

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Ilex
paraguariensis* A. Saint Hilaire (ERVA-MATE)**

TESE DE DOUTORADO

Kenia Michele de Quadros

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Ilex*
paraguariensis A. Saint Hilaire (ERVA-MATE)**

Kenia Michele de Quadros

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Engenharia Florestal.**

Orientador: Dilson Antônio Bisognin

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Tese de Doutorado

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Ilex paraguariensis* A.
Saint Hilaire (ERVA-MATE)**

elaborada por
Kenia Michele de Quadros

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dilson Antônio Bisognin, PhD.
(Presidente/Orientador)

Maristela Machado Araújo, Dr^a. (UFSM)

Juçara Terezinha Paranhos, Dr^a. (UFSM)

Luciane Almeri Tabaldi, Dr^a. (UFSM)

Cibele Rosa Gracioli, Dr^a (UNIPAMPA)

Santa Maria, 02 de agosto de 2013

Á minha mãe Jenny, que me ensinou a persistir nos meus sonhos

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela força para alcançar mais essa grande conquista.

À UFSM pela oportunidade da Graduação, Mestrado e Doutorado, ou seja, de fazer parte da minha vida e me tornar uma cidadã do Mundo.

À minha mãe Jenny de Quadros, a quem me espelho e a quem devo tudo o que tenho.

Ao meu marido Liugi Filipetto Tronco, pela paciência, carinho e dedicação e total apoio em todos os momentos.

À minha família pelo incentivo incondicional e compreensão de que, nem sempre eu poderia estar junto a eles por estar correndo atrás dos meus desejos.

Ao professor Dilson Antônio Bisognin, pela orientação e valiosos ensinamentos, e pela confiança depositada em mim durante todos esses anos.

Ao professor coorientador Frederico Dimas Fleig, pela constante contribuição e total disponibilidade para auxílio no trabalho realizado.

À professora coorientadora Maristela Machado Araújo pela amizade e por estar sempre disposta a colaborar nos trabalhos.

Aos meus colegas do Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas, pelo maravilhoso convívio e trocas de conhecimentos.

À Cerlene Machado –Tita, por todo auxílio, pela amizade e pelas sábias palavras no momento certo.

À CAPES pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire (ERVA-MATE)

AUTORA: KENIA MICHELE DE QUADROS

ORIENTADOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de agosto de 2013

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) exerce uma grande importância econômica, social e ecológica em toda a região sul do Brasil, no entanto, ainda necessita de protocolos eficientes para a propagação vegetativa de mudas visando o plantio de povoamentos com clones selecionados. Esse trabalho teve como objetivo estudar tecnologias de propagação vegetativa voltado à produção massal de mudas de erva-mate por meio da micropropagação *in vitro*, microestquia e miniestquia. Foi avaliada a propagação de explantes oriundos de segmentos apicais e segmentos nodais de erva-mate de oito clones estabelecidos *in vitro* e em quatro cultivos. Também foi avaliada a aclimatização e o enraizamento *ex vitro* de microestacas, testando diferentes substratos, separados em dois experimentos. No experimento um, os substratos foram utilizados puros (casca de arroz carbonizada, areia grossa, vermiculita média, fibra de coco e substrato comercial à base de casca de pinus) e no segundo experimento, os substratos foram utilizados em combinações e em iguais proporções (casca de arroz carbonizada e areia grossa; casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial à base de casca de pinus; casca de arroz carbonizada e substrato comercial a base de casca de pinus). Miniestacas de erva-mate de duas coletas e de quatro clones (CE1, CE2, EF6 e EF7) foram tratadas com e sem ácido 3-indolibutírico (AIB) na dose de 1.000 mg L⁻¹ e então colocadas em substrato composto por casca de arroz carbonizada, areia de granulometria grossa e substrato comercial a base de casca de pinus. Os clones CE1 e CE2 foram provenientes de microestacas enraizadas *ex vitro* e aclimatizadas em casa de vegetação, e os clones EF6 e EF7 foram oriundos de estacas enraizadas de brotações epicórmicas de duas matrizes adultas. A partir da segunda coleta, foi acompanhada a evolução do enraizamento dos quatro clones em avaliação aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias. É possível a manutenção de banco de germoplasma de erva-mate, sendo que plantas completas oriundas de segmentos nodais e segmentos apicais enraizados *in vitro*, podem ser aclimatizados em casa de vegetação para a produção de mudas de erva-mate, com a competência dos explantes

