (gema e meristemas), para *Pyrus* spp, constataram que os explantes de meristemas apresentaram menor contaminação (tanto fúngica quanto bacteriana) e maior sobrevivência.

O efeito do cultivo *in vitro* de diferentes tipos de explantes foi ainda constatado por Hansel et al. (2005), que avaliaram segmentos nodais e ápices caulinares de *Eucalyptus benthamii*, resultando em maior contaminação em explantes de segmentos nodais e maior oxidação em explantes de ápices caulinares. E também foi relatado por Yadav et al. (1990) no cultivo de *Syzygium cuminii*, onde os segmentos nodais apresentaram maior número de brotações por explante.

A influência da posição de excisão do explante no sucesso da micropropagação, foi constatado por Pereira et al. (2014), ao avaliarem segmentos caulinares oriundos da posição basal, mediana e apical de mudas de *Araucaria angustifolia*. Estes autores observaram que explantes da região basal apresentaram brotações em maior quantidade e de maior comprimento. Radmann et al. (2009), constataram que explantes basais resultaram em maior número de emissão de brotações que explantes apicais. Contudo, na micropropagação de *Ulmus minor*, Conde et al. (2008) constataram que explantes apicais resultaram em maior número de brotações que explantes basais.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local de realização do estudo e material vegetal**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Silvicultura, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), *Campus* de Irati, Paraná.

O material vegetal utilizado consistiu de dois clones adultos (C1 e C2 provenientes do resgate vegetativo por enxertia em árvores matrizes de 80 e 5 anos de idade, respectivamente). Os clones foram estabelecidos em minijardim clonal, pertencente à empresa BALDO S. A., localizada no município de São Mateus do Sul, Paraná. As brotações utilizadas como fontes de propágulos foram provenientes de minicepas

conduzidas em regime de canaletão em leito de areia grossa com cobertura de casca de arroz carbonizada, sob cobertura plástica transparente.

As minicepas receberam adubação diariamente, via fertirrigação por gotejamento (50 mL por dia, aplicados por planta). O manejo e a nutrição mineral do minijardim clonal seguiram os procedimentos operacionais adotados pela empresa BALDO S.A. As minicepas receberam tratamento fitossanitário, previamente à coleta das brotações, em que foram realizadas duas pulverizações semanais do inseticida Kraft® (10 mL. L<sup>-1</sup>) e do fungicida Orthocide 500® (2,4 g. L<sup>-1</sup>), com auxílio de pulverizador costal. A aplicação de inseticida e de fungicida foram realizadas uma semana antes da coleta dos propágulos no minijardim clonal. Para a coleta das brotações, foram utilizadas luva e tesoura de poda previamente esterilizada em álcool 70% (v/v).

Após a coleta no minijardim, as brotações foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo coberto por papel absorvente. Em seguida, foram transportadas ao Laboratório de Silvicultura da Unicentro, onde realizou-se a assepsia dos explantes e demais tratamentos para desinfestação e isolamento *in vitro*, de acordo com os tratamentos aplicados.

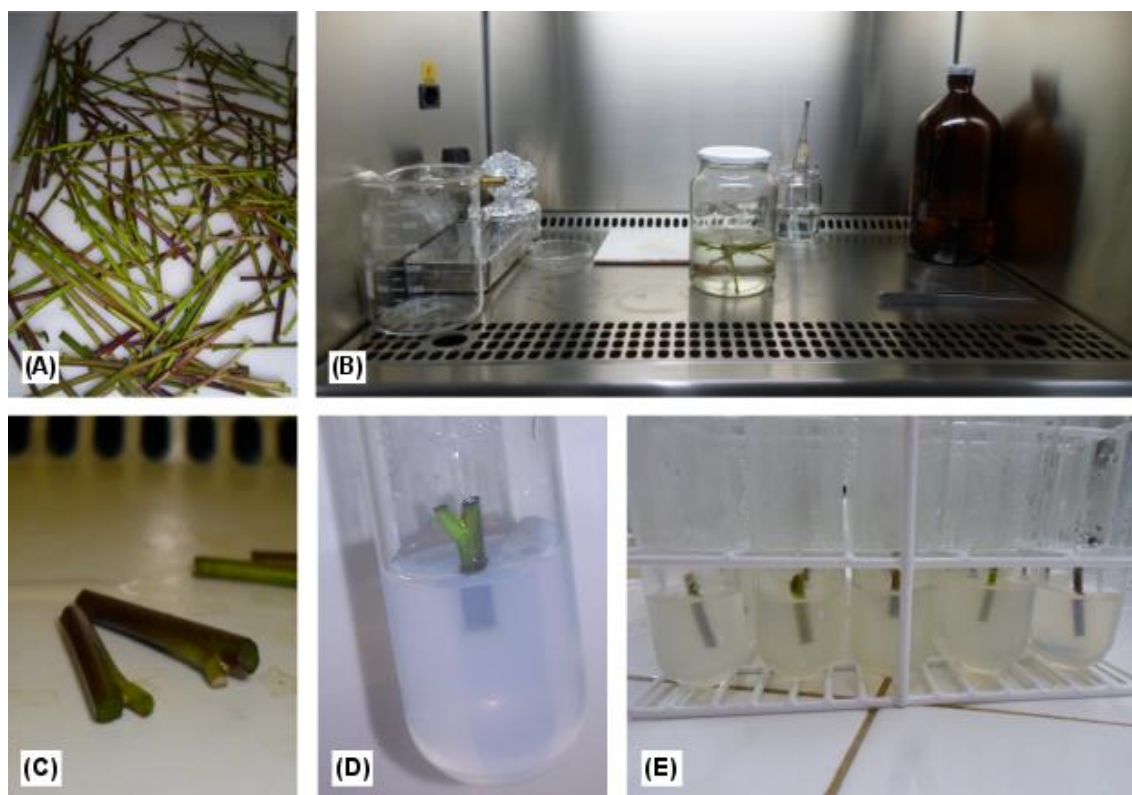
#### **4.2. Preparo das brotações e procedimentos padrões de desinfestação**

No laboratório de Silvicultura, nos experimentos 1 ao 4, removeram-se as folhas das brotações coletadas em minijardim clonal, sendo posteriormente seccionadas e colocadas em bandeja com água (Figura 1 A). Em seguida, as brotações foram lavadas em água corrente e detergente comercial e submetidas a três enxágues sucessivos em água desionizada e autoclavada. Nos experimentos 5 a 7, as brotações desfolhadas foram colocadas verticalmente em erlenmeyer e, com a base imersa em água, realizou-se uma excisão a, aproximadamente, 0,5 cm da base. As brotações permaneceram em água por 15 minutos. Em seguida foram seccionadas e submetidas à lavagem em água e detergente comercial.

Na capela de fluxo laminar, em recipiente fechado e sob agitação intermitente, os propágulos foram submetidos aos tratamentos de desinfestação (Figura 1 B) e enxágues, de acordo com os procedimentos específicos de cada experimento. As soluções de desinfestação utilizadas nos experimentos foram compostas por NaOCl (desinfestação inorgânica) ou por óleos essenciais (desinfestação orgânica).

Após os procedimentos de desinfestação das brotações, utilizando-se pinça e bisturi foram confeccionados explantes constituídos de segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento (Figura 1 C) e introduzidos em tubos de ensaio de 25 x 150 mm,

contendo meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Figura 1 D e 1 E). Os tubos de ensaio foram vedados com tampa de polipropileno.



**Figura 1** - Isolamento e indução *in vitro* de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*. **(A)** brotações coletadas em minijardim clonal antes do isolamento; **(B)** desinfestação das brotações em capela de fluxo laminar; **(C)** segmentos nodais desinfestados e preparados para serem isolados em meio de cultivo; **(D)** explante isolado em tubo de ensaio; **(E)** detalhe dos explantes isolados previamente ao acondicionamento em sala de crescimento.

#### 4.3. Meio de cultivo vegetal

O meio de cultivo utilizado foi o MS, acrescido de 30 g. L<sup>-1</sup> de sacarose; 100 mg. L<sup>-1</sup> de mioinositol e 2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (variando a concentração no experimento 6 - 1 e 2 mg. L<sup>-1</sup>). Após o preparo do meio, o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 com solução de NaOH (1 mol. L<sup>-1</sup>) e de HCl (1 mol. L<sup>-1</sup>). Como agente gelificante do meio, utilizou-se 6,5 g. L<sup>-1</sup> de ágar Vetec<sup>®</sup>, previamente fundido em forno de micro-ondas. Após, verteu-se 10 mL de meio por tubo de ensaio, quais foram vedados com tampas de polipropileno e esterilizados em autoclave (121 °C e 1 atm) por 20 minutos, previamente ao isolamento dos segmentos nodais.

Nos experimentos em que foram utilizados óleos essenciais acrescidos ao meio de cultivo, estes foram adicionados ao meio após sua esterilização em autoclave, em capela de fluxo laminar.

Nos experimentos 1 ao 4, utilizou-se o meio MS ¼ (contendo 25% da concentração de sais, enquanto nos experimentos 5 ao 7, utilizou-se o meio MS completo (contendo 100% da concentração de sais). A alteração do meio MS ¼ para MS na concentração total de sais foi definida com base em experimento paralelo (dados não apresentados), observando-se o melhor desenvolvimento dos clones C1 e C2 no meio MS em sua formulação completa.

#### **4.4. Isolamento de fungos e bactérias e teste de patogenicidade**

Os fungos e bactérias que se desenvolveram no experimento 1 foram isolados em meio de cultivo batata, dextrose e ágar (BDA).

O isolamento dos microorganismos foi feito em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de uma alça de platina. Os fungos foram isolados em placas de petri e mantidos por 7 dias em incubadora tipo DBO. As bactérias foram isoladas em tubos de ensaio e mantidas por 2 dias em incubadora tipo DBO.

Posteriormente, os fungos e bactérias isolados foram inoculados em folhas de mudas de *I. paraguariensis*, quais foram observadas diariamente por quinze dias quanto à alterações sintomatológicas (lesões necróticas, manchas, clorose ou murcha) que indicassem o desenvolvimento dos microorganismos inoculados.

#### **4.5. Ambiente de cultivo vegetal**

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, mantidas em escuro por sete dias antes de serem transferidas para fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, cuja irradiância foi de  $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida por lâmpadas brancas fluorescentes. Nos experimentos 4 ao 7, as culturas foram mantidas diretamente sob fotoperíodo. Dependendo do experimento (5 e 6) as culturas foram mantidas em incubadora tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) à temperatura de  $25 \pm 1$  °C ou  $22 \pm 1$  °C, conforme tratamento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, e irradiância de  $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### **4.6. Avaliações**

Após 30 dias do isolamento dos explantes, foram avaliadas a porcentagem de contaminação bacteriana, contaminação fúngica, oxidação, sobrevivência e de explantes com brotações. Foram considerados contaminados aqueles explantes que apresentaram quaisquer sinais de desenvolvimento de bactéria ou de fungo, tanto no meio de cultivo



quanto no explante; os explantes considerados oxidados foram aqueles que apresentaram escurecimento do tecido vegetal além das bordas das regiões de excisão.

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, constituídas de quatro tubos de ensaio, contendo um explante por tubo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade dos erros por meio do teste de Shapiro-Wilk, pela análise gráfica “QQ-Plot” e de homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, sendo constatados não paramétricos. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis (KW), e quando pertinente, as médias foram comparadas pelo Teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Para mensurar a associação linear entre duas variáveis, estimou-se o coeficiente de correlação de Spearman (SPEARMAN, 1904).

Realizou-se o processamento dos dados com o *software* R adicionado dos pacotes *Statistical Procedures for Agricultural Research (agricolae)* e *Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums (PMCMR)*.

#### **4.7. Experimento 1 – Desinfestação inorgânica e orgânica no isolamento de segmentos nodais *in vitro*, em diferentes tempos de imersão**

Neste experimento objetivou-se avaliar o efeito das soluções inorgânica e orgânica na desinfestação de propágulos de dois clones de *I. paraguariensis*, em diferentes tempos de imersão.

Os tratamentos constituíram-se em propágulos de dois clones, submetidos à desinfestação em solução inorgânica composta por NaOCl ( $7,5 \text{ mL. L}^{-1}$ ) e em solução orgânica composta de extrato de *E. hymale* ( $10 \text{ g. L}^{-1}$ ),  $5 \text{ mL. L}^{-1}$  de extrato alcóolico de própolis a 25% (m/v) e  $5 \text{ mL. L}^{-1}$  de óleo essencial de *M. alternifolia*, em diferentes tempos de imersão (10; 20; 30 e 40 minutos).

Após a desinfestação, os propágulos imersos em solução inorgânica foram submetidos a três enxágues sucessivos em água desionizada autoclavada enquanto os propágulos imersos em solução orgânica foram submetidos a um enxágue apenas, também em água desionizada e autoclavada.

Após a desinfestação, os explantes foram isolados em meio de cultivo e mantidos por sete dias em câmara escura e posteriormente colocados sob fotoperíodo conforme descrito no item 5.5.

#### 4.8. Experimento 2 – Desinfestação inorgânica, em diferentes concentrações, e orgânica, em diferentes concentrações e composições, no isolamento de segmentos nodais *in vitro*

Neste experimento objetivou-se avaliar, em apenas um clone (C1), o efeito de diferentes concentrações das soluções utilizadas na desinfestação inorgânica e orgânica, bem como o efeito de diferentes composições das soluções orgânicas.

Na solução inorgânica, convencionou-se o uso do NaOCl como agente desinfestante, utilizado nas concentrações 10 e 20 mL. L<sup>-1</sup>, enquanto nas soluções orgânicas, utilizou-se *E. hyemale*, propólis e óleo essencial de *M. alternifolia* e *S. aromaticum* (Tabela 1).

Os propágulos foram imersos por 15 minutos em cada solução e, para aqueles submetidos à desinfestação inorgânica foram realizados três enxágues em água desionizada autoclavada, enquanto os propágulos submetidos à desinfestação orgânica não foram enxaguados, a fim de criar uma película protetora nos explantes.

**Tabela 1** - Desinfestação de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, utilizando soluções inorgânica (à base de NaOCl) e orgânicas (à base de *E. hyemale*, propólis e óleos essenciais de *M. alternifolia* e *S. aromaticum*).

Tratamento	Pré-tratamento	Soluções inorgânicas e orgânicas
Orgânica 1 (O1)	-	EH (10 g. L <sup>-1</sup> ), PP (5 mL. L <sup>-1</sup> ) e MA (5 mL. L <sup>-1</sup> ), armazenado em vidro âmbar há 30 dias em geladeira.
Orgânica 2 (O2)	-	EH (10 g. L <sup>-1</sup> ), PP (5 mL. L <sup>-1</sup> ) e MA (5 mL. L <sup>-1</sup> )
Orgânica 3 (O3)	-	EH (10 g. L <sup>-1</sup> ), PP (10 mL. L <sup>-1</sup> ) e MA (10 mL. L <sup>-1</sup> )
Orgânica 4 (O4)	-	EH (10 g. L <sup>-1</sup> ), PP (10 mL. L <sup>-1</sup> ), MA (10 mL. L <sup>-1</sup> ) e SA (10 mL. L <sup>-1</sup> )
Orgânica 5 (O5)	4 minutos em álcool 70% (v/v)	EH (10 g. L <sup>-1</sup> ), PP (5 mL. L <sup>-1</sup> ) e MA (5 mL. L <sup>-1</sup> )
Inorgânica 1 (Q1)	-	NaOCl 10 mL. L <sup>-1</sup>
Inorgânica 2 (Q2)	-	NaOCl 20 mL. L <sup>-1</sup>
Inorgânica 3 (Q3)	4 minutos em álcool 70% (v/v)	NaOCl 20 mL. L <sup>-1</sup>

EH = *E. hyemale*; PP = propólis; MA = *M. alternifolia*; SA = *S. aromaticum*.

As culturas foram mantidas inicialmente em escuro por sete dias e posteriormente em sala de crescimento, sob fotoperíodo.



#### **4.9. Experimento 3 – Desinfestação inorgânica, orgânica, adição de óleos essenciais ao meio e condições de cultivo no isolamento de segmentos nodais *in vitro***

Este experimento teve por objetivo avaliar isoladamente o efeito dos óleos essenciais utilizados nas soluções orgânicas, bem como a ação desses compostos quando adicionados ao meio de cultivo. Além disso, avaliaram-se as condições de cultivo (isolamento dos explantes por sete dias no escuro ou isolamento sob fotoperíodo durante todo experimento) dos explantes após a desinfestação e isolamento dos segmentos nodais *in vitro*. Para tanto, utilizou-se propágulos de um clone apenas.

