



YERBA MATE

Reseña Histórica y Estadística.
Producción e Industrialización
en el siglo XXI.



TÍTULO

YERBA MATE. Reseña Histórica y Estadística. Producción e Industrialización en el siglo XXI.

COORDINADOR Y EDITOR GENERAL

Capellari, Pablo Leandro

e-mail: pablocapellari@hotmail.com

CO-EDITOR GENERAL

Medina, Ricardo Daniel

COMITE EDITORIAL

Avico, Edgardo - Balbi, Celsa Noemí - Burgos, Ángela María - Galliano, María Cecilia - Ibarrola, Susana - Peichotto, Myriam Carolina - Vidoz, María Laura.

AUTORES

Burgos, Angela María - Cabrera, María Graciela - Capellari, Pablo Leandro - Dalurzo, Humberto Carlos - Dávalos, Marcos - Dirchwolf, Pamela - Dolce, Natalia Raquel - Fediuk, Ángel - Holowaty, Santiago Alexi - Llera, Valentín - Maiocchi, Marcos - Medina, Ricardo Daniel - Molina, Sandra Patricia - Pinto Ruiz, Gabriel - Mayol, Marcelo - Tarragó, José - Yacovich, Maricel.

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

Lic. Mariana Cecilia Rodriguez

FOTO DE TAPA Y PAG. 6

Luis Gurdiel

1ª EDICIÓN - 500 EJEMPLARES

Consejo Federal de Inversiones

San Martín 871 – (c1004aaq) - Buenos Aires – Argentina

Ministerio de Producción

San Martín 2224 – (3400) - Corrientes - Argentina

Yerba mate, reseña histórica y estadística, producción e industrialización en el siglo XXI / Pablo Leandro Capellari ... [et al.]. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Consejo Federal de Inversiones, 2017.

310 p.; 24 x 18 cm.

ISBN 978-987-510-260-6

1. Cultivo. 2. Yerba Mate. 3. Corrientes. I. Capellari, Pablo Leandro
CDD 633.77

FECHA DE CATALOGACIÓN: 12/2017

QUEDA HECHO EL DEPÓSITO QUE MARCA LA LEY 11.723

IMPRESO EN ARGENTINA - DERECHOS RESERVADOS.

No se permite la reproducción parcial o total, el almacenamiento, el alquiler, la transmisión o la transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito de los editores. Su infracción está penada por las leyes 11.723 y 25.446.



CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE ILEX

Preservar el legado para las generaciones venideras

Dolce, Natalia Raquel¹ y Medina, Ricardo Daniel²

¹ Licenciada en Zoología, Doctor de la UNNE en el Área de Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Cátedra de Fisiología Vegetal, FCA-UNNE. Investigadora Asistente, Instituto de Botánica del Nordeste (Universidad Nacional del Nordeste – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

² Ingeniero Agrónomo, Doctor de la UNNE en el Área de Recursos Naturales, FCA-UNNE. Cátedra de Cultivos III, FCA-UNNE. Investigador Asistente, Instituto de Botánica del Nordeste (Universidad Nacional del Nordeste – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

La conservación de la biodiversidad es un tema que ha venido ganando relevancia de forma progresiva en nuestra sociedad. Dentro de este enmarque, la conservación de la flora silvestre constituye una pieza clave. No sólo se trata de la obligación ética de preservar este legado que se nos ha dado para las generaciones venideras o del puro interés científico que puede aportar. La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la flora silvestre como fuente de alimentos, aceites y lubricantes, gomas, resinas, ceras, colorantes, fibra, energía, sustancias aromáticas y principios medicinales, por su valor ornamental y por su valor ecológico como indicador y elemento restaurador de situaciones ambientales degradadas (McNeely et al., 1990; Prance, 1997).