mantida ao longo de quatro cultivos. Microestacas de erva-mate podem ser aclimatizadas e enraizadas *ex vitro*, utilizando como substrato a composição de mesmas proporções de casca de arroz carbonizada e substrato comercial à base de casca de pinus ou com o substrato de casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial a base de casca de pinus. Na miniestaquia de erva-mate, os clones diferem na competência ao enraizamento e no período de indução à iniciação radicial, sendo que a aplicação de ácido 3-indolibutírico na dose de 1.000 mg L⁻¹ não afeta o enraizamento de miniestacas de erva-mate. O sistema fechado de cultivo em areia é viável para a condução e o manejo de minicepas de erva-mate visando a coleta de miniestacas.

Palavras-chave: Micropropagação. Microestaquia. Miniestaquia. Enraizamento.

ABSTRACT

Doctor Thesis
Graduate Program of Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

IN VITRO AND EX VITRO MULTIPLICATION OF *Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire (HOLLY)

AUTHOR: KENIA MICHELE DE QUADROS

ADVISOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, August 02th, 2013

Holly (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) plays an important economic, social and ecological throughout southern of Brazil; however, still requires efficient protocols for vegetative propagation of seedlings aiming planting of selected genotypes. This work aimed to study vegetative propagation technologies turned at mass production of holly seedlings through *in vitro* micropropagation, microcutting and minicutting. The propagation of explants derived from the apical and nodal holly segments from eight clones established *in vitro* was evaluated in four cultivations. It was also evaluated acclimatization and *ex vitro* rooting of microcuttings, testing different substrates, separated in two experiments. In experiment one, the substrates were used pure (carbonized rice husk, coarse sand, vermiculite, coconut fiber and commercial substrate of pine bark) and in the second experiment, the substrates were used in combination with equal proportions (carbonized rice husk and coarse sand; carbonized rice husk, coarse sand and commercial substrate of pine bark; carbonized rice husk and commercial substrate of pine bark). Holly minicuttings of two collections and four clones (CE1, CE2, EF6 and EF7) were treated with or without 3-indolibutírico acid (IBA) at a dose of 1.000 mg L⁻¹ and then placed in a substrate composed by carbonized rice husk, coarse sand and commercial substrate of pine bark. Clones CE1 and CE2 coming from microcuttings *ex vitro* rooted and acclimatized in the greenhouse, and the clones and EF6 EF7 come from cuttings rooted of epicormic shoots of two adult plants. From the second collection, it was followed the rooting evolution of four clones under evaluation at 15, 30, 45, 60 and 75 days. It is feasible the maintenance of holly germplasm bank, whereas complete plants derived from nodal segments and apical segments rooted *in vitro*, can be acclimated in a greenhouse for holly seedlings production, with the explants competence maintained over four cultivations. Holly microcuttings can be acclimated and *ex vitro* rooted, using as substrate the composition of the same proportions of carbonized rice husk and commercial substrate of pine bark or with carbonized rice husk, coarse sand and commercial substrate of pine bark. In holly minicutting, clones differ in rooting competence and induction period for root initiation, whereas the

application of 3-indolibutiric acid does not affect the rooting of holly minicuttings. The closed system of cultivation in sand is feasible for conduct and management of holly ministumps aiming to collect the minicuttings.

Keywords: Micropropagation. Microcutting. Minicutting. Rooting.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Flores de erva-mate: à esquerda - flores femininas (flores pistiladas); à direita – flores masculinas (flores estaminadas). Fonte: QUADROS, K. M., Santa Maria, RS, 2013..... 23

FIGURA 2 – Locais de ocorrência natural da erva-mate no Brasil. Fonte: CARVALHO (2006)..... 25

CAPÍTULO I

FIGURA 1 – Erva-mate cultivada *in vitro*; A – Brotações oriundas de embriões zigóticos para coleta de explantes e início do primeiro cultivo; B – Coleta de brotações assépticas para o primeiro cultivo, contendo o segmento apical e o sucessivo segmento nodal; C – Brotação seccionada em segmento apical e nodal para posterior cultivo e enraizamento *in vitro*; D – Nova planta obtida por cultivo de segmento apical, que fornece explantes para novo cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 52