Os tratamentos consistiram na desinfestação dos propágulos em soluções orgânicas compostas por *E. hyemale* (10 g. L<sup>-1</sup>), propólis (10 mL. L<sup>-1</sup>), óleos essenciais de *M. alternifolia* (10 mL. L<sup>-1</sup>), *S. aromaticum* (10 mL. L<sup>-1</sup>) e *M. arvensis* (10 mL. L<sup>-1</sup>) e isolamento em meio contendo ou não a adição de propólis (10 mL. L<sup>-1</sup>); óleos essenciais de *M. alternifolia* (10 mL. L<sup>-1</sup>); *S. aromaticum* (10 mL. L<sup>-1</sup>) e *M. arvensis* (10 mL. L<sup>-1</sup>). Para avaliação da condição de cultivo (diretamente sob fotoperíodo ou em escuro inicial por sete dias), os propágulos foram submetidos à desinfestação inorgânica em NaOCl a 7,5 mL. L<sup>-1</sup> e isolados em meio de cultivo sem aditivos (Tabela 2).

Na desinfestação realizada em solução inorgânica, os propágulos ficaram imersos por 30 minutos, enquanto nas soluções orgânicas o tempo de imersão foi de 10 minutos. Nos tratamentos em que se realizou a desinfestação inorgânica foram realizados três enxagues sucessivos em água desionizada autoclavada. Nos tratamentos utilizando soluções orgânicas, as brotações não foram submetidas a nenhum enxague, a fim de criar uma película protetora nos explantes.

**Tabela 2** - Desinfestação de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, utilizando soluções inorgânica (à base de NaOCl) e orgânicas (à base de *E. hyemale*, propólis e óleos essenciais de *M. alternifolia*, *S. aromaticum* e *M. arvensis*), isolados em meios de cultivo com ou sem aditivo em sua composição.

Tratamentos	Composição das soluções desinfestantes	Condição de cultivo	Aditivos ao meio de cultivo
Orgânica - própolis (O1)	EE e PP	Escuro inicial	-
Orgânica - melaleuca (O2)	EE e ML	Escuro inicial	-
Orgânica - cravo (O3)	EE e SA	Escuro inicial	-
Orgânica - própolis no meio (O4)	EE e PP	Escuro inicial	PP
Orgânica - melaleuca no meio (O5)	EE e ML	Escuro inicial	ML
Orgânica - cravo no meio (O6)	EE e SA	Escuro inicial	SA
Orgânica - menta (O7)	EE e MV	Escuro inicial	
Orgânica - menta no meio (O8)	EE e MV	Escuro inicial	MV
Inorgânica no escuro (Q1)	NaOCl	Escuro inicial	-
Inorgânica sem escuro (Q2)	NaOCl	fotoperíodo	-

EE = *E. hyemale*; PP = própolis; ML = *M. alternifolia*; SA = *S. aromaticum*; MV = *M. arvensis*.

#### 4.10. Experimento 4 – Efeito de composições da solução orgânica, de concentrações de óleo essencial adicionados ao meio de cultivo e uso de antioxidantes no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais *in vitro*

Objetivou-se neste experimento avaliar diferentes composições da solução desinfestante orgânica; a adição de óleos essenciais ao meio de cultivo, além da eficácia de antioxidantes adicionados ao meio de cultivo.

Utilizaram-se quatro formas de desinfestação dos explantes, caracterizadas por duas soluções orgânicas, uma solução inorgânica e apenas lavagem dos propágulos em água corrente e detergente. As soluções orgânicas foram compostas por óleo essencial de *M. arvensis* (1,25 mL. L<sup>-1</sup>), *S. aromaticum* (1,25 mL. L<sup>-1</sup>) e *C. citratus* (1,25 mL. L<sup>-1</sup>) e a solução inorgânica composta por NaOCl (7,5 mL. L<sup>-1</sup>). Ao meio de cultivo adicionou-se óleo essencial de *M. arvensis* (1,25; 2,5 e 5 mL. L<sup>-1</sup>) combinado ou não com *C. citratus* (5 mL. L<sup>-1</sup>) e os antioxidantes ácido ascórbico (1 mL. L<sup>-1</sup>) ou cisteína (1 mL. L<sup>-1</sup>). Após a desinfestação, os segmentos nodais foram mantidos em solução do antioxidante ácido ascórbico (1 g. L<sup>-1</sup>) ou cisteína (1 g. L<sup>-1</sup>) até o momento do isolamento no meio de cultivo (Tabela 3).

**Tabela 3** - Desinfestação de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, em solução inorgânica (NaOCl) ou orgânica (com óleos essenciais de *M. arvensis*, *S. aromaticum* e *C. citratus*) e isolamento em meios de cultivo contendo concentrações de óleo essencial de *M. arvensis* e *C. citratus* e antioxidante.

Tratamento	Desinfestação	Solução de espera	Aditivo ao meio de cultivo (mL. L <sup>-1</sup> )
<b>Orgânico 1 (O1)</b>	MV + SA	AA	MV (1,25)
<b>Orgânico 2 (O2)</b>	MV + SA	AA	MV (2,5)
<b>Orgânico 3 (O3)</b>	MV + SA	AA	MV (5)
<b>Orgânico 4 (O4)</b>	MV + SA	AA	MV (2,5) + CC (5)
<b>Orgânico 5 (O5)</b>	MV + SA	AA	CC (5) + AA (1)
<b>Orgânico 6 (O6)</b>	MV + SA	AA	CC (5)
<b>Orgânico 7 (O7)</b>	MV + SA + CC	AA	MV (2,5)
<b>Antioxidante 1 (A1)</b>	NaOCl	AA	MV (25) + AA (1)
<b>Antioxidante 2 (A2)</b>	NaOCl	cisteína	MV (2,5) + cisteína (1)
<b>Água e detergente (A)</b>	Lavagem em água corrente e detergente	AA	MV (5) + AA (1)

MV = *M. arvensis*; SA = *S. aromaticum*; AA = ácido ascórbico; CC = *C. citratus*.

Após a desinfestação e isolamento dos segmentos nodais em meio de cultivo, as culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, diretamente sob fotoperíodo.

#### 4.11. Experimento 5 - Padronização de explantes e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais *in vitro*

O objetivo deste experimento foi avaliar a padronização de explantes oriundos de diferentes posições de brotações, de distintos tamanhos, oriundas de um clone. Avaliou-se ainda a influência do tempo transcorrido entre a coleta e o isolamento dos segmentos nodais e o ambiente de cultivo.

Para avaliar a influência do tempo entre a coleta e o isolamento dos explantes, minicepas estabelecidas em minijardim clonal da empresa Baldo (localizada em São Mateus do Sul, a 50 km de Irati) foram transferidas para vasos de 3 L, contendo areia lavada de granulometria média, e acondicionadas em casa de vegetação localizada no Viveiro de Pesquisas Florestais da Unicentro, *Campus* de Irati. A partir das minicepas estabelecidas em vasos coletaram-se brotações sem padronização e confeccionaram-se explantes sem padronização (Tabela 4).

Das minicepas do minijardim clonal da empresa Baldo coletaram-se brotações sem tamanho definido; brotações de até 15 cm e maiores que 15 cm. Das brotações sem

padronização, confeccionaram-se explantes oriundos de qualquer região (basal, intermediária ou apical). Estes explantes foram acondicionados em sala de crescimento ou em incubadora tipo DBO a  $25 \pm 1$  °C. As brotações de até 15 cm e as maiores de 15 cm, foram utilizadas na confecção de explantes padronizados da região basal, intermediária e apical (Tabela 4).

Na capela de fluxo laminar, as brotações foram desinfestadas em NaOCl a 7,5mL. L<sup>-1</sup>, por 30 minutos. Em seguida realizaram-se três enxagues em água desionizada e autoclavada. Os explantes permaneceram imersos em água desionizada autoclavada até o momento do isolamento nos tubos de ensaio.

**Tabela 4** - Padronização de segmentos nodais excisados de diferentes posições de brotações de diferentes tamanhos de clone de *I. paraguariensis*, coletados de minicepas estabelecidas em minijardim clonal localizado em São Mateus do Sul ou de minicepas cultivadas em vasos localizados em Irati, acondicionados em sala de crescimento ou incubadora tipo DBO.

<b>Tratamento</b>	<b>Localização da minicepa</b>	<b>Tamanho do broto</b>	<b>Posição do explante</b>	<b>Ambiente de cultivo</b>
<b>SSC</b>	São Mateus do Sul	Não padronizado	Não padronizado	Sala de crescimento
<b>SDBO</b>	São Mateus do Sul	Não padronizado	Não padronizado	Incubadora tipo DBO
<b>&lt;15B</b>	São Mateus do Sul	Menor que 15 cm	Basal	Sala de crescimento
<b>&lt;15M</b>	São Mateus do Sul	Menor que 15 cm	Intermediário	Sala de crescimento
<b>&lt;15A</b>	São Mateus do Sul	Menor que 15 cm	Apical	Sala de crescimento
<b>&gt;15B</b>	São Mateus do Sul	Maior que 15 cm	Basal	Sala de crescimento
<b>&gt;15M</b>	São Mateus do Sul	Maior que 15 cm	Intermediário	Sala de crescimento
<b>&gt;15A</b>	São Mateus do Sul	Maior que 15 cm	Apical	Sala de crescimento
<b>SUNI</b>	Irati	Não padronizado	Não padronizado	Sala de crescimento

#### **4.12. Experimento 6 – Concentrações de BAP, antioxidante e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais *in vitro***

Este experimento teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de explantes de dois clones de *I. paraguariensis* (clone 1 e clone 2) sob o efeito de diferentes concentrações de

BAP (1 e 2 mg. L<sup>-1</sup>) com ou sem adição de ácido ascórbico ao meio de cultivo, mantidos em sala de crescimento ou incubadora tipo DBO.

Os tratamentos constituíram-se em propágulos de dois clones submetidos à desinfestação inorgânica (NaOCl a 7,5 mL. L<sup>-1</sup> por 30 minutos) isolados em meio com diferentes concentrações de BAP (1 ou 2 mg. L<sup>-1</sup>). Os explantes isolados em meio contendo 2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, contendo ou não adição de ácido ascórbico (1 mg. L<sup>-1</sup>), foram mantidos em incubadora tipo DBO (22 ± 1 °C) ou em sala de crescimento, sob fotoperíodo (Tabela 5).

**Tabela 5** - Concentrações de BAP, antioxidante e condições de cultivo no isolamento e indução *in vitro* de clones de *I. paraguariensis*.

Tratamento	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )	Antioxidante	Ambiente de cultivo
C1 B1	1	-	Sala de crescimento
C1 B2	2	-	Sala de crescimento
C1 B2 D	2	-	Incubadora DBO
C1 B2 A	2	Ácido ascórbico	Sala de crescimento
C2 B1	1	-	Sala de crescimento
C2 B2	2	-	Sala de crescimento
C2 B2 D	2	-	Incubadora DBO
C2 B2 A	2	Ácido ascórbico	Sala de crescimento

C1 = clone 1; C2 = clone 2; B = BAP; D = incubadora DBO; A = antioxidante.

#### 4.13. Experimento 7 – Tipo de explante e aditivos ao meio de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares *in vitro*

Neste experimento objetivou-se avaliar o tipo de explante, oriundos de dois clones, isolados em meio de cultivo contendo os aditivos carvão ativado ou extrato pirolenhoso.

Os tratamentos consistiram em explantes de segmento nodal ou gema axilar isolada, desinfestadas em solução de NaOCl a 7,5 mL. L<sup>-1</sup> por 30 minutos e submetidos a três enxágues consecutivos em água desionizada e autoclavada. Os explantes de segmentos nodais foram isolados em meio contendo ou não carvão ativado (0 e 1 g. L<sup>-1</sup>) ou extrato pirolenhoso (0 e 1 mL. L<sup>-1</sup>), enquanto os explantes constituídos de gemas axilares excisadas (de tamanho aproximado entre 0,3 e 0,5 cm de comprimento) foram isolados em meio MS sem aditivo (Tabela 6).

**Tabela 6** - Tipos de explantes (segmento nodal e gema axilar isolada) e aditivos (carvão ativado e extrato pirolenhoso) incorporados ao meio de cultivo para o isolamento e indução *in vitro* de clones de *I. paraguariensis*.

<b>Clone</b>	<b>Tipo de explante</b>	<b>Aditivo incorporado ao meio de cultivo</b>
C1	segmento nodal	-
C2	segmento nodal	-
C1	segmento nodal	carvão ativado
C2	segmento nodal	carvão ativado
C1	segmento nodal	extrato pirolenhoso
C2	segmento nodal	extrato pirolenhoso
C1	gema axilar isolada	-
C2	gema axilar isolada	-

C1 = clone 1; C2 = clone 2; (-) sem aditivos incorporados ao meio básico MS.

Após a desinfestação e isolamentos dos explantes, as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Experimento 1 – Desinfestação inorgânica e orgânica no isolamento de segmentos nodais *in vitro*, em diferentes tempos de imersão

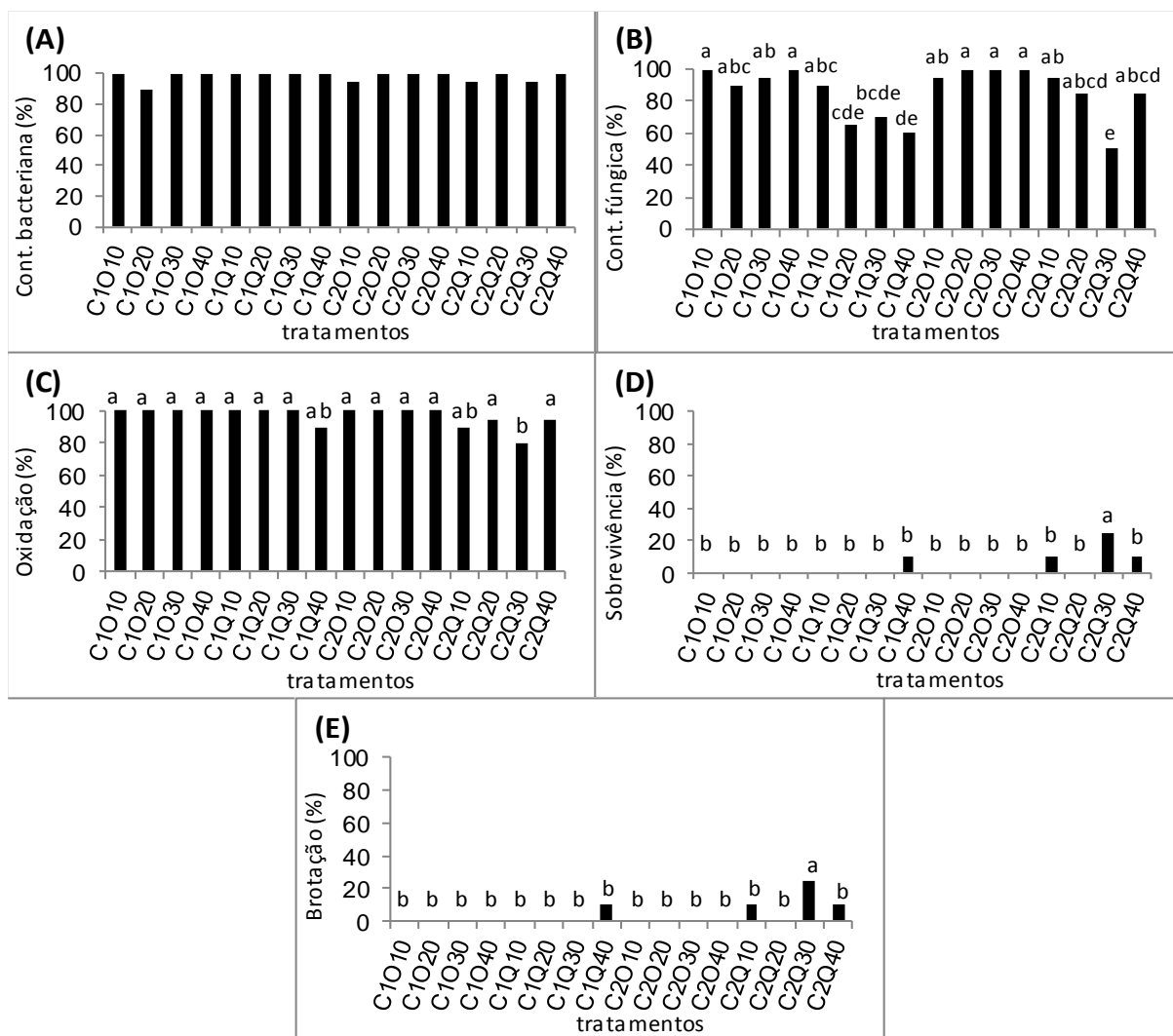
Os tratamentos em que explantes de diferentes genótipos foram imersos por diferentes tempos em soluções desinfestantes inorgânica e orgânica, apresentaram diferença significativa para as variáveis sobrevivência, contaminação fúngica, oxidação e emissão de brotações (Tabela 7).