Cuando se habla de conservación de germoplasma hay que subrayar que el objetivo es conservar, con la mayor integridad posible, la variabilidad genética de las poblaciones seleccionadas. Dependiendo de la naturaleza del material vegetal se pueden adoptar diferentes estrategias de conservación, teniendo en cuenta para ello características particulares de las especies a conservar, como por ejemplo: la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción y el tamaño de sus individuos. De acuerdo con estas características se han intentado diversas alternativas, surgiendo así numerosos métodos de conservación de germoplasma. Se considera que la forma más lógica de conservar una entidad biológica es dentro del ecosistema del que forma parte (Gómez-Campo, 1985; Prance, 1997). Idealmente, por lo tanto, la conservación de los ecosistemas y, refiriéndonos al nivel de organismos, la conservación de especies silvestres o cultivadas en sus hábitats naturales (conservación in situ) constituye la manera más apropiada de enfocar la problemática de conservación (UNCED, 1992).

Descripción del problema

En Argentina se han confirmado 7 representantes nativos del género *Ilex* (Giberti, 1979; 1994a; 1998; 2008; Keller y Giberti, 2011), distribuidos en dos regiones fitogeográficas bien definidas y aisladas espacialmente: en la Provincia Fitogeográfica Paranense y en la Provincia Fitogeográfica de las Yungas (Cabrera, 1971). Habitan la Provincia Paranense, representada en Argentina por Misiones y el nordeste de Corrientes, la especie de cultivo, *I. paraguariensis* A. St. Hil. var. *paraguariensis*, lo mismo que *I. brevicauspis* Reissek (entidad absolutamente simpátrica con la anterior) y una vicariante de ambientes bien húmedos, *I. dumosa* Reissek var. *guaranina* Loes. Además, exclusivamente en Misiones, a los 3 taxones citados se les agregan *I. affinis* Gardner, *I. theezans* Mart. ex Reissek e *I. brasiliensis* Loes. En cuanto a la especie propia de la Provincia Fitogeográfica de las Yungas, *I. argentina* Lillo, su distribución coincide con los pisos altitudinales medios y altos de las pluvisilvas subtropicales montañas de Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca. Su área de dispersión natural, asimismo, se extiende al sudeste boliviano (Giberti, 1997).

La situación generalizada de crisis de la biodiversidad que hoy se vive, paradójicamente ha transformado a estas especies originariamente indeseables por su uso como adulterantes de la yerba mate genuina (Giberti, 1989), en recursos





fitogenéticos del cultivo de yerba mate (Giberti, 1999). Toda la región de producción así como de dispersión natural de esta especie está sufriendo un acelerado proceso de reemplazo de la pluvisilva subtropical por áreas de cultivos agrícolas y/o forestales, además de ser empleado por otras actividades como la ganadería. Estados brasileños originariamente con fuerte presencia forestal, como por ejemplo Paraná (superficie total 199.324 Km²), habían perdido ya hacia la década de 1990 más del 70% de su cobertura arbórea nativa (Mazuchowski, 1992). Asimismo, debemos considerar que en el N y NO del estado de Rio Grande do Sul los cultivos de soja han reemplazado casi completamente al monte nativo que hospeda a la yerba mate (Winge et al., 1995). De la misma manera, la República Argentina (con alrededor de 30 millones de hectáreas de bosque nativo) ha sufrido últimamente un importante proceso de cambio del uso de la tierra, debido principalmente al avance de la frontera agrícola. La sostenibilidad de los altos precios internacionales, en los últimos años, posibilitó la perdurabilidad e incluso la intensificación en la obtención de productos de consumo masivo a nivel internacional, como la soja, avanzando territorialmente sobre nuevas tierras antes impensadas para uso agrícola por la presencia de índices de productividad agroclimáticos bajos. Entre las provincias con mayor existencia de desmonte en los últimos 20 años se encuentran Misiones y, aunque en menor medida, Corrientes; precisamente las dos provincias en las cuales *I. paraguariensis* crece espontáneamente y es cultivada en Argentina (Montenegro, 2012). Por otra parte, es conocido que cuando la Fitotecnia tiende a mejorar una especie de cultivo, buscando las denominadas “variedades superiores”, se va restringiendo progresivamente en ellas la variabilidad natural (Prat Kricun y Belingheri, 1996).