FIGURA 2 – Aclimatização em casa de vegetação de plantas de erva-mate oriundas de segmentos nodais e segmentos apicais, enraizados *in vitro* do quarto cultivo: A – Aspecto geral das plantas *in vitro*, com parte aérea e sistema radicial, antes da aclimatização; B – Plantas individualizadas colocadas em substratos para a aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 55

CAPÍTULO II

FIGURA 1 – Microestacas de erva-mate: A – Vista geral das microestacas de erva-mate enraizadas *ex vitro*, em casa de vegetação em câmara úmida, utilizando diferentes composições de substratos. B – Detalhe das raízes adventícias em microestacas de erva-mate, em avaliação aos 60 dias. C – Detalhe da microestaca plantada em copos plásticos drenados contendo substrato em composição e dispostos em casa de vegetação. D – Microestaca de erva-mate, com sistema radicial e parte aérea após 60 dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 72

CAPÍTULO III

FIGURA 1 – Desenho mostrando organização dos estratos do minijardim clonal, instalado em bandeja de polietileno, em sistema fechado de cultivo em areia e com fertirrigação sob inundação, utilizado para a manutenção e condução de minicepas de erva-mate, adaptado de Bandinelli (2009)..... 82

- FIGURA 2 – Instalação do minijardim clonal de erva-mate em bandeja de polietileno: A – Instalação do sistema fechado de cultivo em areia, sobre bancada da casa de vegetação; B – Instalação das mudas no sistema de cultivo sem solo; C – poda de formação das plantas; D – emissão das brotações após poda de formação; E – miniestaca enraizada em câmara úmida. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 83
- FIGURA 3 – Evolução da porcentagem de enraizamento de miniestacas de quatro clones de erva-mate (CE1, CE2, EF6 e EF7), tratadas com ou sem AIB (1000 ml L⁻¹) ao longo de cinco avaliações (15, 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 88
- FIGURA 4 – Miniestacas de erva-mate: A – brotações das minicepas para posterior coleta e secção em miniestacas; B – miniestacas plantadas em copos plásticos drenados e dispostas em câmara úmida C, D, E – detalhe da formação de calo e raiz na base das miniestacas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- TABELA 1 – Valores de probabilidade do teste F ($P < 0,5$), média e coeficiente de variação (CV%) para as porcentagens de sobrevivência, enraizamento, emissão de folhas e número de segmentos nodais por explantes de erva-mate oriundos de segmentos apicais e nodais e em quatro cultivos sequentes *in vitro* aos 30 dias. Santa Maria, UFSM, 2013..... 54
- TABELA 2 – Porcentagem de enraizamento de explantes de erva-mate em quatro cultivos *in vitro* (primeiro, segundo, terceiro e quarto), avaliados aos 30 dias. Santa Maria, UFSM, 2013..... 54
- TABELA 3 – Número de folhas e número e comprimento de raízes de plantas oriundas de segmentos nodais e apicais enraizados *in vitro* e aclimatizados por 30 dias em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 55

CAPÍTULO II

- TABELA 1 – Análise físico-química de substratos utilizados puros e em composição, no enraizamento *ex vitro* de microestacas de erva-mate em casa de vegetação 65
- TABELA 2 – Avaliação das microestacas de erva-mate cultivadas *ex vitro* em casa de vegetação em diferentes substratos utilizados puros, após 30 e 60 dias do plantio. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 67
- TABELA 3 – Avaliação de microestacas de erva-mate cultivadas *ex vitro* em casa de vegetação após 30 e 60 dias do plantio, utilizando diferentes composições de substratos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 69

CAPÍTULO III

- TABELA 1 – Valores do F calculado, média geral e coeficiente de variação para a sobrevivência, miniestacas inalteradas, emissão de calo e broto e enraizamento em miniestacas de erva-mate em avaliação aos 30 e 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2013..... 85
- TABELA 2 – Porcentagem de sobrevivência, miniestacas inalteradas, formação de calo e broto e enraizamento em miniestacas de erva-mate oriundas de quatro clones (CE1, CE2, EF6 e EF7) e avaliadas 30 e 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2013..... 86