**Tabela 7** - Análise de Kruskal-Wallis (KW) em segmentos nodais de diferentes clones de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes tempos de imersão das brotações, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*.

Variável	X	p-valor
Contaminação bacteriana	12,475	$6,43 \cdot 10^{-1}$ ns
Contaminação fúngica	43,057	$1,54 \cdot 10^{-4}$ **
Oxidação	26,300	$3,50 \cdot 10^{-2}$ *
Sobrevivência	30,802	$9,34 \cdot 10^{-3}$ **
Emissão de brotações	30,802	$9,34 \cdot 10^{-3}$ **

ns = valor não significativo a 5% de probabilidade de erro; \* = valor significativo a 5% de probabilidade de erro; \*\* = valor significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis. Grau de liberdade para todas as variáveis avaliadas = 15.

No tratamento em que explantes do clone C2 foram imersos em solução de NaOCl por 30 minutos, o índice de contaminação fúngica foi menor que nos demais tratamentos (50%, Figura 2 B), sendo também o tratamento que resultou em maior porcentagem de sobrevivência e de indução de brotação (ambos com 25%, Figuras 2 D e 2 E). A oxidação foi menor nos tratamentos C1Q40, C2Q10 e C2Q30 (Figura 2 C), sendo superior aos demais tratamentos. Entende-se, portanto, que distintos genótipos tendem a responder diferentemente quanto aos tratamentos de desinfestação realizados, tal como o constatado na pesquisa de Ross et al. (2017), que observaram diferentes respostas para oxidação e contaminação de diferentes genótipos de *I. paraguariensis*.



**Figura 2** - Efeito das soluções inorgânica e orgânica em diferentes tempos de imersão das brotações (em minutos) para os clones avaliados, na desinfestação de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*. **(A)** Contaminação bacteriana, **(B)** Contaminação fúngica, **(C)** Oxidação, **(D)** Sobrevivência, **(E)** Emissão de brotações. C1 = clone 1; C2 = clone 2; O = solução orgânica, Q = solução inorgânica; 10, 20, 30 e 40 = tempos de imersão, em minutos. Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Contaminação bacteriana não apresentou diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

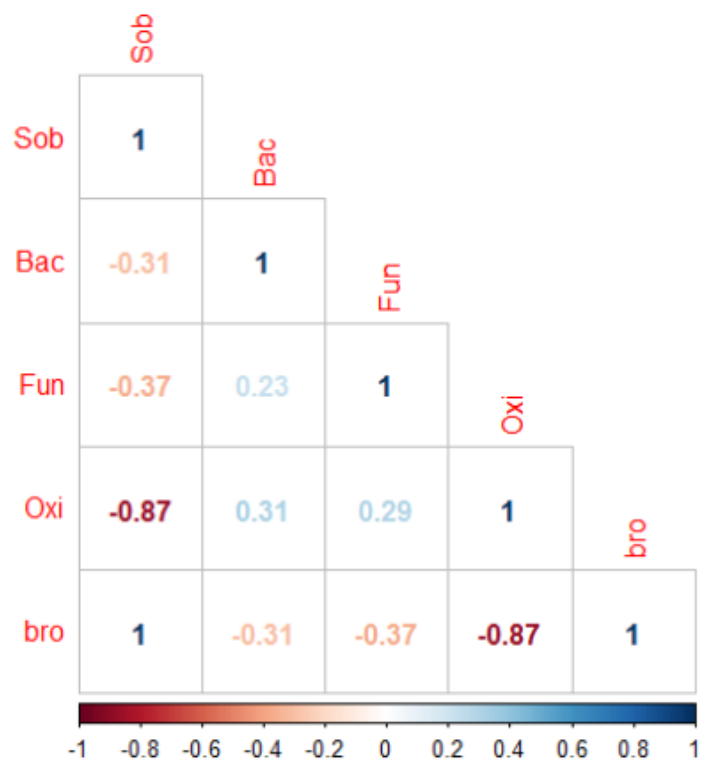
Zaniolo; Zanette (2001) obtiveram melhor eficácia na desinfestação de propágulos de *I. paraguariensis*, em solução de 7,5 mL. L<sup>-1</sup> de NaOCl, por 10 minutos. Horbach (2008) encontrou maior controle de contaminação bacteriana pela imersão dos explantes em solução de NaOCl a 20 mL. L<sup>-1</sup> por 35 minutos, e para contaminação fúngica, por 15 e 25 minutos. Evidencia-se assim a variação da eficácia dos protocolos de desinfestação para *I. paraguariensis*, o que pode estar relacionado à época de coleta dos propágulos durante o ano, genótipo, localização, idade e condições fitossanitárias da planta fornecedora dos propágulos utilizados (ROSA et al., 2006; OLMOS et al., 2010).



A baixa eficiência da desinfestação com a solução orgânica pode ser em razão de uma concentração menor que o necessário para eliminar os propágulos bacterianos e fúngicos ou em razão do tempo de permanência insuficiente para a ação da solução utilizada, uma vez que a eficácia de cavalinha, própolis e melaleuca no controle do crescimento de bactérias e fungos já foi confirmada por vários autores (BIANCHINI; BEDENDO, 1998; SANTOS PEREIRA et al., 2002; VARGAS et al., 2004; CARSON et al., 2006; MONDELLO et al., 2009; MARTINS et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

No presente estudo, os fungos encontrados nos cultivos *in vitro* foram isolados e identificaram-se os gêneros: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Choanephora* e *Rhizoctonia*. Apesar de todos os gêneros identificados contemplarem espécies de fungos que são fitopatogênicos, neste estudo não foi confirmada a patogenicidade de nenhum deles. Quanto às bactérias isoladas, as mesmas também não demonstraram fitopatogenicidade. Hörner et al. (2001) identificaram os gêneros de fungos *Alternaria* e *Colletotrichum* isolados de cultivos *in vitro* de *I. paraguariensis* e Pimentel et al. (2006) relataram a ocorrência dos gêneros de fungos *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium*, isolados à partir de folhas de *I. paraguariensis*. Hörner et al. (2001) e Pimentel et al. (2006) não avaliaram o caráter fitopatogênico dos fungos isolados.

A Correlação de Spearman para as variáveis avaliadas neste experimento, demonstrou uma forte correlação negativa (significativas a  $p < 0,05$ ) entre a oxidação e a sobrevivência dos explantes e a brotação (ambas com -0,87), apontando, portanto, que neste experimento a oxidação dos explantes foi o maior entrave na micropropagação dos clones avaliados (Figura 3).



**Figura 3** - Correlação de Spearman para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) na desinfestação inorgânica e orgânica, em diferentes tempos de imersão, de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, após 30 dias de isolamento *in vitro*. Cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação. Todas as correlações foram significativas a  $p < 0,05$ .

A capacidade de regeneração de segmentos nodais de *I. paraguariensis* é relatada por Zaniolo; Zanette (2001), Dolce; Rey (2006), Horbach (2008) e Ross et al., (2017), que obtiveram em seus experimentos percentual de indução de gemas axilares nos explantes sobreviventes acima de 75%. No presente estudo, observaram-se respostas semelhantes, confirmada pela alta correlação positiva (1) entre os explantes sobreviventes e a emissão de brotações (indução de gemas axilares) (Figura 3).

A forte correlação negativa entre a oxidação e a sobrevivência dos explantes encontrada no presente estudo, reforça a necessidade de estabelecimento de protocolos que possam inibir as rotas de oxidação em clones adultos *I. paraguariensis*, viabilizando a micropropagação dos genótipos avaliados.

## 5.2. Experimento 2 – Desinfestação inorgânica, em diferentes concentrações, e orgânica, em diferentes concentrações e composições, no isolamento de gemas axilares em segmentos nodais *in vitro*

Observou-se efeito significativo para a contaminação bacteriana e a contaminação fúngica, enquanto para as demais variáveis avaliadas, não houve efeito significativo dos tratamentos (Tabela 8).

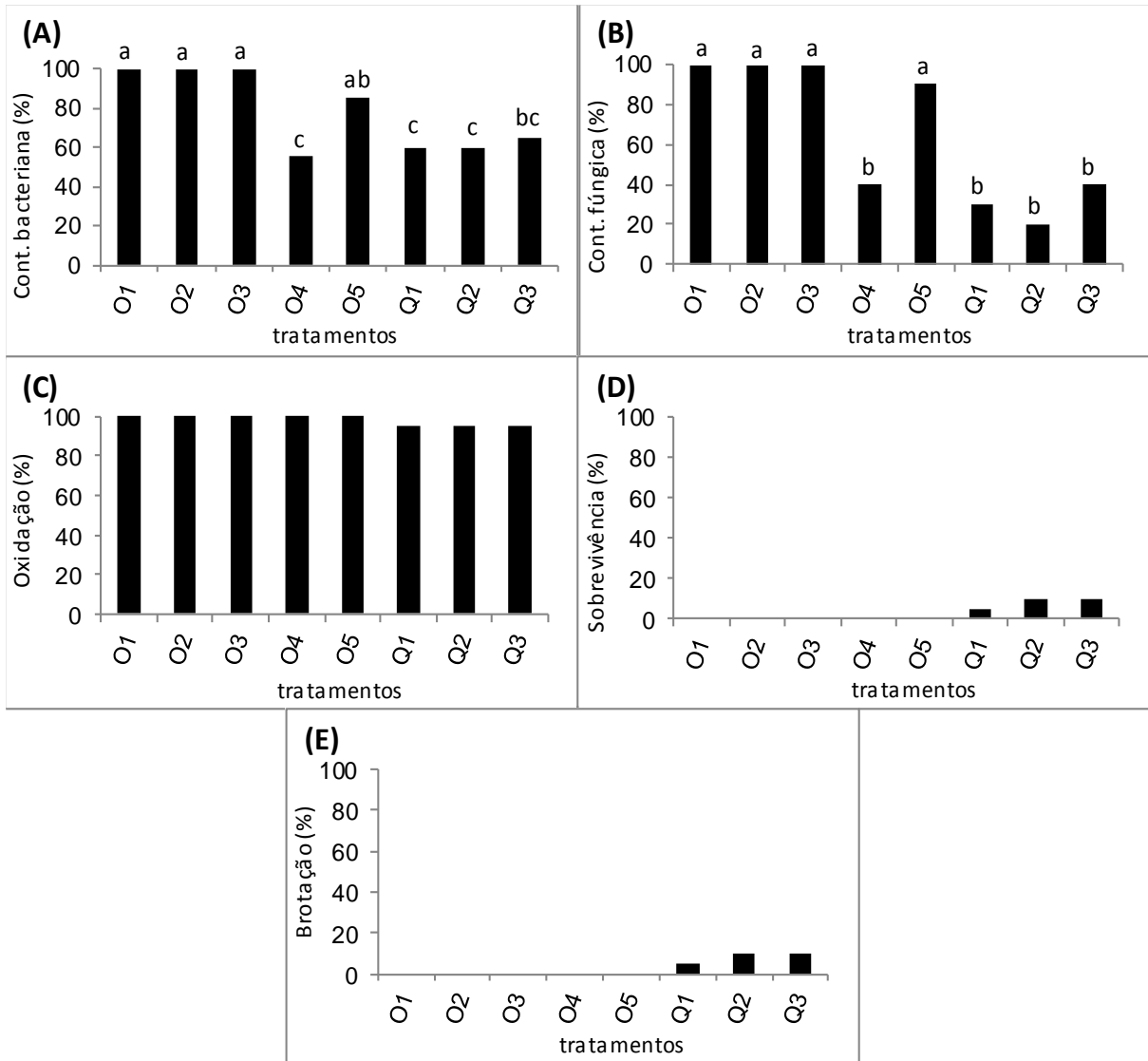
**Tabela 8** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes concentrações e composições, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*.

Variáveis	X	p-valor
Contaminação bacteriana	27,44	$2,78 \cdot 10^{-4}$ **
Contaminação fúngica	30,23	$8,62 \cdot 10^{-5}$ **
Oxidação	5,27	$6,27 \cdot 10^{-1}$ ns
Sobrevivência	8,45	$2,95 \cdot 10^{-1}$ ns
Emissão de brotações	8,45	$2,95 \cdot 10^{-1}$ ns

ns = valor não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis; \*\* = valor significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis. Grau de liberdade para todas as variáveis avaliadas = 8.

A contaminação bacteriana foi menor no tratamento orgânico com óleo essencial de cravo (O4, 55%), estatisticamente semelhante aos tratamentos com solução inorgânica de NaOCl a 10 e 20 mL. L<sup>-1</sup> (Q1 e Q2, respectivamente), com 60% e 65% dos explantes contaminados por bactéria. Para a contaminação dos explantes por fungos, observa-se que os tratamentos com solução de NaOCl apresentaram menores valores de contaminação, comparados aos tratamentos orgânicos, porém não diferiram estatisticamente entre si e nem do tratamento orgânico com óleo essencial de cravo (Figura 4 A).

A elevada contaminação no cultivo *in vitro* de *I. paraguariensis* foi relatada também por Hörner et al. (2001), Rosa et al. (2006), Horbach (2008), Dutra; Silva (2009) e Ross et al. (2017), o que pode estar relacionado à presença de fungos endofíticos nos propágulos que deram origem aos explantes (ROSA et al., 2006; PIMENTEL et al., 2006; HORBACH, 2008; ROSS et al., 2017). Pimentel et al. (2006) relataram a ocorrência de 10 gêneros de fungos isolados de folhas de *I. paraguariensis*. Na presente pesquisa foram identificados quatro gêneros de fungos (ver Experimento 1).



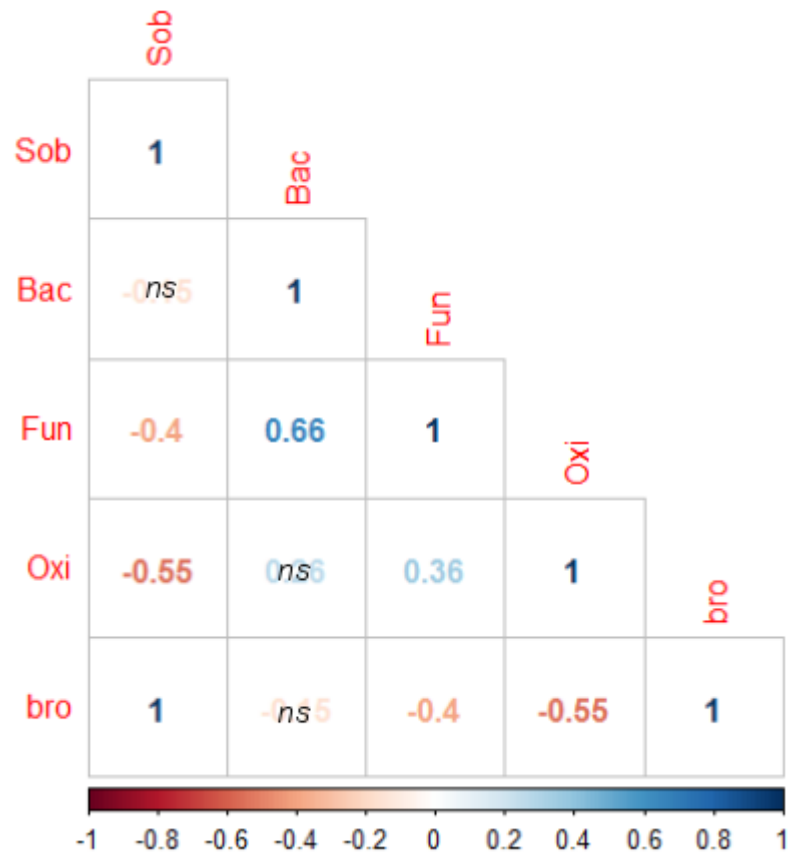
**Figura 4 -** Efeito das diferentes composições e concentrações das soluções inorgânica e orgânica na desinfestação de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis* avaliados aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. **(A)** Contaminação bacteriana, **(B)** Contaminação fúngica, **(C)** Oxidação, **(D)** Sobrevivência, **(E)** Emissão de brotações. O1 = solução orgânica 1 (*E. hyemale* 10 g. L<sup>-1</sup>; própolis 5 mL. L<sup>-1</sup> e *M. alternifolia* 5 mL. L<sup>-1</sup>, armazenado em vidro âmbar há 30 dias em geladeira); O2 = solução orgânica 2 (*E. hyemale* 10 g. L<sup>-1</sup>; própolis 5 mL. L<sup>-1</sup> e *M. alternifolia* 5 mL. L<sup>-1</sup>); O3 = solução orgânica 3 (*E. hyemale* 10 g. L<sup>-1</sup>; própolis 10 mL. L<sup>-1</sup> e *M. alternifolia* 10 mL. L<sup>-1</sup>); O4 = solução orgânica 4 (*E. hyemale* 10 g. L<sup>-1</sup>; própolis 10 mL. L<sup>-1</sup>; *M. alternifolia* 10 mL. L<sup>-1</sup> e *S. aromaticum* 10 mL. L<sup>-1</sup>); O5 = solução orgânica 5 (álcool 70% + *E. hyemale* 10 g. L<sup>-1</sup>; própolis 5 mL. L<sup>-1</sup> e *M. alternifolia* 5 mL. L<sup>-1</sup>); Q1 = solução inorgânica 1 (NaOCl 10 mL. L<sup>-1</sup>); Q2 = solução inorgânica 2 (NaOCl 20 mL. L<sup>-1</sup>); Q3 = solução inorgânica 3 (álcool 70% + NaOCl 20 mL. L<sup>-1</sup>). Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Oxidação, sobrevivência e emissão de brotações não apresentaram diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

Observou-se que tanto a contaminação bacteriana quanto a contaminação fúngica iniciaram a partir da base do explante, manifestando-se primeiro, na maioria dos casos, no meio de cultivo e posteriormente no explante. Quando a contaminação aparecia primeiro no explante e depois no meio, essa ocorria no tecido já necrosado pela oxidação. Não foi observado início de contaminação do explante no tecido ainda vivo. Essas constatações sugerem que as contaminações ocorreram em razão de microrganismos endofíticos e não pela inadequação do procedimento de esterilização superficial dos explantes (ALLOUFA, 2001).