Las especies de *Ilex* del Cono Sur son todas leñosas, la mayoría arbóreas, de crecimiento lento, escasa producción de semillas y en general de bajo poder germinativo (Fontana et al., 1990). A esto se suman las modificaciones en las condiciones originales del hábitat, que afectan cuantitativamente las poblaciones de insectos polinizadores y de aves diseminadoras de los propágulos -*Ilex* es de polinización entomófila y diseminación endozoica- (Giberti, 1994b). En consecuencia, tras una profunda alteración del ambiente (que pasa de ser una pluvisilva húmeda a una pradera o un campo de cultivo), además de una severa disminución de las poblaciones de insectos y aves benéficas, y hasta por depredación humana en yerbales naturales explotados, la demografía de estas especies de *Ilex* ha venido disminuyendo aceleradamente en las últimas décadas, quedando confinadas a los relictos del monte nativo que siguen existiendo sólo en áreas desfavorables para su aprovechamiento económico, o a las reservas naturales de la región (Giberti, 1999).

De lo expuesto anteriormente se desprende la necesidad de la creación y mantenimiento de bancos de germoplasma de yerba mate y especies afines, con el fin de preservar la variabilidad genética de las poblaciones así como para su uso en mejoramiento y en estudios básicos (tanto fisiológicos como bioquímicos).

Conservación de germoplasma de Ilex

En lo que respecta a la preservación *in situ* de especies de *Ilex*, en Argentina no existen ni catastros confiables ni encuadramientos jurídicos efectivos en los Parques Nacionales o en las Reservas Provinciales y Municipales involucrados: PN Iguazú, Parque Provincial Urugua-i, Parque de la Sierra “Ing. Agr. Raúl Martínez Crovetto” (todos en Misiones), PN Calilegua (en la provincia de Jujuy), PN Baritú, PN El Rey (ambos en la provincia de Salta), Parque Provincial Aconquija, Reserva Provincial “El Cochuna” (en la provincia de Tucumán). En todos estos parques y/o reservas naturales, la suerte de las especies del género *Ilex* está ligada con frecuencia al errático devenir de la supervivencia del resto de las comunidades vegetales nativas. Resulta recomendable entonces, como estrategia conservacionista para un recurso fitogenético como *Ilex*, el establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ* (Giberti, 1997).

Mientras está universalmente aceptado que el mecanismo más efectivo y eficiente para la conservación es la protección de los hábitats, también está reconocido que las técnicas de conservación *ex situ* constituyen componentes críticos en un programa de conservación global (Ashton, 1987; Iriando Alegría, 2001). Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación *in situ* almacenando germoplasma representativo de las poblaciones, permitiendo un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionando propágulos para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción (McNeely et al., 1990).

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie o cultivo ha evolucionado o ha sido seleccionado. Entre las ventajas de estos métodos pueden mencionarse: que permiten un control directo sobre el material a conservar, así como una fácil accesibilidad y disponibilidad de dicho material y, en general, presentan menores costos que los asociados a los métodos de conservación *in situ*. Entre las desventajas pueden citarse: el cese de la evolución o selección natural y la pérdida de variabilidad genética durante la recolección y/o multiplicación del material vegetal, lo que puede conllevar una erosión genética igual o superior a la que se producía en los hábitats naturales (Pita Villamil e Iriando Alegría, 1997).

Las características intrínsecas de estas especies han determinado que los bancos *ex situ* existentes consistan en el establecimiento de almácigos, viveros y el cultivo a campo de las muestras preservadas. Es conocido lo oneroso que todo ello resulta, pero ha sido la primera alternativa posible luego de la recolección de las semillas, ya que la preservación del poder germinativo de las semillas durante largos períodos, en condiciones ambientales controladas, no era posible hasta recientemente, y el cultivo *in vitro* de estas especies, en ocasiones muy dificultoso, se encuentra asimismo en etapa experimental (Giberti, 1999; Luna, 2010; Dolce, 2012).