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência, enraizamento, emissão de folhas e número de segmentos nodais de plantas de erva-mate em função da origem do explante (segmentos apicais e nodais), avaliado aos 30 dias.....	95
APÊNDICE 2 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência, enraizamento, emissão de folhas e número de segmentos nodais de plantas de erva-mate em função de quatro cultivos, avaliado aos 30 dias.....	95
APÊNDICE 3 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de calo, de microestacas inalteradas, de mortalidade e de enraizamento de microestacas de erva-mate em diferentes substratos utilizados puros, em câmara úmida, avaliado aos 30 dias.....	96
APÊNDICE 4 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de mortalidade, de enraizamento e de comprimento da maior raiz de microestacas de erva-mate em diferentes substratos utilizados puros, em câmara úmida, avaliado aos 60 dias.....	96
APÊNDICE 5 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de calo, de enraizamento e de mortalidade de microestacas de erva-mate em diferentes composições de substratos, em câmara úmida, avaliado aos 30 dias.....	97
APÊNDICE 6 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de enraizamento, de mortalidade e de comprimento da maior raiz de microestacas de erva-mate em diferentes composições de substratos, avaliado aos 60 dias.....	97
APÊNDICE 7 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 30 dias.....	97
APÊNDICE 8 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de miniestacas de erva-mate inalteradas, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 30 dias.....	98
APÊNDICE 9 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de calo e broto em miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 30 dias.....	98

APÊNDICE 10 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de miniestacas de erva-mate em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.....	98
APÊNDICE 11 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de miniestacas de erva-mate inalteradas, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.....	98
APÊNDICE 12 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de calo e broto em miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.....	99
APÊNDICE 13 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento em miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.....	99

LISTA DE QUADROS

QUADRO A – Nomes populares da erva-mate nos estados brasileiros onde a espécie ocorre, com o respectivo período de floração e frutificação. Fonte: CARVALHO (2006).....	22
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 Descrição da espécie.....	22
3.2 Aspectos ecológicos e silviculturais.....	24
3.3 Propagação por semente.....	26
3.4 Propagação vegetativa.....	26
3.4.1 Estaquia.....	27
3.4.2 Miniestaquia.....	28
3.4.3 Micropropagação.....	30
3.4.4 Microestaquia.....	32
3.4.5 Fatores que influenciam o enraizamento.....	33
3.4.6 Técnicas de rejuvenescimento.....	36
3.4.7 Formação de jardim clonal.....	37
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
5 CAPITULO I	
COMPORTAMENTO DE CLONES DE ERVA-MATE EM QUATRO CULTIVOS <i>IN VITRO</i>.....	48
Resumo.....	48
5.1 Introdução.....	50
5.2 Material e Métodos.....	51
5.3 Resultados.....	53
5.4 Discussão.....	56

5.5 Conclusões.....	58
5.6 Referências Bibliográficas.....	58
6 CAPÍTULO II	
ACLIMATIZAÇÃO E ENRAIZAMENTO <i>EX VITRO</i> DE MICROESTACAS DE ERVA-MATE.....	61
Resumo.....	61
6.1 Introdução.....	63
6.2 Material e Métodos.....	64
6.2.1 Experimento 1.....	65
6.2.2 Experimento 2.....	65
6.2.3 Avaliações.....	65
6.3 Resultados e Discussão.....	66
6.3.1 Experimento 1.....	66
6.3.2 Experimento 2.....	68
6.4 Conclusões.....	72
6.5 Referências Bibliográficas.....	73
7 CAPÍTULO III	
PROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE POR MINIESTAQUIA.....	77
Resumo.....	77
7.1 Introdução.....	80
7.2 Material e Métodos.....	81
7.3 Resultados e Discussão.....	85
7.4 Conclusões.....	91
7.5 Referências Bibliográficas.....	91
8 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
9 APÊNDICES.....	95

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) ocorre naturalmente no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Nestes países, a espécie é tradicionalmente cultivada, fazendo parte dos hábitos culturais e representa uma importante fonte de renda para as regiões. Além do tradicional uso da erva-mate no chimarrão e chá, o uso desta espécie tem se expandido para a indústria de bebidas, fármacos e cosméticos. Com tal ampliação, torna-se necessário o aumento na qualidade dos produtos ofertados, o que se inicia pela seleção de mudas para implantação de novos povoamentos.