De forma semelhante ao observado no presente estudo, Ross et al. (2017) obtiveram alta oxidação dos explantes (75%) no cultivo *in vitro* de material selecionado de *I. paraguariensis*, qual foi maior que a oxidação de material não selecionado (5%). A alta oxidação encontrada neste experimento (95 a 100%) reforça a recalcitrância dos clones estudados para a propagação *in vitro*.

A oxidação é um fenômeno frequente, principalmente em espécies lenhosas, causada por compostos fenólicos e radicais livres, ocasionando desde o escurecimento do tecido à morte (AZOFEIFA, 2009). *I. paraguariensis* é uma espécie rica em fenóis (DONADUZZI et al., 2003), fator que conduz à oxidação acentuada desta espécie, problemática também observada por Rey et al. (1991), Hörner et al. (2001), Dutra et al. (2008) e Santos; Wendling (2010).

O coeficiente de Correlação de Spearman apontou correlação negativa (-0,55 significativa a  $p < 0,05$ ) entre a sobrevivência e a oxidação (Figura 5), o que evidencia a problemática da oxidação para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de genótipos selecionados de *I. paraguariensis* avaliados neste estudo. Resultados semelhantes foram observados por Hörner et al. (2001), Dutra et al. (2008), e Santos; Wendling (2010).



**Figura 5** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) na desinfestação inorgânica e orgânica, em diferentes concentrações e composições, de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, após 30 dias de isolamento *in vitro*. ns = não significativo, demais correlações significativas a  $p < 0,05$ .

### 5.3. Experimento 3 – Desinfestação inorgânica, orgânica, adição de óleos essenciais ao meio e condições de cultivo no isolamento de segmentos nodais *in vitro*

Os tratamentos aplicados foram significativos para todas as variáveis avaliadas (Tabela 9).

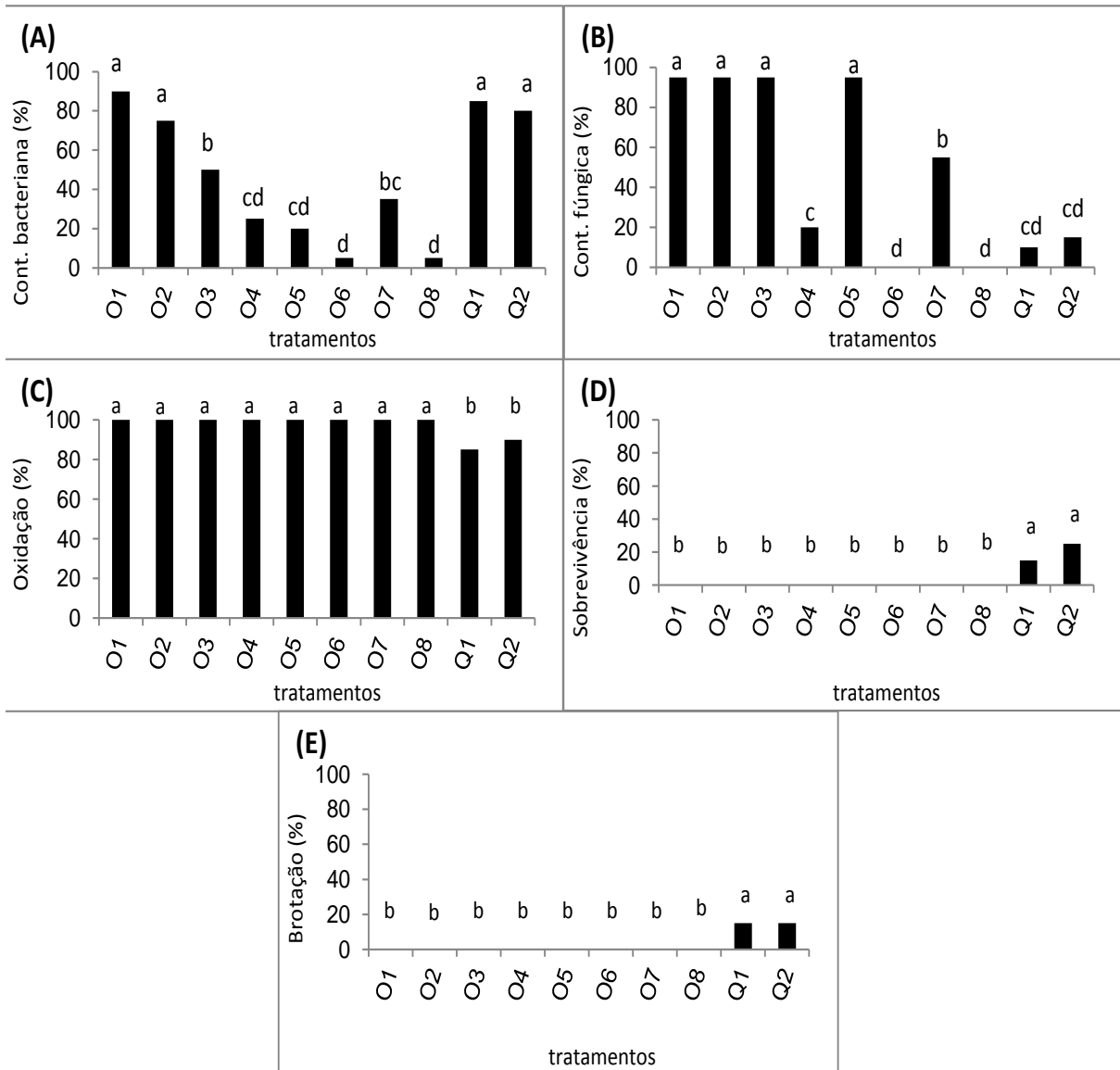
**Tabela 9** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes concentrações e composições, com ou sem óleo essencial no meio de cultivo, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*.

Variáveis	X	p-valor
Contaminação bacteriana	39,00	$1,20 \cdot 10^{-5}$ **
Contaminação fúngica	42,79	$2,00 \cdot 10^{-6}$ **
Oxidação	22,87	$6,50 \cdot 10^{-3}$ **
Sobrevivência	26,68	$1,58 \cdot 10^{-3}$ **
Emissão de brotações	22,58	$7,21 \cdot 10^{-3}$ **

\*\* = valor significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis. Grau de liberdade para todas as variáveis avaliadas = 9.

Para a contaminação bacteriana (Figura 6 A) e contaminação fúngica (Figura 6 B), os tratamentos que apresentaram menor porcentagem de explantes contaminados e estatisticamente superiores aos demais, foram os correspondentes à desinfestação e meio com óleo essencial de *S. aromaticum* (O6) e desinfestação e meio com óleo essencial de *M. arvensis* (O8), porém estes tratamentos resultaram em total mortalidade dos explantes (Figura 6D).

A eficiência do óleo essencial de *S. aromaticum* (cravo) e de *M. arvensis* (hortelã-japonesa) para controle de contaminação fúngica e bacteriana ficou evidente neste estudo, sendo que os explantes tratados com essas soluções não apresentaram contaminação fúngica e quanto à contaminação por bactérias os valores foram inferiores aos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram relatados em ensaios em que se avaliou a eficácia destes óleos essenciais no controle de diversos micro-organismos fitopatogênicos (GADELHA et al., 2003; GUYNOT et al., 2003; DINIZ et al., 2008; CHAUSSÉ et al., 2011; MARTINEZ DOS SANTOS et al., 2011; OLIVEIRA FILHO et al., 2015), contudo os resultados obtidos no presente estudo referem-se ao primeiro registro, na literatura, da utilização desses óleos essenciais na propagação *in vitro* de clones adultos de *I. paraguariensis*.



**Figura 6** - Efeito de soluções inorgânica e orgânicas na desinfestação de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis* isolados em meio com e sem adição de óleo essencial, mantidos ou não em câmara escura na primeira semana após o isolamento, avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. **(A)** Contaminação bacteriana, **(B)** Contaminação fúngica, **(C)** Oxidação, **(D)** Sobrevivência, **(E)** Emissão de brotações. O1 = orgânico própolis (desinfestação com própolis, escuro inicial); O2 = orgânico melaleuca (desinfestação com *M. alternifolia*, escuro inicial); O3 = orgânico cravo (desinfestação com *S. aromaticum*, escuro inicial); O4 = orgânico própolis no meio (desinfestação e meio com própolis, escuro inicial); O5 = orgânico melaleuca no meio (desinfestação e meio com *M. alternifolia*, escuro inicial); O6 = orgânico cravo no meio (desinfestação e meio com *S. aromaticum*); O7 = orgânico menta (desinfestação com *M. arvensis*, escuro inicial); O8 = orgânico menta no meio (desinfestação e meio com *M. arvensis*, escuro inicial); Q1 = químico no escuro (NaOCl, escuro inicial); Q2 = químico sem escuro (NaOCl, fotoperíodo). Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.



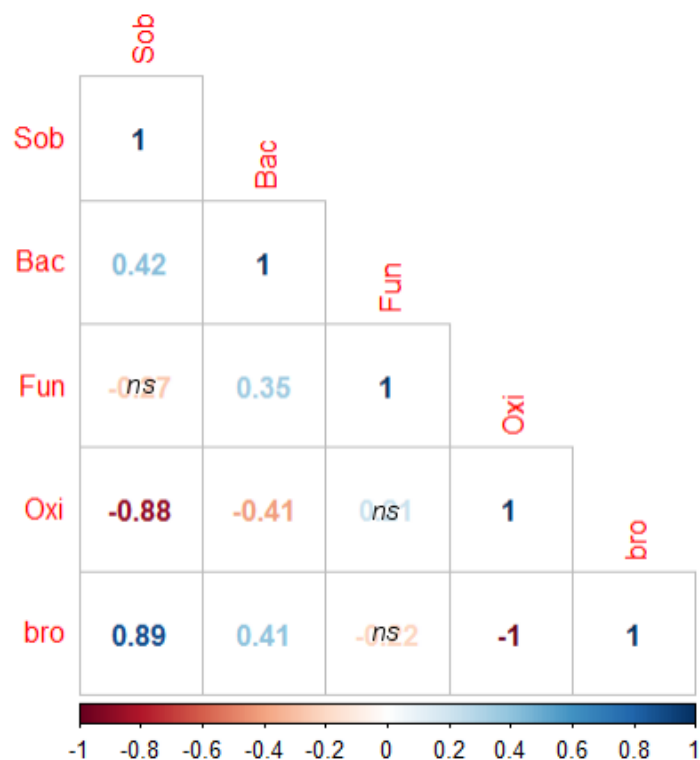
Em relação à sobrevivência dos explantes, a desinfestação em solução de NaOCl foi estatisticamente superior aos demais tratamentos e não diferiram estatisticamente entre si (Figura 6D). Apenas nos tratamentos com NaOCl (Q1 e Q2) observaram-se brotações, sendo estatisticamente iguais (15%) (Figura 6 E).

A total mortalidade dos explantes desinfestados em soluções orgânicas (Figura 6 D) pode ter ocorrido em razão da fitotoxicidade apresentada por alguns óleos essenciais para determinadas plantas ou da elevada concentração de óleo essencial no meio de cultivo. Não há estudos específicos para a área de micropropagação quanto à fitotoxicidade dos óleos essenciais aos explantes, contudo, Mazzafera et al. (2003) constataram efeito alelopático para solução de *S. aromaticum* ao tratar sementes de *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Impatiens walleriana* Hook. (beijo), *Crotalaria* sp (crotalaria), *Lactuca sativa* L. (alface) e *Triticum* sp (trigo), em que a germinação das sementes foi afetada em diferentes níveis. *M. arvensis* não possui nenhum efeito fitotóxico ou alelopático comprovado, porém, Ferreira et al. (2013) ao aplicarem extrato aquoso de *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) em sementes de tomate, observaram que houve uma influência negativa para o desenvolvimento inicial das plantas. Por outro lado, Sobreira et al. (2012) observaram que o extrato aquoso de *Plectranthus amboinicus* Lour. (hortelã) promoveu maior crescimento para plântulas de *Capsicum annuum* L. (pimentão).

Neste estudo a incubação inicial dos explantes em câmara escura não foi eficiente para reduzir a oxidação dos segmentos nodais, ao contrário do relatado por Melo et al. (2001) (*Syagrus oleracea* - guabirobeira-) e Lopes da Silva et al. (2015) (*Eucalyptus saligna* - eucalipto-). A ineficiência da manutenção inicial dos explantes no escuro para redução da oxidação também foi constatada por Marks; Simpson (1990) (*Hamamelis mollis* - hamamelis -, *Garrya elliptica*, *Acer platanoides*) e por Scherer Bassan et al. (2006) (*Peltophorum dubium* - canafístula-). Não foram encontrados estudos específicos sobre o efeito do escuro inicial no isolamento *in vitro* de *I. paraguariensis*.

Embora o acondicionamento inicial das culturas em ambiente escuro seja recomendada por Grattapaglia; Machado (1998) e apontada por Azoifeifa (2009) como uma forma de minimizar os efeitos da oxidação fenólica e consequente morte dos explantes, esta medida de prevenção pode não ser eficaz para algumas espécies (AZOFEIFA, 2009).

A influência da oxidação na redução da sobrevivência dos explantes e consequente emissão de gemas axilares nos segmentos nodais foi confirmada pelo coeficiente de correlação de Spearman (Figura 7), cujas correlações foram negativas (0,88 para oxidação e 1 para indução de brotações, significativas a  $p < 0,05$ ).



**Figura 7 -** Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) na desinfestação inorgânica e orgânica de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, cultivados em meio com e sem óleo essencial, após 30 dias de isolamento *in vitro*. ns = não significativo, demais correlações significativas a  $p < 0,05$ .

A alta correlação positiva entre a sobrevivência dos explantes e as brotações (0,89) (Figura 7), indica o potencial de emissão de gemas axilares nos segmentos nodais vivos, evidenciando a capacidade de regeneração *in vitro* de *I. paraguariensis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Zaniolo; Zanette (2001), Dolce; Rey (2006); Horbach (2008) e Ross et al., (2017), que observaram alto percentual de emissão de gemas axilares nos explantes sobreviventes, que não oxidaram.