Figura 1: Colección a campo de especies del género *Ilex* implantadas en predios de la EEA INTA Cerro Azul, Misiones. A) *I. theezans*, B) *I. integerrima*, C) *I. dumosa* y D) *I. brevicuspis*. En el plano central de la Figura 1 A se observa al Ing. Agr. Luis Darío Belingheri, a quien los autores agradecen su sostenido interés por la implantación y mantenimiento de la colección de plantas de yerba mate y especies co-genéricas, así como por su eficiente colaboración en la recolección y envío de frutos de las diferentes especies para nuestro trabajo en el laboratorio.

En Argentina, las colecciones vivas de especies del género *Ilex* (producto de una veintena de expediciones) están implantadas en predios de la EEA Cerro Azul (Leandro N. Alem) y en el Campo Anexo Cuartel del Río Victoria (San Vicente), ambas instalaciones del INTA en la provincia de Misiones (Fig. 1). Existen alrededor de 150 muestras poblacionales incorporadas al Banco. Sin duda, esto resulta en pérdida de variabilidad natural por lo reducido del tamaño de las muestras y el probable aumento de la endogamia en la descendencia de la colección viva (Winge et al., 1995).

Conservación de semillas de *Ilex*

En general, los bancos de semillas constituyen uno de los métodos más convenientes para la conservación de germoplasma *ex situ*, porque permiten almacenar una gran variabilidad genética en forma económica y práctica; dado que las semillas, normalmente, son de pequeño tamaño y permiten la fácil regeneración de la planta (Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997). Para el género *Ilex*, el alto nivel de dormancia, la inmadurez y el pequeño tamaño del embrión de estas especies han ido en contra del conocimiento acerca de las características de almacenamiento de sus semillas. Las mismas son colectadas con altos contenidos de agua, una característica frecuentemente asociada con un comportamiento recalcitrante. Sin embargo, hasta recientemente (Dolce, 2012; Dolce et al., 2017) no se conocían los niveles a los cuales las semillas de *Ilex* toleran la desecación y bajas temperaturas de almacenamiento.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) y el Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET) se viene trabajando desde hace varios años en la conservación *ex situ* de germoplasma de especies del género *Ilex*. Los resultados obtenidos en los estudios sobre tolerancia a la desecación y al congelamiento así como de longevidad de las semillas de *Ilex dumosa*, *I. paraguariensis* e *I. pseudoboxus* sugieren que las mismas presentan un comportamiento intermedio entre las semillas ortodoxas y recalcitrantes, ya que si bien toleran la desecación a niveles similares a los de las semillas ortodoxas, su viabilidad desciende rápidamente (menos de seis meses) durante el almacenamiento. Asimismo, se observó que la mayor longevidad se obtuvo cuando se almacenaron a 4 °C frutos intactos contenidos en bolsas de polietileno cerradas, condición en la cual las semillas mantuvieron un contenido de agua elevado durante todo el período de almacenamiento (de al menos un año) (Dolce, 2012).

Para la conservación a largo plazo de las semillas de estas especies de *Ilex*, lo cual es conveniente para el establecimiento de un banco de germoplasma, la única opción viable sería la crioconservación. En esta metodología se procuran temperaturas inferiores a -130 °C para alcanzar condiciones de ausencia de agua en estado líquido, baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, logrando así que las reacciones químicas se encuentren prácticamente paralizadas (Pritchard, 1995). Bajo estas condiciones, se logra la detención de la mayoría de los procesos metabólicos y con ello el bloqueo de los mecanismos fisiológicos responsables del envejecimiento,



postulándose longevidades extremadamente largas y sólo limitadas por la acumulación de lesiones genéticas producto de la radiación de fondo (Iriondo Alegría, 2001). Las técnicas de crioconservación utilizan normalmente nitrógeno líquido (NL), lo que asegura una temperatura constante de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, de esta manera, la prolongación indefinida del período de conservación (Bonner, 1990; Pritchard, 1995; Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997).