A propagação seminal de erva-mate apresenta dificuldades para o estabelecimento de mudas, devido à dormência tegumentar e embrionária das sementes, a reduzida capacidade germinativa (de 5 a 20%), aliado à variabilidade genética em virtude à dioiccia da espécie, o que dificulta o controle da qualidade genética e fisiológica das mudas produzidas por sementes. Todos estes obstáculos acarretam plantios desuniformes e de baixa qualidade genética. Estes entraves podem ser resolvidos com a implantação de mudas propagadas vegetativamente, utilizando indivíduos geneticamente selecionados, o que resulta em povoamentos mais uniformes.

Por meio da propagação vegetativa ou clonagem, é possível resgatar material adulto de matrizes selecionadas e produzir grande quantidade de plantas geneticamente idênticas, a partir de poucos indivíduos selecionados em função de algumas características desejáveis. A clonagem tem sido objeto de inúmeras pesquisas, entretanto ainda não existem protocolos suficientes desenvolvidos que possam ser aplicados em nível comercial para a maioria das espécies nativas, como a erva-mate, necessitando maiores pesquisas sobre as técnicas utilizadas para a propagação vegetativa de plantas, o tipo de material propagativo e os fatores que afetam o enraizamento adventício.

Dentre as técnicas de clonagem, a estaquia, a miniestaquia, a microestaquia e a micropropagação apresentam grande potencial para a produção massal de mudas. A miniestaquia apresenta vantagens quando comparada à estaquia convencional, principalmente devido à produção contínua de mudas em reduzida área de minijardim clonal, maior velocidade e percentual de enraizamento de miniestacas e qualidade do sistema radicial, além da necessidade de menor tempo de formação de mudas em casa de vegetação. Na microestaquia, também há a produção contínua de mudas em reduzida área, no entanto, as

mudas para a formação do microjardim clonal são oriundas da micropropagação, enquanto as mudas para a formação do minijardim são oriundas da estaquia ou da propagação sexuada. A micropropagação de erva-mate pode ser realizada utilizando embriões zigóticos como fonte de explantes, em razão da sua natureza juvenil, que confere alta capacidade de enraizamento aos propágulos. A escolha do método utilizado irá depender principalmente da espécie, da competência do executor, da quantidade do material e estrutura disponível, sendo possível propagar grande número de indivíduos selecionados num curto espaço de tempo.

Dentre os fatores que afetam o enraizamento adventício de propágulos vegetativos está a espécie, o substrato utilizado, o tipo de propágulo utilizado, os fitorreguladores e as condições da planta doadora dos propágulos, sendo que o sucesso da produção de mudas por clonagem está diretamente dependente desses fatores que afetam a formação de raízes adventícias.

Diante do exposto, é necessário o estudo de tecnologias para a propagação clonal de plantas selecionadas, com maiores estudos sobre as técnicas utilizadas para a produção de mudas, tanto *in vitro*, quanto *ex vitro*, e aprofundamento sobre os fatores que afetam o enraizamento de propágulos vegetativos, visando à produção massal de mudas de erva-mate de alta qualidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho objetivou estudar tecnologias de propagação vegetativa *in vitro* e *ex vitro*, visando à produção massal de mudas de *Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire.

2.2 Específicos

- Avaliar o comportamento de clones de erva-mate em quatro sequentes cultivos *in vitro*, a fim de maximizar a taxa de multiplicação e viabilizar a manutenção em banco de germoplasma;
- Comparar o desempenho de explantes de erva-mate oriundos de segmentos nodais e apicais no enraizamento *in vitro* e posterior aclimatização em casa de vegetação;
- Avaliar a aclimatização e o enraizamento *ex vitro* de microestacas de erva-mate em diferentes substratos;
- Determinar a viabilidade técnica do minijardim clonal para a condução e manutenção de minicepas e coletas de miniestacas de erva-mate;
- Avaliar a propagação de clones de erva-mate e a necessidade de uso de ácido 3-indolibutírico para o enraizamento das miniestacas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Descrição da espécie