#### 5.4. Experimento 4 – Efeito de concentrações de óleos essenciais na solução desinfestante e na composição do meio de cultivo e uso de antioxidantes no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais *in vitro*

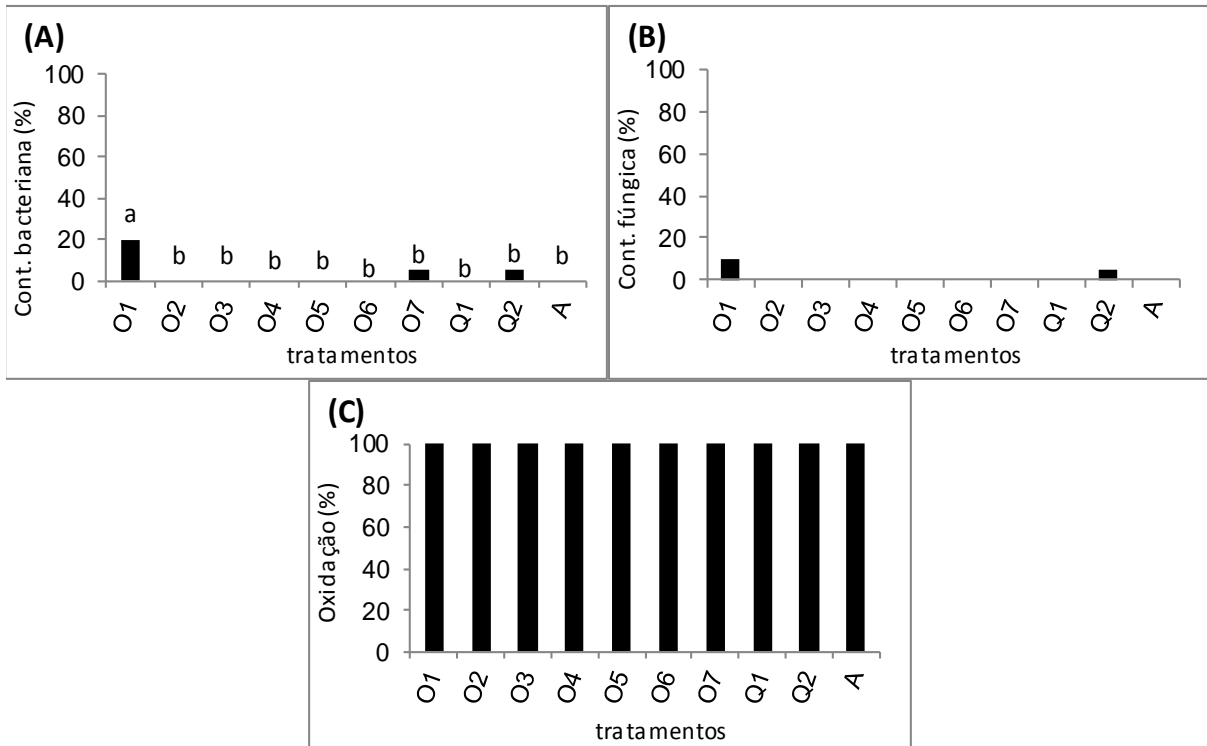
Houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados para contaminação bacteriana. Observou-se oxidação seguida da necrose e morte dos explantes em sua totalidade, não sendo possível avaliar a emissão de gemas axilares nos segmentos nodais neste experimento (Tabela 10).

**Tabela 10** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, submetidos à desinfestação inorgânica e orgânica em diferentes concentrações e composições, com ou sem adição de óleo essencial ou antioxidante ao meio de cultivo, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*.

Variáveis	X	p-valor
Contaminação bacteriana	18,831	$2,67 \cdot 10^{-2}$ *
Contaminação fúngica	14,248	$1,14 \cdot 10^{-1}$ <i>ns</i>
Oxidação <sup>1</sup>	-	-
Sobrevivência <sup>2</sup>	-	-
Emissão de brotações	-	-

<sup>1</sup> = todos os explantes oxidaram. <sup>2</sup> = considerando a oxidação e mortalidade dos explantes, não foi possível avaliar a sobrevivência dos explantes. \*\* = valor significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis. Grau de liberdade para todas as variáveis avaliadas = 9.

No tratamento em que os explantes foram submetidos à desinfestação em solução orgânica de *M. arvensis* e *S. aromaticum* e isolados em meio de cultivo com a adição de 1,25 ml. L<sup>-1</sup> de *M. arvensis* (O1), apresentou maior contaminação bacteriana, sendo estatisticamente inferior aos demais tratamentos avaliados. Isso indica que a menor concentração de óleo de *M. arvensis* no meio de cultivo foi menos eficiente no controle fitossanitário dos segmentos nodais. As concentrações de 2,5 mL. L<sup>-1</sup> (O2) e de 5 mL. L<sup>-1</sup> de *M. arvensis* (O3) no meio de cultivo não apresentaram diferença entre si, sendo ambas eficazes para obtenção de culturas *in vitro* isentas de contaminação bacteriana e fúngica (Figura 8 A).



**Figura 8 -** Efeito das diferentes composições e concentrações de óleo essencial e de antioxidante adicionados ao meio de cultivo de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis* submetidos à desinfestação em soluções inorgânica e orgânica, avaliados aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. **(A)** Contaminação bacteriana, **(B)** Contaminação fúngica, **(C)** Oxidação. Não houve sobrevivência e emissão de brotações. O1 = orgânico 1 (desinfestação *M. arvensis* + *S. aromaticum* – MASA –, meio com 1,25 mL. L<sup>-1</sup> de *M. arvensis* – MA –); O2 = orgânico 2 (desinfestação MASA, meio com 2,5 mL. L<sup>-1</sup> de MA); O3 = orgânico 3 (desinfestação MASA, meio com 5 mL. L<sup>-1</sup> de MA); O4 = orgânico 4 (desinfestação MASA, meio com 2,5 mL. L<sup>-1</sup> de MA e 5 mL. L<sup>-1</sup> de *C. citratus* – CC –); O5 = orgânico 5 (desinfestação MASA, meio com CC + 1 mL. L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico – AA –); O6 = orgânico 6 (desinfestação MASA, meio com CC); O7 = orgânico 7 (desinfestação MASA + CC, meio com MA); Q1 = químico 1 (desinfestação NaOCl, meio com MA + AA); Q2 = químico 2 (desinfestação NaOCl, meio com MA + cisteína); A = adicional (lavagem em água e detergente, meio com MA e AA). Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Contaminação fúngica e oxidação não apresentaram diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

No tratamento adicional (A), em que a assepsia do explante foi feita somente com a lavagem em água corrente e detergente e isolados em meio contendo 5 mL. L<sup>-1</sup> de *M. arvensis*, pode-se confirmar a eficácia do óleo essencial de *M. arvensis* para o controle de fungos e bactérias, uma vez que não apresentou nenhum tipo de contaminação (Figura 8 A e 8 B). A eficácia de *M. arvensis* também foi constatada por Diniz et al. (2008) para inibição do crescimento dos fungos isolados de *Sclerotinia* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium rubrum*, *Fusarium moniliforme* e *Corynespora cassicola*; e Chaussê et al. (2011) para a doença da vassoura-da-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) em *Theobroma cacao* L. (cacaueiro).

Quanto aos antioxidantes avaliados, a cisteína e o ácido ascórbico não foram eficientes para inibir a oxidação (Figura 8 C), tal como em experimento realizado com a adição de cisteína no meio de cultivo de explantes de *I. paraguariensis* por Santos; Wendling (2010). Resultados semelhantes foram obtidos também para outras espécies arbóreas: *Mezilaurus navalium* (tapinhoã) (CASTRO et al., 2007), utilizando cisteína e ácido ascórbico; *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) (ARCOBELI COLA et al., 2010), utilizando ácido ascórbico; e *Calophyllum brasiliense* (guanandi) (SILVEIRA et al., 2016), com o uso de cisteína.

A oxidação total dos explantes neste experimento pode estar ligada à adição dos óleos essenciais no meio de cultivo, em razão da fitotoxicidade apresentada por alguns óleos essenciais para determinadas plantas (MAZZAFERA et al., 2003; FERREIRA et al., 2013).

No presente estudo, a oxidação dos explantes quando do uso de óleos essenciais evidencia a necessidade de pesquisas mais específicas para avaliar se componentes dos óleos essenciais utilizados contribuem para a oxidação, uma vez que se demonstraram eficientes no controle de contaminação bacteriana e fúngica.

### 5.5. Experimento 5 – Origem, tipos de explantes e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais *in vitro*

Houve diferença significativa dos tratamentos utilizados para todas as variáveis avaliadas (Tabela 11).

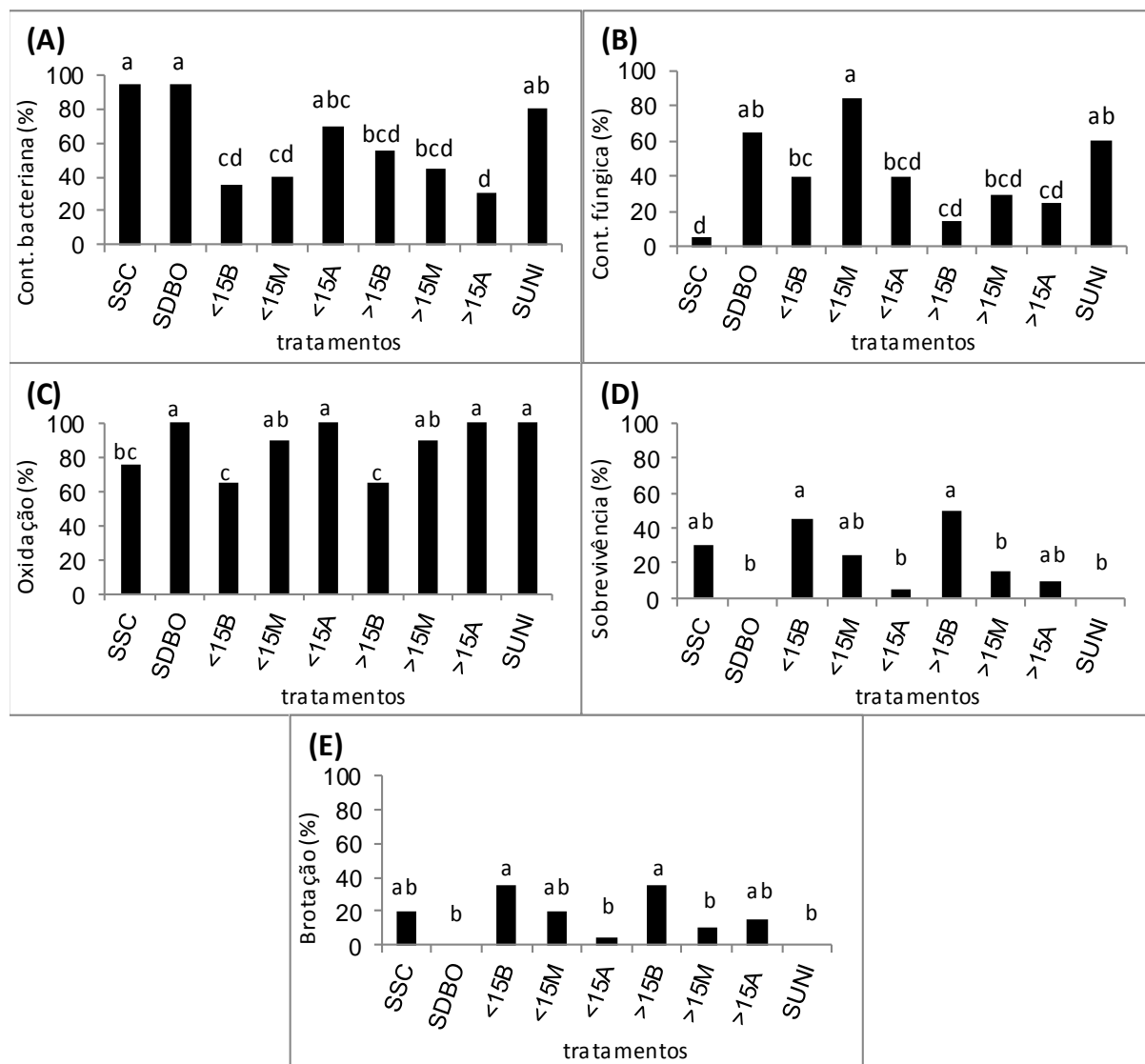
**Tabela 11** - Análise de Kruskal-Wallis em segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, oriundos de diferentes regiões (apical, mediana e basal) e tamanho de brotações, submetidos a diferentes ambientes de cultivo, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*.

Variáveis	X	p-valor
Contaminação bacteriana	23,95	$2,34 \cdot 10^{-3}$ **
Contaminação fúngica	22,64	$3,86 \cdot 10^{-3}$ **
Oxidação	28,85	$3,37 \cdot 10^{-4}$ **
Sobrevivência	26,43	$8,86 \cdot 10^{-4}$ **
Emissão de brotações	21,06	$6,99 \cdot 10^{-3}$ **

\*\* = valor significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis. Grau de liberdade para todas as variáveis avaliadas = 8.

Após 30 dias, o tratamento com explantes apicais oriundos de brotações maiores que 15 cm (>15A) apresentou menor contaminação bacteriana (30%), diferindo significativamente dos demais (Figura 9 A). A contaminação fúngica variou de 5% a 85%,

sendo que o tratamento de explantes sortidos (sem padronização) (SSC) apresentou menor contaminação fúngica, diferindo significativamente dos demais (Figura 9 B).



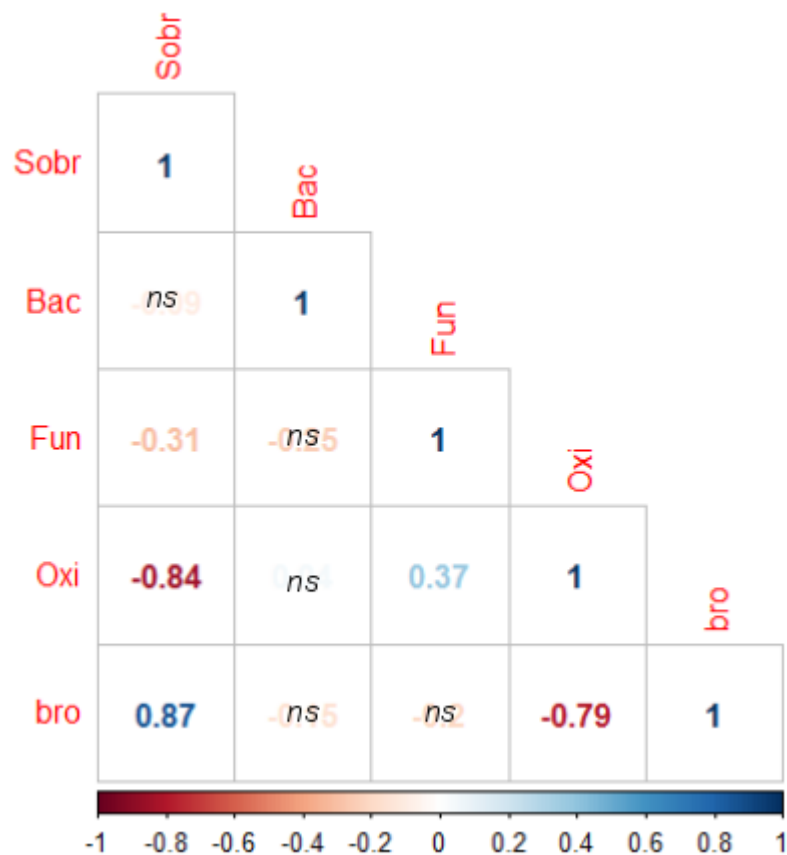
**Figura 9** - Efeito de segmentos nodais de clone de *I. paraguariensis*, oriundos de diferentes regiões (apical, mediana e basal) e tamanho de brotações, submetidos a diferentes ambientes de cultivo, avaliados aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. **(A)** Contaminação bacteriana, **(B)** Contaminação fúngica, **(C)** Oxidação, **(D)** Sobrevivência, **(E)** Emissão de brotações. SSC = explantes sortidos oriundos de brotações de diversos tamanhos; SDBO = explantes sortidos oriundos de brotações de diversos tamanhos, mantidos em incubadora DBO; <15B = explantes basais oriundos de brotações menores que 15 cm; <15M = explantes intermediários oriundos de brotações menores que 15 cm; <15A = explantes apicais oriundos de brotações menores que 15 cm; >15B = explantes basais oriundos de brotações maiores que 15 cm; >15M = explantes intermediários oriundos de brotações maiores que 15 cm; >15A = explantes apicais oriundos de brotações maiores que 15 cm; SUNI = explantes sortidos oriundos de brotações de diversos tamanhos, de minicepas acondicionadas em vasos, em casa de vegetação na Unicentro. Médias seguidas por mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Explantes oriundos da região basal das brotações apresentaram menor porcentagem de oxidação (Figura 9C), o que pode estar relacionado ao gradiente de juvenilidade, que, especialmente em plantas lenhosas, aumenta quanto mais próximo estiver da região basal. Quanto mais jovem o propágulo, devido ao baixo teor de fenóis, menor a oxidação (WENDLING; XAVIER, 2001; MONTEIRO et al., 2004; GONÇALVES et al., 2013). A menor oxidação encontrada neste experimento, pode estar relacionada também à época da coleta dos brotos, coletados no mês de abril. Ressalta-se que os brotos utilizados neste experimento apresentaram-se mais uniformes e maduros que nos demais experimentos realizados.

A influência da posição dos explantes na brotação também foi constatada por Pereira et al. (2014) na micropropagação de *Araucaria angustifolia* (pinheiro-do-paraná), onde os explantes oriundos da porção basal resultaram em maior número de brotações. Malosso et al. (2008), na micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (jambu), constataram que explantes oriundos da região intermediária do ramo resultaram em maior número de brotações.