Las técnicas de crioconservación ofrecen además otras ventajas en relación a las técnicas tradicionales de conservación a largo plazo, como ser: los bajos costos de mantenimiento, el espacio físico reducido, la fácil manipulación de las muestras, la ausencia de controles de temperatura y humedad durante el almacenamiento, la inexistencia de daños por parásitos y patógenos y la no dependencia del suministro eléctrico (Stanwood, 1985; Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997; Engelmann, 2000). Esto último hace que la crioconservación sea una alternativa interesante para muchos países en desarrollo, puesto que la disponibilidad de NL está asegurada en la mayoría de los lugares del mundo (Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997). No obstante, la crioconservación presenta una serie de problemas derivados, principalmente, de la humedad inicial de la muestra y de las alteraciones que sufre el material en los procesos de enfriamiento/calentamiento. Ambos factores deben ser detalladamente evaluados antes de decidir si es adecuada la utilización de la crioconservación para un determinado tipo de semillas (Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997).

Recientemente, el grupo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) y el Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET) ha realizado estudios evaluando la posibilidad de crioconservar semillas de siete especies sudamericanas de *Ilex* (*I. brasiliensis*, *I. brevicuspis*, *I. dumosa*, *I. integerrima*, *I. paraguariensis*, *I. pseudoboxus* e *I. theezans*), utilizando la técnica de Desección (Dolce et al., 2017). Siguiendo la metodología desarrollada, se obtuvo un porcentaje elevado de supervivencia y regeneración de plantas de las siete especies de *Ilex* evaluadas luego del cultivo *in vitro* de las semillas crioconservadas. Sin embargo, se observa una clara variación interespecífica en la tasa de deshidratación de las semillas y diferentes rangos de contenidos de agua óptimos para lograr la máxima supervivencia. En todas las especies, una vez que se optimizó el contenido de agua de las muestras, la crioconservación no afectó negativamente la germinación de las semillas. Por el contrario, en *I. brasiliensis* e *I. theezans* la exposición de las semillas al NL incrementó levemente el poder germinativo respecto a los controles de desecación. Este trabajo constituye la primera evidencia de crioconservación de semillas intactas de especies de *Ilex* y ofrece una valiosa alternativa para la conservación a largo plazo de germoplasma de estas especies como un complemento al mantenimiento de colecciones de plantas a campo.

Conservación in vitro de germoplasma de Ilex

Entre los métodos alternativos a la conservación de semillas, la conservación *in vitro* de germoplasma (bajo condiciones de crecimiento mínimo o a la temperatura ultrabaja del NL) se presenta como una valiosa alternativa. Con relación a la conservación de germoplasma bajo condiciones de crecimiento reducido, no se reportan antecedentes bibliográficos que informen el uso de estas técnicas para el establecimiento de bancos *in vitro* de germoplasma de especies del género *Ilex*. Por otra parte, unos pocos trabajos informan acerca de la criopreservación de germoplasma de estas especies. Tal es el caso de la conservación de frutos (Mroginski *et al.*, 2006) y embriones cigóticos inmaduros (Mroginski *et al.*, 2008) utilizando las técnicas de vitrificación y de encapsulación-deshidratación, respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos son preliminares y en algunos casos los porcentajes de supervivencia son muy bajos o nulos; quedando aún muchos interrogantes por dilucidar.