Das cerca de 90 das espécies do gênero *Ilex* que ocorrem no Brasil, apenas 8 espécies são encontradas no Rio Grande do Sul (GROPPO, 2013), e a espécie mais utilizada para a produção de erva-mate é a *Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire, sendo o objeto da maioria das pesquisas (POLETTI, 2010). De acordo com o sistema de classificação Angiosperm Phylogeny Group (APG III, 2009), a espécie *I. paraguariensis* obedece à seguinte classificação: Grupo Angiospermae, Clado Campanulide, Ordem Aquifoliales e Família Aquifoliaceae. A espécie possui diversos nomes comuns além de erva-mate, que dependem da sua região de ocorrência (Quadro A).

Quadro A – Nomes populares da erva-mate nos estados brasileiros onde a espécie ocorre, com o respectivo período de floração e frutificação. Fonte: CARVALHO (2006).

Nomes vulgares	Localização	Floração	Frutificação
Caá; caáguasçu; carvalho-branco; caúna	São Paulo	novembro	março
Congoín; congonha; erva-congonha; erveira; pau-de-erva	Rio Grande do Sul	setembro a outubro	dezembro a abril
Congonha-grande; congoneira; congonhinha	Paraná	setembro a novembro	janeiro a abril
Erva; erva-piriquita	Santa Catarina	setembro a dezembro	dezembro a março

A altura da planta cultivada varia de 3 a 5 m e, em condições naturais, podendo alcançar 25 m de altura na idade adulta e 70 cm de Diâmetro à Altura do Peito (DAP) (CARVALHO, 1994). No sistema atual de condução, com o adensamento das plantas e as podas constantes, a altura média não ultrapassa 2 m (CANSIAN, 2003). O tronco da planta é cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, com fuste geralmente curto. A ramificação é racemosa, com copa baixa e densifoliada. Os ramos são cilíndricos ou subcilíndricos cinzentos e os ramos terminais são densamente lenticelados (CANSIAN, 2003). A casca externa do tronco é de cor cinza-clara a acastanhada, persistente, áspera e rugosa, com muitas lenticelas e cicatrizes transversais. A casca interna do tronco apresenta textura arenosa, com rápido escurecimento após o corte (CARVALHO, 2006).

As folhas são simples, alternas, subcoriáceas, glabras, verde-escuras na superfície adaxial e mais claras na superfície abaxial, com limbo foliar obovado e ápice obtuso, de margem irregularmente serrilhada (CARVALHO, 2006). A erva-mate apresenta flores brancas e pequenas, díclinas e com um dos sexos abortado. Por isso possui indivíduos com flores pistiladas e outros com flores estaminadas (Figura 1). Isso caracteriza a erva-mate como uma espécie dióica e, conseqüentemente, de fecundação exclusivamente cruzada. A floração é abundante e concentrada, sendo a polinização natural dificultada por apresentar a antese das flores estaminadas e pistiladas em períodos diferentes (FERREIRA et al., 1983).



Figura 1 – Flores de erva-mate: à esquerda - flores femininas (flores pistiladas); à direita – flores masculinas (flores estaminadas). Fonte: QUADROS, K. M., Santa Maria, RS, 2013.

O fruto é um drupóide, tetralocular de 4 a 6 mm de diâmetro, com o mesocarpo carnoso e o endocarpo ósseo-lenhoso envolvendo a semente (KUNIYOSHI, 1983). A frutificação é abundante, de superfície lisa e de cor violácea quando madura. Cada fruto possui de 4 a 5 sementes e tem polpa mucilaginosa (CARVALHO, 2006). A dispersão de frutos e sementes é zoocórica, especialmente ornitocórica, e a produção dos frutos e sementes apresentam grande heterogeneidade no mesmo indivíduo e entre indivíduos, sendo encontrados na mesma época frutos verdes e maduros (ZANON, 1988; CARVALHO, 2006). A coleta dos frutos pode ser realizada com auxílio de linhada, sacudindo os galhos e derrubando os frutos sobre uma lona plástica, sendo que a extração da semente se dá pela maceração em peneira de malha fina, sob água corrente (KUNIYOSHI, 1983).