Para *I. paraguariensis*, Sansberro et al. (1999) constataram que a região da brotação da qual os explantes foram retirados influenciou a emissão de gemas axilares, sendo que as porções mais próximas à base resultaram em um maior número de brotações.

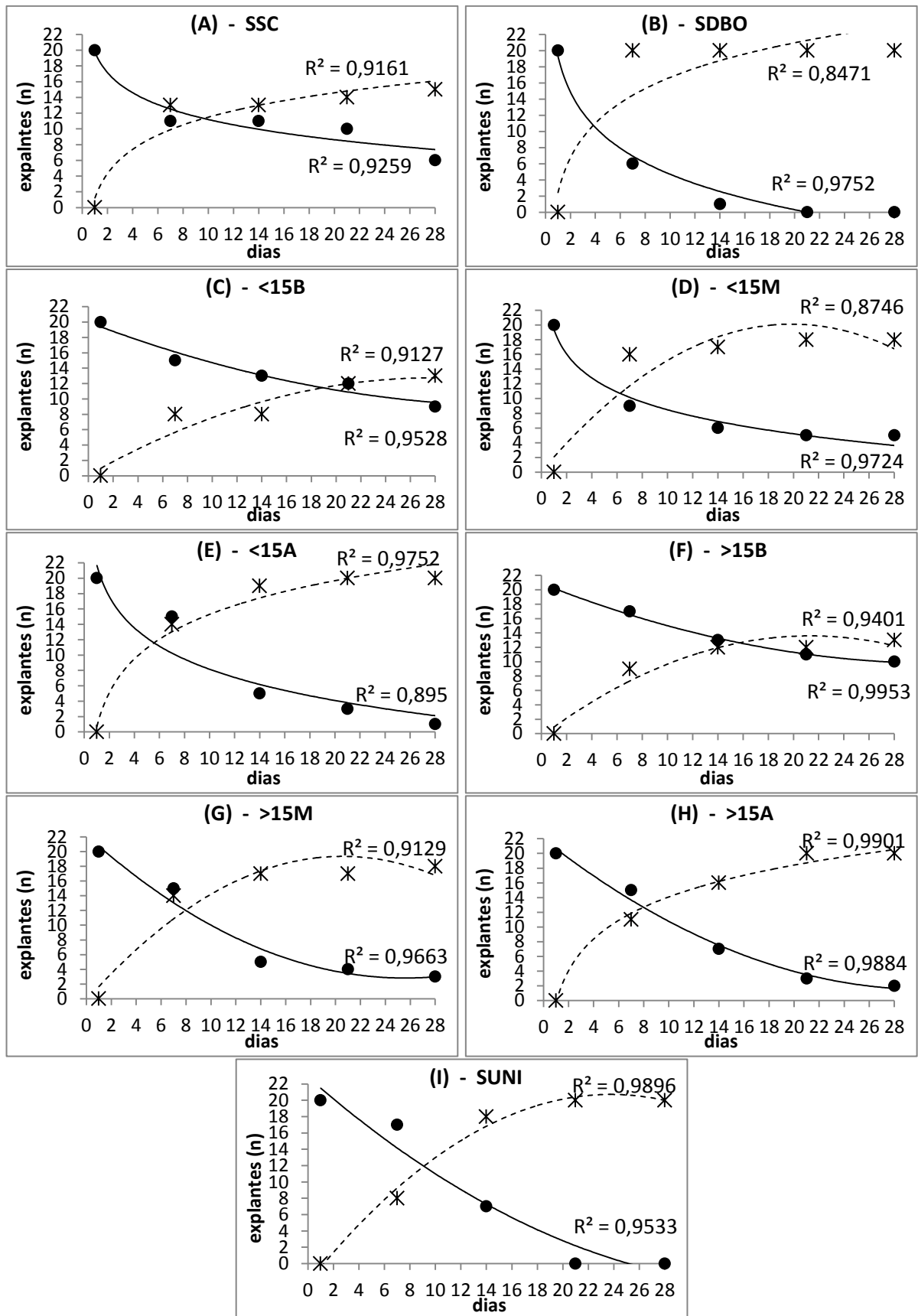
A oxidação teve alta influência e foi inversamente proporcional à sobrevivência dos explantes e à emissão de novas brotações, conforme coeficiente de correlação de Spearman (significativas a  $p < 0,05$ ) (Figura 10).



**Figura 10** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) em segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, oriundos de diferentes regiões (apical, mediana e basal) e tamanho de brotações (menor e maior que 15 cm), submetidos a diferentes ambientes de cultivo, após 30 dias de isolamento *in vitro*. ns = não significativo, demais correlações significativas a  $p < 0,05$ .

Considerando que as espécies lenhosas possuem elevada produção de metabólitos secundários, responsáveis muitas vezes pelo alto grau de oxidação dos explantes e do meio de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ANDRADE et al., 2000), elaborou-se gráficos de Sobrevivência *versus* Oxidação (Figura 11). Tendo em vista as limitações decorrentes da alta oxidação fenólica observada nos segmentos nodais, esta análise teve por finalidade determinar o momento propício para a transferência dos explantes de meio de cultivo, como alternativa para minimizar os efeitos da oxidação, procedimento este recomendado por Oliveira et al. (2013).





**Figura 11** - Sobrevivência e oxidação fenólica em segmentos nodais de clones adultos de *I. paraguariensis* em função do tamanho (maior ou menor que 15 cm) e região da brotação

(apical, intermediária e basal), aos 30 dias após o isolamento *in vitro*. **(A)** SSC = explantes sortidos oriundos de brotações de diversos tamanhos; **(B)** SDBO = explantes sortidos oriundos de brotações de diversos tamanhos, mantidos em incubadora DBO; **(C)** <15B = explantes basais oriundos de brotações menores que 15 cm; **(D)** <15M = explantes intermediários oriundos de brotações menores que 15 cm; **(E)** <15A = explantes apicais oriundos de brotações menores que 15 cm; **(F)** >15B = explantes basais oriundos de brotações maiores que 15 cm; **(G)** >15M = explantes intermediários oriundos de brotações maiores que 15 cm; **(H)** >15A = explantes apicais oriundos de brotações maiores que 15 cm; **(I)** SUNI = explantes sortidos oriundos de brotações de diversos tamanhos, de minicepas acondicionadas em vasos, em casa de vegetação na Unicentro. Linha contínua = sobrevivência; linha pontilhada = oxidação fenólica.

A oxidação mais lenta foi observada no tratamento com explantes oriundos da região basal (Figura 11 C e 11 F), o que pode ser atribuído à menor produção de fenóis devido ao maior gradiente de juvenilidade próximo a esta região (WENDLING; XAVIER, 2001; MONTEIRO et al., 2004; GONÇALVES et al., 2013), demonstrando-se, dos padrões de explantes avaliados, o mais viável para o cultivo *in vitro* dos clones de *I. paraguariensis* estudados nesta pesquisa.

O subcultivo dos segmentos nodais dos clones de *I. paraguariensis* avaliados no presente estudo realizado antes do ponto crítico determinado, poderia aumentar a sobrevivência dos explantes, tal como recomendado por Oliveira et al. (2013) para a superação da oxidação no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, tendo em vista a liberação dos fenóis da planta para o meio de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

## 5.6. Experimento 6 – Concentrações de BAP, antioxidante e condições de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares em segmentos nodais *in vitro*

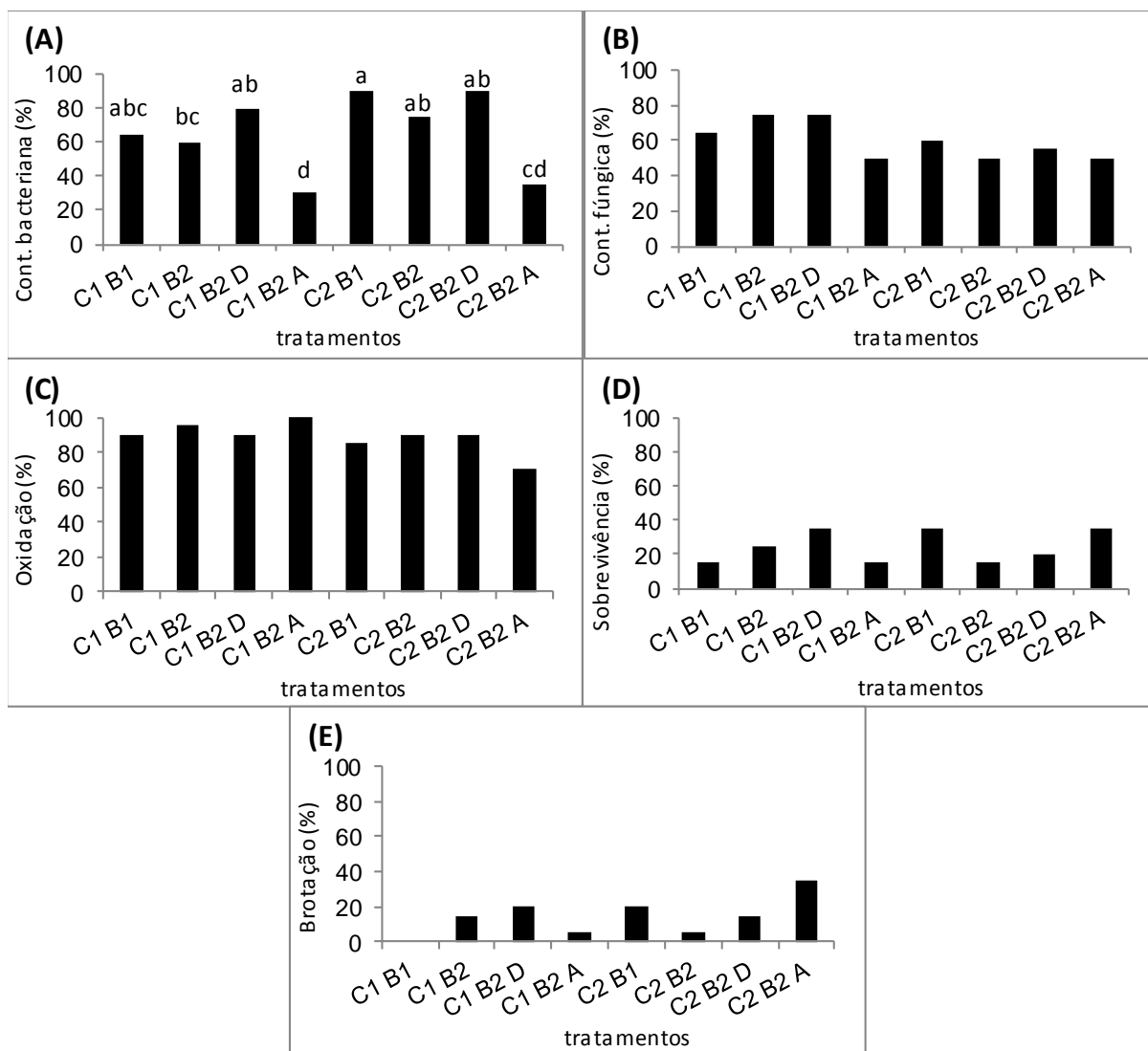
Os tratamentos dos explantes de diferentes clones isolados em meio com concentrações de BAP e ácido ascórbico, em diferentes ambientes de cultivo, foram significativamente diferentes apenas para contaminação bacteriana (Tabela 12).

**Tabela 12** - Análise de Kruskal-Wallis (KW) em segmentos nodais de diferentes clones de *I. paraguariensis* isolados em meio com concentrações de BAP, com ou sem ácido ascórbico, mantidos em diferentes ambientes de crescimento, para as variáveis avaliadas aos 30 dias após o isolamento *in vitro*.

Variáveis	X	p-valor
Contaminação bacteriana	21,618	$3,00 \cdot 10^{-3}$ **
Contaminação fúngica	8,833	$2,65 \cdot 10^{-1}$ ns
Oxidação	11,605	$1,14 \cdot 10^{-1}$ ns
Sobrevivência	4,809	$6,83 \cdot 10^{-1}$ ns
Emissão de brotações	13,261	$6,60 \cdot 10^{-2}$ ns

ns = valor não significativo a 5% de probabilidade de erro; \*\* = valor significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis. Grau de liberdade para todas as variáveis avaliadas = 7.

Os tratamentos com a adição de ácido ascórbico ao meio de cultivo, tanto para explantes do clone C1 quanto para explantes do clone C2, foram os que apresentaram menor contaminação bacteriana, sendo o tratamento C1 B2 A superior aos demais tratamentos (Figura 12 A).

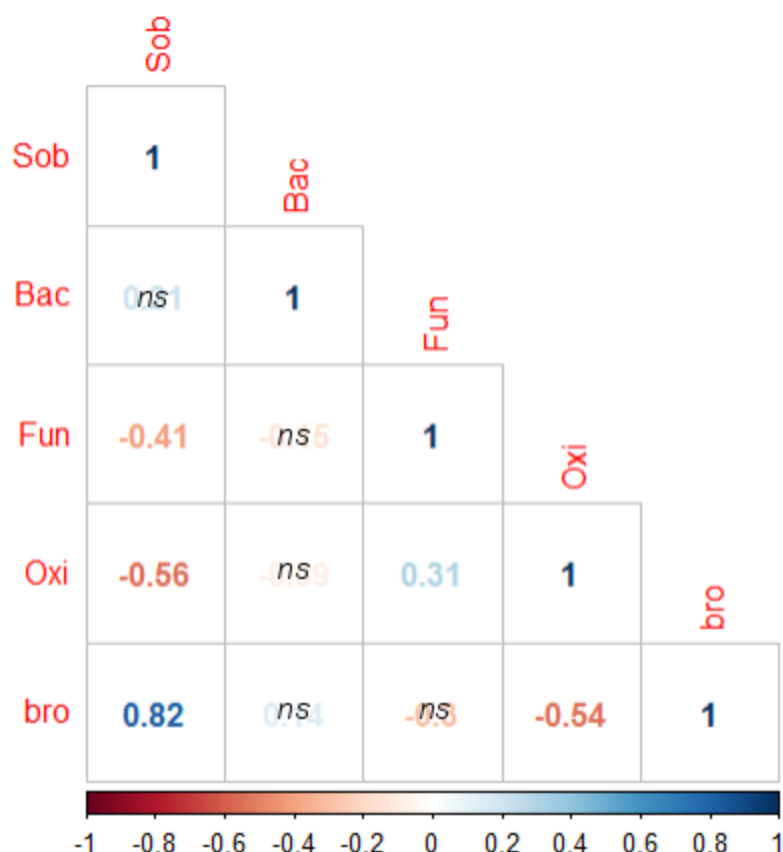


**Figura 12** - Efeito de concentrações de BAP, antioxidante e ambiente de cultivo no isolamento *in vitro* de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, aos 30 dias de isolamento *in vitro*. **(A)** Contaminação bacteriana, **(B)** Contaminação fúngica, **(C)** Oxidação, **(D)** Sobrevivência, **(E)** Emissão de brotações. C1 = clone 1; C2 = clone 2; B1 = BAP 1 mg.L<sup>-1</sup>; B2 = BAP 2 mg.L<sup>-1</sup>; D = incubadora DBO; A = ácido ascórbico. Médias seguidas por mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Contaminação fúngica, oxidação, sobrevivência e emissão de brotações não apresentaram diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

A redução da contaminação bacteriana com o uso de ácido ascórbico também foi relatada por Motoyama et al. (2003). Os autores observaram que a adição de um extrato cítrico comercial composto por ácido ascórbico, ao cultivo de *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (ambas bactérias fitopatogênicas), reduziu o crescimento *in vitro*, chegando à inibição em algumas concentrações utilizadas.

Neste experimento, assim como nos demais, a oxidação foi elevada (superior a 70%), indicando que o ácido ascórbico não teve eficácia para nenhum dos clones avaliados. Esta ineficácia pode estar relacionada à concentração de ácido ascórbico utilizado, para que, indica-se a avaliação de concentrações de ácido ascórbico ao meio de cultivo *in vitro* de *I. paraguariensis*.

A análise de correlação de Spearman (significativas a  $p < 0,05$ ) indicou que, neste experimento, a oxidação fenólica também foi a maior influência à sobrevivência e indução de brotação nos explantes (Figura 13).



**Figura 13** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) de segmentos nodais de clones de *I. paraguariensis*, cultivados em diferentes concentrações de BAP, antioxidante e ambientes de cultivo, após 30 dias de isolamento *in vitro*. ns = não significativo, demais correlações significativas a  $p < 0,05$ .