Finalmente, en un intento por establecer sistemas que posibiliten la criopreservación de germoplasma clonal, el grupo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) y el Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET) llevó a cabo estudios con ápices caulinares de *Ilex dumosa* e *I. paraguariensis* aplicando las técnicas de vitrificación y encapsulación-deshidratación. Sin embargo, no fue posible obtener supervivencia luego de la exposición de los ápices al NL a partir de las técnicas de criopreservación ensayadas. Queda aún mucho por estudiar tanto acerca de las metodologías de cultivo *in vitro* de órganos vegetativos, con el objeto de determinar el sistema más adecuado para la regeneración de plantas a partir de diferentes explantes; como en lo referente al desarrollo de una metodología de criopreservación que posibilite la conservación a largo plazo de germoplasma proveniente de individuos selectos de especies del género *Ilex*, como un suplemento de las colecciones de plantas a campo.



BIBLIOGRAFÍA:

- 
- Ashton, P.S. 1987. Biological considerations in *in-situ* versus *ex-situ* plant conservation. En: Bramwell D.; Hamann O.; Heywood V.H.; Syngé H. (eds.), Botanic Gardens and the World Conservation Strategy. Academic Press, London. pp. 117-130.
- Bonner, F.T. 1990. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. Forest Ecology and Management 35: 35-43.
- Cabrera, A.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 14: 1-42.
- Dolce, N.R. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de especies del género *Ilex* L. (Aquifoliaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- Dolce, N.R.; Medina, R.D.; González Arnao, M.T. & Mroginski, L.A. 2017. Tolerance to desiccation and cryopreservation of *Ilex* seeds from seven South American species. (Manuscrito enviado para su publicación en HortScience).
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Engelmann, F. & Takagi, H. (eds.), Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application. IPGRI, JIRCAS International Agriculture Series N° 8, Roma. pp. 8-20.
- Fontana, H.P.; Prat Krikum, S.D.; Belingheri, L.D. 1990. Estudios sobre la germinación y conservación de semillas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Informe Técnico EEA INTA Cerro Azul (Misiones, Argentina). 52: 1-12.
- Giberti, G.C. 1979. Las especies argentinas del género *Ilex* (Aquifoliaceae). Darwiniana 22: 217-240.
- Giberti, G.C. 1989. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteración. Dominguezia 7:3-21.
- Giberti, G.C. 1994 a. Aquifoliaceae. En: Hunziker, A.T. & Anton, A.M. (eds.), Flora Fanerogámica Argentina. Programa Pro-Flora (CONICET). Buenos Aires, Argentina. pp. 1-7.
- Giberti, G.C. 1994 b. Maté (*Ilex paraguariensis*). En: Hernández Bermejo J.E. y León J. (eds.), Neglected Crops. 1492 from a Different Perspective. FAO Plant Production and Protection Series N° 26. FAO, Roma. p. 245-252.
- Giberti, G.C. 1997. Conservación genética de *Ilex* spp. en Argentina. En: Winge H. (ed.), I Congreso Sul-Americano da Erva-Mate. II Reunião Técnica do Cone Sul Sobre a Cultura da Erva-Mate. EMBRAPA, Curitiba, Brasil. p. 227-242.
- Giberti, G.C. 1998. Hallazgo de *Ilex brasiliensis* (Aquifoliaceae) en la Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 33: 137-140.
- Giberti, G.C. 1999. Recursos fitogenéticos relacionados con el cultivo y explotación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliáceas) en el Cono Sur de América. Acta Horticulturae 500: 137-144.
- Giberti, G.C. 2008. Aquifoliaceae. En: Zuloaga, F.O., Morrone O. & Belgrano M.J. (eds.), Catálogo de las Plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), Vol. 2, Dicotyledoneae: Acanthaceae - Fabaceae (Abarema - Schizolobium). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard, 107, pp. 1143-1146.
- Gómez-Campo, C. 1985. The conservation of Mediterranean plants: Principles and problems. En:

Gómez-Campo, C. (ed.). Plant Conservation in the Mediterranean Area. Geobotany 7. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, p. 3-8.

-Iriondo Alegría, J.M. 2001. Investigación agraria. Producción y Protección Vegetales 16: 5-24.