A semente possui o tegumento membranáceo de cor castanha clara e de forma variável, levemente reniforme e longamente obovóide, com o endosperma carnoso de cor creme. O embrião possui 0,2 a 0,3 mm de tamanho e se situa no ápice, na parte mais atenuada da semente, junto à micrópila (KUNIYOSHI, 1983). A fase reprodutiva se inicia dois anos após o plantio em árvores oriundas de propagação vegetativa e, por volta dos cinco anos de idade, em árvores provenientes de sementes em condições adequadas de cultivo (STURION et al., 1999).

3.2 Aspectos ecológicos e silviculturais

A erva-mate se caracteriza como uma espécie clímax, tolerante ao sombreamento de intensidade média e baixas temperaturas, independente da idade da planta. A espécie ocorre naturalmente em solos de baixa fertilidade, com baixos teores de cátions trocáveis, altos teores de alumínio e pH baixo, porém não tolera solos compactados (ARANDA, 1986). É recomendada para a arborização e jardinagem, recuperação de ecossistemas degradados e restauração de mata ciliar em locais de inundação, sendo que se regeneram com facilidade quando o estrato arbóreo superior é raleado (CARVALHO, 1994; CARVALHO, 2006).

Ocorre naturalmente na Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária), em associações evoluídas com o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), e também na Floresta Estacional Semidecidual, no Noroeste do Paraná e no Sul do Mato Grosso do Sul (Figura 2) (CARVALHO, 2006). Assim, a região de distribuição natural está situada entre os paralelos 18° e 26° de latitude Sul, sendo a área de difusão natural entre os paralelos 12° e 32° de latitude Sul (ARANDA, 1986).



Figura 2 – Locais de ocorrência natural da erva-mate no Brasil. Fonte: CARVALHO (2006)

A produção de mudas de erva-mate passou por mudanças a partir da década de 1980, quando houve um aumento do consumo de erva-mate. Anterior à esta data, a maior parte do mate produzido no Brasil provinha de ervais nativos, mas, para suprir a demanda do mercado, houve a necessidade de implantação de novos ervais (CANSIAN, 2003; SANTOS, 2011). No entanto, devido à grande diversidade das práticas de manejo e cultivo da espécie, é difícil estabelecer uma descrição geral das características dos povoamentos implantados (MACCARI JUNIOR et al., 2006; POLETTTO, 2010). Desta maneira, a demanda por produtos de qualidade e quantidade compatíveis com as exigências do mercado tem levado a considerar-se cada vez mais a importância da qualidade das mudas (TITON, 2001), sendo um requisito essencial no setor florestal para o estabelecimento de povoamentos com melhor sanidade e produtividade (HORBACH, 2008).

3.3 Propagação por semente

As sementes destinadas à produção de mudas são normalmente oriundas de ervais nativos ou plantados, sem nenhum critério de seleção. A baixa germinação das sementes de erva-mate, aliada à baixa qualidade fisiológica e a dormência combinada (tegumentar e embrionária), dificulta a produção uniforme de mudas (KUNIYOSHI, 1983; STURION, 1988; FOWLER; STURION, 2000; CARVALHO, 2006). Além disso, as sementes apresentam baixo poder germinativo (5% a 20%), o que inviabiliza a semeadura direta nos recipientes (STURION, 1988), mesmo quando submetidas ao processo de estratificação, que auxilia no abrandamento do tegumento e facilita a germinação (KUNIYOSHI, 1983). A estratificação consiste em armazenar as sementes em camadas de areia úmida por um período de, aproximadamente, 120 dias (BACKES; IRGANG, 2002), devendo a estratificação e a semeadura ocorrer no menor prazo possível após a coleta, para melhor aproveitamento da viabilidade das sementes, sem a necessidade de outros tratamentos (MEDRADO, 2000).

Se por um lado, a variabilidade genética resultante da propagação por sementes facilita a adaptação da espécie a diferentes condições ambientais (SAND, 1989), por outro lado, povoamentos formados por essas mudas apresentam crescimento heterogêneo, o que dificulta o manejo e diminui a qualidade do produto final (STURION et al., 1999). Aliado a este fato, a produção de mudas via seminal é limitada a época de coleta das sementes. Esses entraves da produção de mudas seminais podem ser minimizados pelo uso da propagação vegetativa a partir de indivíduos geneticamente superiores (WENDLING, 2004).