## 5.7. Experimento 7 – Tipos de explantes e aditivos ao meio de cultivo no isolamento e indução de gemas axilares *in vitro*

A análise de Kruskal-Wallis indicou que houve diferença significativa para a contaminação bacteriana entre os clones avaliados utilizando-se diferentes tipos de explante e aditivos ao meio de cultivo (Tabela 13).

**Tabela 13** - Análise de Kruskal-Wallis (KW) para diferentes tipos de explantes isolados de clones de *I. paraguariensis*, cultivados em meio acrescido ou não com carvão ativado ou extrato pirolenhoso, para as variáveis avaliadas após 30 dias do isolamento *in vitro*.

Variáveis	X	p-valor
Contaminação bacteriana	22,025	$2,50 \cdot 10^{-3}$ **
Contaminação fúngica	10,474	$1,63 \cdot 10^{-1}$ ns
Oxidação	8,667	$2,78 \cdot 10^{-1}$ ns
Sobrevivência	8,451	$2,95 \cdot 10^{-1}$ ns
Emissão de brotações	7,000	$4,29 \cdot 10^{-1}$ ns

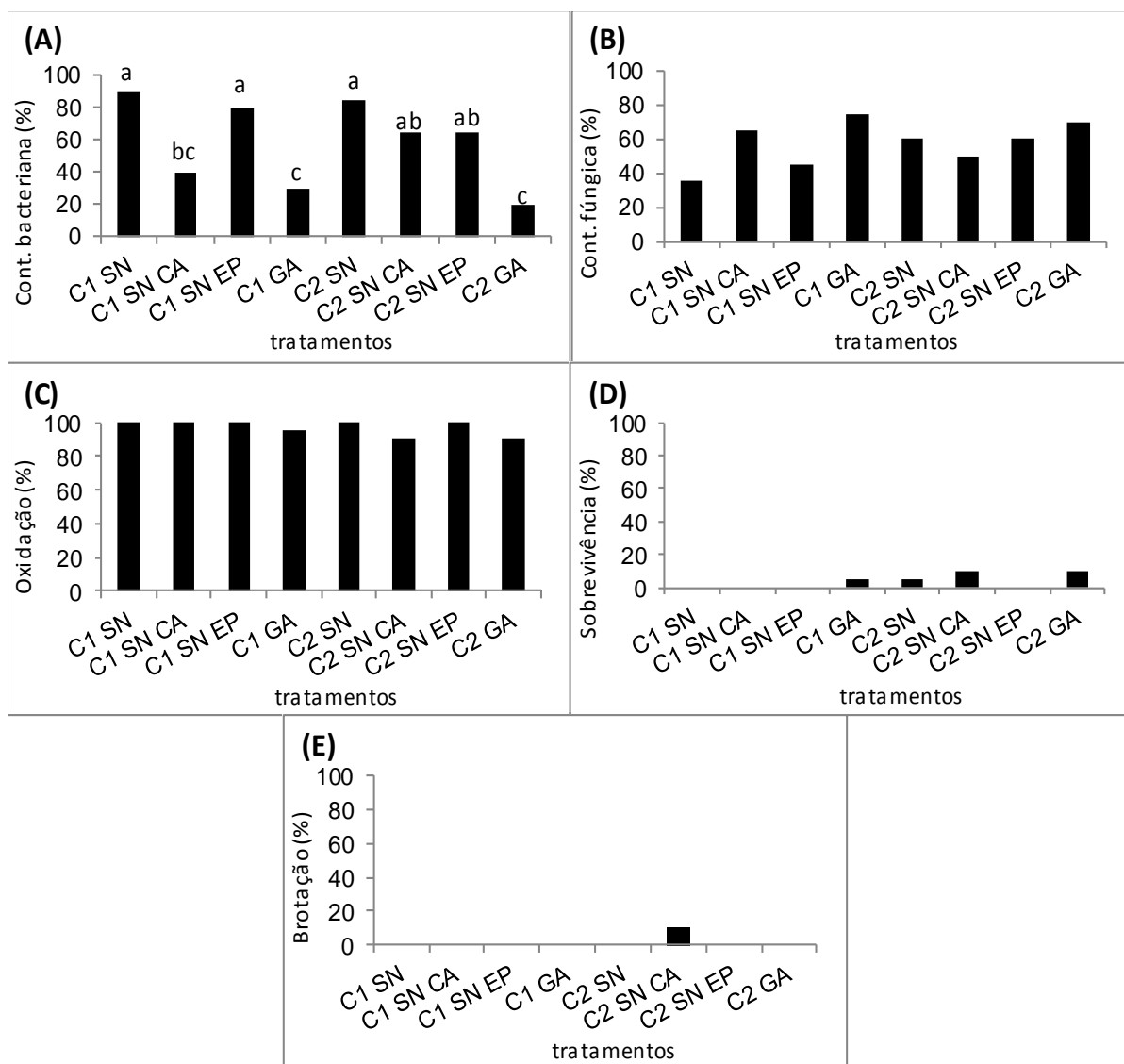
ns = valor não significativo a 5% de probabilidade de erro; \*\* = significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste de Kruskal-Wallis. Grau de liberdade para todas as variáveis avaliadas = 7.

Tanto para o clone C1 quanto para o clone C2, os explantes confeccionados a partir de gemas axilares isoladas, apresentaram menor contaminação bacteriana (30 e 20 % respectivamente), sendo estatisticamente superiores aos demais tratamentos aplicados (Figura 14 A).

A baixa contaminação dos explantes confeccionados à partir de gemas axilares isoladas (Figura 14 A), possivelmente está relacionada ao tamanho do explante, pois de acordo com Grattapaglia; Machado (1998), quanto menor o explante, maior a probabilidade de se obter culturas livres de contaminação. O cultivo de explantes de menores dimensões é realizado, muitas vezes, com o intuito de obtenção de culturas livres de vírus (ERIG; FORTES, 2002).

Estudos sobre o tamanho ou tipo de explantes são escassos para as espécies florestais, contudo, Erig; Schuch (2003), na propagação *in vitro* de algumas variedades de *Malus domestica* Borkh. (macieira), obtiveram menor contaminação bacteriana utilizando como explantes gemas oriundas de ápices caulinares. A menor contaminação em explantes de tamanho reduzido também foi constatada por Bianchi (2003) no cultivo *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill. (marmeleiro) e por Dantas et al. (2002) na micropropagação de *Pyrus* sp (pera), em que os explantes oriundos de meristema apresentaram menor contaminação comparados aos explantes de segmentos nodais. Além disso, Souza et al. (2007) avaliaram explantes constituídos de segmentos nodais de *Eugenia uniflora* (pitangueira) de diferentes tamanhos (0,5; 1 e 1,5 cm), constatando que os explantes menores tiveram oxidação reduzida.

Ainda para o controle de contaminação, o extrato pirolenhoso (EP) é apontado por Yagi; Tsukamoto (1991), Jung (2007), Kumar et al. (2011), Lorenzetti et al. (2012) e por Donde et al. (2013) como potencial biocida no controle de fitopatógenos, porém neste trabalho, o uso do EP adicionado ao meio de cultivo não resultou em controle na contaminação *in vitro* (Figuras 14 A e 14 B).

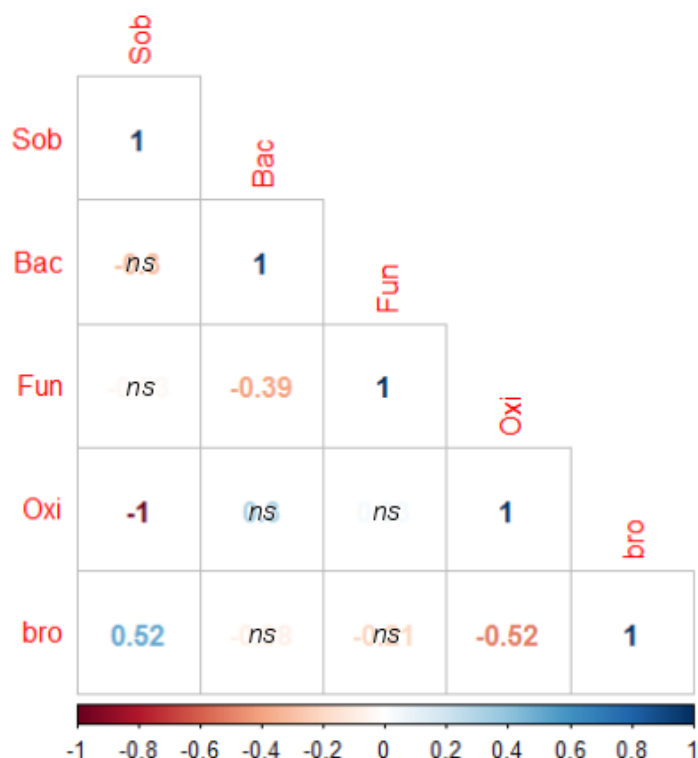


**Figura 14** - Efeito de diferentes tipos de explantes de clones de *I. paraguariensis*, cultivados em meio básico com ou sem carvão ativado ou extrato pirolenhoso, após 30 dias de isolamento *in vitro*. **(A)** Contaminação bacteriana, **(B)** Contaminação fúngica, **(C)** Oxidação. C1 = clone 1; C2 = clone 2; SN = segmento nodal; CA = carvão ativado; EP = extrato pirolenhoso; GA = gema axilar.

A elevada oxidação dos explantes (superior a 90%) culminou na morte dos segmentos nodais (Figura 14 C). Diante disso, apenas para os segmentos nodais do clone C2 cultivado em meio com carvão ativado foi possível observar a emissão de gemas axilares (10%) (Figura 14 E).

Embora Santos; Wendling (2010) tenham observado menor oxidação em explantes de *I. paraguariensis* cultivados em meio acrescido de carvão ativado, neste trabalho não se constatou estatisticamente a eficiência do carvão ativado para redução da oxidação fenólica (Figura 14 C). A ineficácia do carvão ativado para controle da oxidação no cultivo *in vitro* também foi relatada por Silveira et al. (2016), para *Calophyllum brasiliense*.

A análise de correlação de Spearman entre as variáveis avaliadas, indicou influência negativa da oxidação para a sobrevivência e brotação dos explantes (Figura 15, ambas significativas a  $p < 0,05$ ), sendo o maior problema para o isolamento e indução das culturas *in vitro* neste experimento. Os resultados observados no presente trabalho, corroboram com Azofeifa (2009); Hörner et al. (2001); Rosa et al. (2006), Dutra et al. (2008), Santos; Wendling (2010) e Ross et al. (2017), que apontam a oxidação como um dos principais entraves à propagação *in vitro* de plantas lenhosas.



**Figura 15** - Correlação de Spearman, onde cores mais fortes indicam a maior intensidade da correlação, para as variáveis sobrevivência (Sob), contaminação bacteriana (Bac), contaminação fúngica (Fun), oxidação (Oxi) e brotações (bro) de clones (C1 e C2) e tipos de explantes (gema axilar isolada e segmento nodal) isolados de clones de *I. paraguariensis*, cultivados em meio básico com ou sem carvão ativado ou extrato pirolenhoso, após 30 dias de isolamento *in vitro*. ns = não significativo, demais correlações significativas a  $p < 0,05$ .

## 6. CONCLUSÕES

Perante os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- A desinfestação de explantes em imersão em solução de 7,5 mL. L<sup>-1</sup> de NaOCl por 30' resultou em maior sobrevivência dos explantes;
- Os óleos essenciais de *M. arvensis* (hortelã-japonesa) e de *S. aromaticum* (cravo) são eficientes bactericidas e fungicidas quando utilizados como solução desinfestante dos explantes ou como aditivo ao meio de cultivo;
- O ácido ascórbico contribuiu para a redução da contaminação bacteriana;
- Os antioxidantes cisteína, ácido ascórbico e carvão ativado não foram eficientes para o controle da oxidação *in vitro*;
- Segmentos nodais oriundos da região basal das brotações são os mais indicados para o estabelecimento *in vitro* dos clones avaliados;
- O acondicionamento direto dos explantes sob fotoperíodo (sem prévia permanência em câmara escura) é o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* do clone avaliado;
- A oxidação é o principal problema no estabelecimento *in vitro* de *I. paraguariensis*, para os clones estudados.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEYEMI, M. M. H. The potential of secondary metabolites in plant material as deterents against insect pests: A review. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n. 11, p. 243-246, 2010.
- AGUIAR, J. T.; SCHORR, L. P. B.; SILVA, D. K.; ROSA, G. M.; VENDRUSCOLO, E. Indutores de crescimento no enraizamento de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) por estaquia. In.: VII Congresso Sul-Americano da Erva-Mate; III Simpósio Internacional de Erva-Mate e Saúde; I Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira. Erechim - RS, 16 a 18 de maio de 2017. **Anais...** Erechim: Ed dos Organizadores, p. 108-113, 2017.
- ALLOUFA, M. A. I.; MACÊDO, C. E. C.; BARROSO, P. A. V.; BARBALHO, A. D.; OLIVEIRA, C. H. B. Avaliação de dois agentes antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de inflorescências de bananeira (*Musa* spp). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 5, p. 1092-1096, 2001.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.
- ANICEZIO, L. C. de; Efeito de Antioxidantes e Descontaminantes no Estabelecimento de Explantes de Bananeira (*Musa* spp) *in vitro*. **UNICIÊNCIAS**, v. 16, n. 1, p.9-16, 2012.
- ARCOBELI COLA, M. P.; ARCOBELI COLA, G. P.; ANDRADE, E. K. V. de; BARBOSA DA SILVA, N. C. Controle da oxidação *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia uniflora* L. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. **Anais...** São José dos Campos, SP: Universidade do Vale do Paraíba, p. 1-4, 2010.
- ARYA, I. D.; SHARMA, S.; ARYA, S. Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14(*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook): A commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5718-5726, 2009.
- ASSESOAR. **Métodos ecológicos de controle de insetos e de doenças das plantas e do solo**. Francisco Beltrão: ASSESOAR, 2014.
- AZOFEIFA, Á. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. **Agronomía Mesoamericana**, v. 20, n. 1, p. 153-175, 2009.
- BARRUETO CID, L. P.; JORDAN ZIMMERMAN, M. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 122, 2006. 20 p
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. C.; SCHUCH, M.W.; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 149-152, 1998.
- BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.277-281, 2009.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v. 1, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 1039 p.
- CASTRO, C. R.; RIBEIRO, I. G.; CALLADO, C. H.; ALBARELLO, N. Estudos do controle da oxidação e da contaminação visando o estabelecimento da cultura *in vitro* de *Mezilaureus navalium* (Allemão) Taub. ex Mez (Lauraceae). In.: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 3., 2007. **Anais...** Goiânia: Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v. 13, p. 459-463, 2007.
- CASTRO, P. R. C.; CARVALHO, M. E. A. Aminoácidos e suas aplicações na agricultura. **Série Produtor Rural**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, n. 57, 2014, 58 p.
- CHAUSSÉ, T. C. C.; SILVA DIAS, D. B.; MIDLEJ SILVA, S. D. V.; BOMFIM COSTA, J. C.; e BOMFIM COSTA, L. C. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a vassoura de bruxa do cacauero. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 492-496, 2011.
- CONCEPCIÓN O.; NÁPOLES, L.; PÉREZ, A. T.; HERNÁNDEZ, M.; PERALTA, N.; TRUJILLO, R. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. **Cultivos Tropicales**, v. 26, n. 1, p. 33-39, 2005.
- CONDE, P.; SOUSA, A.; COSTA, A.; SANTOS, C. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 92, p. 113-119, 2008.
- CORREA, J.E.L.; BOTERO, L. R. C. Cultivo *in vitro* de la especie forestal amenazada *Peltogyne purpurea* Pittier. Un aporte para la conservación y preservación ambiental en Colombia. **V Congreso Latinoamericano de Agroecología**. Anais... La Plata, Argentina, 2015.
- COSTA, F. H. S., PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e n6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- CUQUEL, F. L.; CARVALHO, MLM de; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 415-421, 1994.
- DANIEL, O. **Erva-mate: Sistema de Produção e Processamento Industrial**. Dourados, MS: UFGD, UEMS. 2009. 288 p.
- DANTAS, A. C. M.; NESI, A. N.; MACHADO, L. B.; HAERTER, J.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8 n. 1, p. 19-23, 2002
- DE OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. **Área de distribuição natural da Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1983.
- DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V.G.; ROQUES, C.G.; MICHEL, G.; MARQUIER-VIÑUALES, C.; BESSIERE, J.M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**. V. 12, p. 256-266, 2000.
- DINIZ, S.P.S.S.; COELHO, J.S.; ROSA, G.S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, R.R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 9-11, 2008.
- DOLCE, Natalia R.; REY, Hebe Y. Cultivo *in vitro* de ápices de *Ilex paraguariensis*: efecto del pretratamiento con medios líquidos sobre la brotación. In: **Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas 2006**. Corrientes, Argentina: Universidade Nacional del Nordeste. 2006.
- DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JR., E. L.; DONADUZZI, E. M.; SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênes

de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em três municípios do Paraná. **Arquivos de Ciência e Saúde da UNIPAR**, v. 7, n. 2, p. 129-133, 2003.