-Keller, H.A. & Giberti, G.C. 2011. Primer registro para la flora argentina de *Ilex affinis* (Aquifoliaceae), sustituto de la “yerba mate”. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 46(1-2): 187-194.

-Luna, C.V. 2010. Automatización de la micropropagación de *Ilex paraguariensis* e *I. dumosa*: estudio del intercambio gaseoso, estado hídrico y fotosíntesis durante las etapas de aclimatación y post-aclimatación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.

-Mazuchowski, J.Z. 1992. Comunicación oral ante la Primeira Reuniao Técnica do Cone Sul sobre a cultura da Erva-Mate. Porto Alegre, Brasil.

-McNeely, J.A.; Miller, K.R.; Reid, W.V.; Mittermeier, R.A.; Werner, T.B. 1990. Conserving the world biology diversity. IUCN, WRI, CI, WWF-US, the World Bank, Gland, Suiza. 193 p.

-Montenegro, C. (coord.). 2012. Monitoreo de la superficie de bosque nativo de la República Argentina, período 2006-2011. Regiones Forestales Parque Chaqueño, Selva Misionera y Selva Tucumano Boliviana. Dirección de Bosques, Subsecretaría de Ambiente Y Desarrollo Sustentable de la Nación. Buenos Aires, Argentina. 60 p.

-Mroginski, L.A.; Sansberro, P.A.; Scocchi, A.M.; Luna, C.V.; Rey, H.Y. 2006. Effect of fruit cryopreservation on *in vitro* germination of zygotic embryos of several species of *Ilex*. Acta Horticulturae 725: 417-419.

-Mroginski, L.A.; Sansberro, P.A.; Scocchi, A.M.; Luna, C.V.; Rey, H.Y. 2008. A cryopreservation protocol for immature zygotic embryos of species of *Ilex* (Aquifoliaceae). Biocell 32: 33-39.

-Pita Villamil, J.M. e Iriondo Alegría, J.M. 1997. Conservación de recursos fitogenéticos. Agricultura 783: 800-803.

-Pita Villamil, J.M. y Pérez Ruiz, C. 1997. Crioconservación de semillas. Agricultura 775: 123-125.

-Prance, G.T. 1997. The conservation of botanical diversity. En: Maxted N.; Ford-Lloyd B.V.; Hawkes J.G. (eds.). Plant Genetic Conservation. The In Situ Approach. Chapman & Hall, London. p. 3-14.

-Prat Kricun, S.D. & Belingheri, L.D. 1996. Recolección de Germoplasma: 23-28. En: Mayol, R.M. y Belingheri, L.D. (eds.), III Curso de Capacitación en Producción de Yerba Mate. Resúmenes. EEA Cerro Azul, Centro Regional Misiones, INTA, Misiones, Argentina: VIII+239 p.

-Pritchard, H.W. 1995. Cryopreservation of seeds. En: Day J.G. & McLellan M.R. (eds.). Methods in Molecular Biology, Vol. 38. Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 133-144.

-Stanwood, P.C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. En: Kartha K.K. (ed.). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Boca Ratón, Florida, p. 199-236.

-UNCED, 1992. Convention on Biological Diversity. United Nations Conference on Environment and Development, Ginebra.

-Winge, H.; Wollheim, C.; Caballi-Molina, S.; Assmann, E.M.; Langebassani, K.L.; Basso Amaral, M.; Ceni Coelho, G.; de O. Freitas-Sacchet, A.M.; Butzke, A.; Valduga, A.T.; de Araujo Mariath, J.E. 1995. Variabilidade genética em populações nativas de Erva-Mate e a implantação de Bancos de Germoplasma. En: Winge, H.; Ferreira, A.G.; de Araujo Mariath, J.E.; Tarasconi, L.C. (eds.). Erva-Mate: Biologia e Cultura no Cono Sul. UFRGS, Porto Alegre, Brasil, p. 323-345.