DONDE, A. R.; RODRIGUES, C.; BAMBOLIM, A.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais no desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. In.: I Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, Alta Floresta-MT, 23 e 24 de setembro de 2013. **Anais...** Alta Floresta: UNEMAT, 2013.

DUBOC, E.; FRANÇA, R. S. S. S. R. de. Resultados preliminares sobre a qualidade de sementes de erva-mate coletados no estado de Mato Grosso do Sul em 2015. In: SEMINÁRIO DE AGROECOLOGIA DA AMÉRICA DO SUL, 2., 2016, Dourados. **Anais...** Dourados: UFGD, 2016. 1 CD-ROM.

DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. Introdução ao cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Curitiba: Embrapa Florestas, n. 38, 2008.

DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. da. Estabelecimento *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Comunicado Técnico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, n. 215, 2009. 7 p.

EMBRAPA. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Editores técnicos, Ivar Wendling, Delmar Santin. – Brasília, DF: EMBRAPA, 2014.

ERIG, A. C.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 577-582, 2002.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. galaxy, maxigala e mastergala. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

FALKINER, F. R. Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation - what are we aiming at? In: **Cassells AC (ed) Pathogen and microbial contamination management in micropropagation**. Kluwer, Dordrecht, pp 155–160, 1997.

FAUERHARMEL, M.; Luz, L.; LENCINA, K. H.; BISOGNIN, D. A. Posição de coleta e uso de AIB no enraizamento de estacas de erva-mate. In.: VII Congresso Sul-Americano da Erva-Mate; III Simpósio Internacional de Erva-Mate e Saúde; I Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira. Erechim - RS, 16 a 18 de maio de 2017. **Anais...** Erechim: Ed dos Organizadores, p. 126-131, 2017.

FERNANDES, L.; BORGES, N. M.; PEREIRA, A. P. S.; SILVA, L. B. D.; KARSBURG, I. V.. Extrato pirolenhoso no desenvolvimento de *Catasetum osculatum* Lacerda & P. Castro. III Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. **Anais...** Cáceres, v. 2, n. 1, 2015.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004.

FERREIRA, D. A. T.; DUARTE, J. A. S.; MONTEIRO, E. C.; SILVA, M. S. A.; SILVA, L. D.; CABANEZ, P. A. Efeito citotóxico do extrato aquoso de *Mentha piperita* sobre o índice mitótico de *Licopersicum esculentum* M. I Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. **Anais...** Alta Floresta, MT, 2013.

FIORI, A.C.F.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Dydimella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v.148, n.7/8, p. 483-488, 2000.

GADELHA, J. C; INNECCO, R.; ALCANFOR, D. C.; MATTOS, S. H.; MEDEIROS FILHO, S.; VIEIRA, A. V. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pedúnculo de melão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 1, p. 5 -10, 2003.

- GALLO, R.; XAVIER, A.; MOURA, L. C. de; OLIVEIRA, B. de A.; NASCIMENTO, H. R. do; OTONI, W. C. IBA and microcutting collections in the micropropagation of *Eucalyptus* spp hybrid clones. **Revista Árvore**, v. 41, n. 6, 2017.
- GEORGE, E.F; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. England: Exegetics Limited, ed 3, 2008.
- GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 137-144, 2003.
- GONÇALVES, T. S.; BARBOSA, W. M.; NANNETTI, D. C.; SANTOS, L. G. M. dos; CAPRONI, D. T R.; MELO, Felipe. Oxidação *in vitro* de *Olea europaea* L. 5ª Jornada Científica e Tecnológica e 2º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS. **Anais... Inconfidentes**, MG, 2013.
- GRAÇA, M. E. C.; TAVARES, F. R.; RODIGHERI, H. R.; COOPER, M. A. **Produção de mudas de erva-mate por estaquia**. Curitiba: Embrapa Florestas – EMATER, 1990. 20 p.
- 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: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998. p. 183-260.
- 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 (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 39, p. 31-39, 1999.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; FRITSCHÉ, Y.. **Biotecnologia I**. Universidade Federal de Santa Catarina, Apostila, v. 1, 2016.
- GUYNOT, M. E.; RAMOS, A. J.; SETÓ, L.; PURROY, P.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. **Journal of Applied Microbiology**, n. 94, 2003, p. 893-899.
- HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Ápices caulinares como alternativa de resgate de matrizes adultas de *Eucalyptus benthamii* diretamente do campo – Resultados preliminares. **Comunicado Técnico**. Colombo: Embrapa Florestas, n. 153, 2005.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JR., F.T.; GRENEVE, R.L.. **Plant propagation: principles and practices**. 6th ed. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: Prentice Hall, 1997. 770p.
- HIGA, R. C. V. Estaquia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire). **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 304-305, 1983.
- HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.
- HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. Santa Maria, RS: UFSM, 2008.
- HÖRNER, L. A.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A.; MIELKE, M. S.; SUZIN, M.; DENARDIN, N. D. Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2001.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal em 2016**, acessado em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em Janeiro de 2018.
- INOUE, M. T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**, v. 37, n. 1, 2007.



- IRITANI, C.; SOARES, R. V. Ação de reguladores de crescimento em estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Floresta**, v. 12, n. 2, 1981.
- JUNG, K.H. Growth inhibition effect of pyroligneous acid on pathogenic fungus, *Alternaria mali*, the agente of alternaria blotch of apple. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 1, p. 318-322, 2007.
- KUMAR, V.; CHAUHAN, A. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Inhibitory activity of oak pyroligneous liquor against *Coleosporium plectranthi*, an obligate parasite responsible for the rust disease on perilla leaf. **Korean Journal of Environmental Agriculture**, v. 30, n. 4, p. 453-458, 2011.
- LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Biochemistry**, v. 27, n.4, p. 969-978, 1988.
- LATTUADA, D. S. **Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)** 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. das G.; MORAES, J. C.; VIEIRA, S. S.; MELO, B. A.; FILGUEIRAS, C. C. Composição dos Óleos Essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. e de Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 3, 2008.
- LOPES DA SILVA, A. L.; GOLLO, A. L.; BRONDANI, G. E.; HORBACH, M. A.; SILVA DE OLIVEIRA, L.; PEREIRA MACHADO, M.; DELLANI DE LIMA, K. K.; LUZ COSTA, J. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* SM. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 311-318, 2015.
- LORENZETTI, E.R.; CONCEIÇÃO, D.M.; SACRAMENTO, L.V.S.; FURTADO, E.L. Controle da ferrugem das folhas do capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] com produtos naturais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 571-578, 2012.
- LORENZI, H.; F.J.A. MATOS. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2000, 512 p.
- LUNA, C.; ACEVEDO, R.; COLLAVINO, M.; GONZÁLEZ, A.; MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P. Endophytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p. 326-332, 2013.
- MACHADO, C. C. B.; BASTOS, D. H. M.; JANZANTTI, N. S.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; FRANCO, M. R. B. Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas à partir da erva-mate. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 513-518, 2007.
- MALOSSO, M.G.; BARBOSA, E.P.; NAGAO, E.O. Micropropagação de jambu [*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen]. Botucatu: **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n.3, p. 91-95, 2008.
- MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, n. 2, 1990.
- MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.
- MARTINEZ DOS SANTOS, L. G.; CARDOSO, M. G.; LIMA, R. K.; SOUZA, P. E.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, M. A. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **TECNO-LÓGICA**, Santa Cruz do Sul, v. 11, n. 1, p. 11-14, 2007.

MARTINS, J. A. S.; SAGATA, E.; SANTOS, V.A.; JULIATTI, F.C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 49-51, 2010.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 26, n. 2, p.231-238, 2003.

MELO, B.; PINTO, JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA. E. B. P.; QUEIROZ LUZ, J. M.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

MENNA, A. B. Proposta para ação extensionista na cultura da erva-mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. (Org). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

MONDELLO, F.; GIROLAMO, A.; SCATURRO, M.; RICCI, M.L. Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. **Journal of microbiological methods**, v. 77, n. 2, p. 243-248, 2009.

MONTEIRO, M. B. de O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. dos S. Bioquímica da lignificação de células xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 48-57, 2004.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORI, A. C. G; e SCAPIM, C. A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 509-512, 2003.

MROGINSKI, L. A.; ROUVIER, S. M.; FABISIK, J. C.; LEVIT, M.;MARASSI, M. A. SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. Effect of medium composition and light supply on *in vitro* shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Journal of Plant Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 359-369, 1999.

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

NIKLAS, C. O. Estudos embriológicos y citológicos em la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, v. 6, n. 1, p. 45-56, 1987.

OLIVEIRA FILHO, J. G.; FALCÃO, H. A. S. ; SILVA, E. R. ; MACAGNAN, D.; FERNANDES, M. Embalagem biodegradável e ativa com função antimicrobiana para aplicação no pós-colheita de banana. Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. **Anais...** Campinas: UNICAMP, v. 2, 2015.

OLIVEIRA, L. S. de.; XAVIER, A.; COQUEIRO DIAS, P.; CORREIA, A. C. G.; BORGES, S. R.; TAKAHASHI, E. K.; PAIVA, H. N. de. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 507-516, 2012.

OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.33, n.76, p.445-460, 2013.

OLIVEIRA, M.M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINARIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: Silvicultura da Erva-mate (*Ilex paraguariensis*), 1985. **Anais...** Curitiba: Embrapa-CNPf, 1985. p.17-36.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. Micropropagación. In: LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBISNTEIN, C.; HOPP, E.; MROGINSKI, L. (eds.). **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II**. Buenos Aires: INTA, 2010. Cap. 4, p. 351-376.

PASINATO, Renata. **Aspectos Etnoentomológicos, Socioeconômicos e Ecológicos Relacionados à Cultura da Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no Município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil**. São Paulo: USP, 2002.

PENTEADO, S.R.C.; IEDE, E.T.; LEITE, M.S.P. Pragas da erva-mate: perspectivas de controle. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., Encantado, 2000. **Anais...** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2000.

PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S; TEIXEIRA, D. S.; MISSIO, F. F.; TONETT, E. L. Estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de araucária (*Araucaria angustifolia*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 4, p. 303-309, 2014.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba. ESALQ/USP. 2004.

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

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. São Paulo, Nobel, 1987. 466p.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M.; FACHINELLO, J. C.; OLIVEIRA, R. P. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GXN-9'. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 2, p. 95-101, 2009.

REED B. M.; MENTZER J.; TANPRASERT P.; YU X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 67-70, 1998.

REY, H. Y; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A. Medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Turrialba**, v. 41, n. 3, p. 306-310, 1991.

RINALDUCCI, S.; MURGIANO, L.; ZOLLA, L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 14, p. 3781–3801, 2008.

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

ROSS, S.; ARRIAGA, M. E.; PECHI, E. Establecimiento *in vitro* de Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) nativa de Uruguay. **Agrociencia Uruguay**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2017.

SALAZAR, A. M. M.; JIMÉNEZ, G. S.; LOZANOY, S. E.; MONROY, M. R. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de *Cedrus atlantica* mediante yemas axilares. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 7, n. 8, p. 2071-2078, 2016.

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

SANTIN, D.; WENDLING, I.; BENEDETTI, E. L.. Técnica de propagação, procedência e fonte de nitrogênio na produtividade de erva-mate em sucessivas colheitas. In.: VII Congresso Sul-Americano da Erva-Mate; III Simpósio Internacional de Erva-Mate e Saúde; I

Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira. Erechim - RS, 16 a 18 de maio de 2017. **Anais...** Erechim: Ed dos Organizadores, p. 102-107, 2017.

SANTOS PEREIRA, A. dos; SEIXAS, F. R. M. S.; DE AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

SANTOS, D.C. dos; WENDLING; I. **Avaliação de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate**. **BIOFAR**, v. 4, n. 2, 2010.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª edição. Editora da UFSC, p. 403-434, 2003.

SCHERER BASSAN, J; SILVEIRA REINIGER, L. R.; GOMES ROCHA, B. H.; PEICHE SEVERO, C. R.; VASCONCELOS FLÔRES, A. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. de. VENTURA, M. U.; SORACE, M. Substratos e extrato pirolenhoso no cultivo de orquídeas brasileiras *Cattleya intermedia* (John Lindley) e *Miltonia clowesii* (John Lindley) (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 32, n. 1, p. 139-143, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, 2000.

SHEN, J.; YANG, G. T.; LIU, D. J. Effect of wood vinegar on tissue culture of blueberry (*Vaccinium uliginosum* Linn.). **Journal of Hunan Agricultural University**. v. 39, p. 160-165, 2012.

SILVA, I. D. da; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R. da; GOMES DA CUNHA, M. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

SILVEIRA, S. S.; SILVA, R. C.; NESI, J.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. G. G. Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 76, n. 3, pp. 656-663, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; VOLKER, S. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª edição. Editora da UFSC, p. 467-495, 2003.

SMIRNOFF, N. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. **Annals of Botany**, v. 78, p. 661–669, 1996.

SOBREIRA, A. M.; SILVA, M. A. D.; COELHO JUNIOR, L. F.; CALADO, T. B.; TELES, E. C. P. V. A.; FERRAZ, A. P. F. Influência do extrato aquoso de folhas de hortelã sobre o desenvolvimento de mudas de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, 2012.

SOTELO, M; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia**, v. 6, n. 1, p. 81-89, 2007.

SOUZA, A.D.; ROGGERIO, T.U.; FURLAN, M.R.; AOYAMA, E.M. Óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche, Cheel) no controle de cercosporiose em beterraba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, 2015.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; Soares, G. C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n.1, p.115-118, 2007.



- SPEARMAN, C. The Proof and Measurement of Association between Two Things. **The American Journal of Psychology**, v. 15, n. 1, p. 72 - 101.
- STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J. de; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Age of stock plants, seasons and lba effect on vegetative propagation of *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, v. 41, n. 2, 2017.
- SUN, Y.; ZHANG, D.; SMAGULA, J. Micropropagation of *Ilex glabra* (L.) A. Gray. **HortScience**, v. 45, n. 5, p. 805-808, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.
- TELLES, A. C.; BIASE, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de ápices meristemáticos, segmentos radiculares e foliares. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 4, 2005.
- THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 618-631, 2008.
- TSAO, R.; YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 350-354, 2000.
- VALARANI, P. J.; FRIGHETTO, R. T.S.; MELO, I.S. de. Potencial da erva medicinal (*Cymbopogon citratus*) no controle de fitopatógenos do feijoeiro. **Revista de Agricultura**, v. 69, n. 2, 1994.
- VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; MATIUZZI DA COSTA, M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.
- VELTILARI, M. C. D.; QUISEN, R. Cultivo *in vitro* de espécies florestais tropicais – controle de contaminação e estabelecimento de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). In: VIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental 2012. **Anais...** Manaus: Embrapa Amazônia Oriental, p. 39-50. 2012.
- WANDERLEY, C. da S.; FARIA, R. T. de; VENTURA, M.U. Chemical fertilization, organic fertilization and pyroligneous extract in the development of seedlings of areca bamboo palm (*Dyopsis lutescens*). **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 34, n. 2, p. 163-167, 2012.
- WANG, Q.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M.; VALKONEN, J. P. T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 1, p. 280-288, 2005.
- WENDLING, I. **Propagação vegetativa**. Embrapa florestas, 2013.
- WENDLING, I. XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.187-194, 2001.
- XAVIER A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: UFV, 2009. 272p.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp multiplicadas e alongadas *in vitro*. **Scientia Forestalis**, n. 51, 1997.
- YADAV, E.; KUMAR, S.; MAHANT, S.; KHATKAR, S.; RAO, R. Tea tree oil: a promising essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, 2016.
- YADAV, U.; LAL, M.; JAISWAL, V. S. *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Syzygium cuminii* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 21, p. 87-92, 1990.
- YAGI, T.; TSUKAMOTO, S. Influence of wood vinegar on phytopathogen. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, v. 39, n.1, p. 93-98, 1991.

ZAFFARI, G. R.; KOLLER, O. L.; SOPRANO, E.; MEDEIROS, D. S.; STUKER, H. Propagação clonal de cultivares de *Citrus* sp. Pelo cultivo direto de meristemas *in vitro*. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 26, n. 1, p. 76-80, 2013.

ZANETTI, M.; CAZETTA, J. O.; MATTOS JÚNIOR, D. D., & CARVALHO, S. D. (2003). Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro 'Cravo' em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3. 2003.

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

ZANON, A. **Produção de Sementes de Erva-Mate**. Curitiba, Circular Técnica, Embrapa, 1988.