3.4 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa é utilizada há centenas de anos para a multiplicação de espécies arbóreas de interesse comercial (HARTMANN et al., 2011) e visa à produção de novas plantas a partir de partes de plantas selecionadas, podendo ser ramos, gemas, estacas, folhas, raízes e outros (SAND, 1989). A propagação vegetativa oportuniza a produção de grande quantidade de plantas geneticamente idênticas a partir de poucos indivíduos selecionados em função de algumas características desejáveis, como a sanidade e a produtividade da planta-matriz (QUADROS, 2009).

A propagação vegetativa ou clonagem, está baseado na teoria da totipotência celular, que é a capacidade que as células vegetais vivas possuem de formar um novo indivíduo completo (FERRARI et al., 2004; WENDLING et al., 2005). Um clone se define como um material geneticamente uniforme, derivado de apenas um genótipo e propagado exclusivamente via vegetativa (HARTMANN et al., 2011). Nas novas plantas, os ramos e as raízes formadas são denominadas de adventícias, pois não se originam de embriões (FACHINELLO et al., 1994).

Devido à utilização de indivíduos selecionados na propagação vegetativa, a principal vantagem dessa técnica está na possibilidade de fixar as interações não-aditivas, permitindo maiores ganhos genéticos se comparada à propagação por sementes (BISOGNIN, 2011). Portanto, quando as condições de solo e clima são semelhantes às da origem do material genético selecionado, os plantios formados por mudas produzidas via propagação vegetativa apresentam maior uniformidade e produtividade, além de uma série de características desejáveis, como resistência a pragas e doenças e o melhor aproveitamento da água e dos nutrientes do solo (ELDRIDGE et al., 1994).

A propagação vegetativa permite a produção de mudas durante o ano todo, a partir de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação (ELDRIDGE et al., 1994). São comumente utilizadas a estaquia, miniestaquia, microestaquia, mergulhia, enxertia e micropropagação. No entanto, a escolha do método varia de acordo com o objetivo da propagação, a espécie envolvida, a habilidade do executor, o tipo e a quantidade de material disponível, as condições ambientais e a disponibilidade de recursos físicos e financeiros (WENDLING et al., 2005).

3.4.1 Estaquia

Um aspecto importante para a estaquia é a seleção da planta matriz, onde os ramos, raízes ou outras partes são coletados para o preparo das estacas. Estacas de ramos podem ser de tamanho convencional, com 10 cm de comprimento, ou de gema única, com cerca de 3 cm, sempre com a permanência de pelo menos $\frac{1}{4}$ da folha na estaca, afim de fornecer carboidratos e outros compostos à mesma e reduzir a perda de água. As estacas são enraizadas preferencialmente em casa de vegetação, em condições de alta umidade, afim de evitar a desidratação dos tecidos. O tempo de permanência na casa de vegetação varia conforme a

espécie e, após esse período de enraizamento, as mudas são então aclimatizadas em casa de sombra e, posteriormente, transferidas para pleno sol (HARTMANN et al., 2011).

Diversos estudos de estaquia de erva-mate foram conduzidos visando o aumento da taxa de enraizamento, sendo testadas a eficiência de substâncias promotoras (IRITANI; SOARES, 1981; GRAÇA et al., 1988; NIKLAS, 1988; CASO; DOTA, 1997; PICHET, 1997; TARRAGÓ et al., 1999; KRICUN; BELINGHERI, 2002; MAYOL, 2003; HORBACH, 2008), de substâncias desinfestantes e antioxidantes (TARRAGÓ et al., 1999; TAVARES et al., 1992; KRICUN; BELINGHERI, 2002; QUADROS, 2006; QUADROS, 2007), de substratos que forneçam melhor condição para o enraizamento adventício (GRAÇA et al., 1988; TAVARES et al., 1992; KRICUN, 1995; MAYOL, 2003), da posição de coleta das estacas (GRAÇA et al., 1988; SAND, 1989; TAVARES et al., 1992; KRICUN, 1995; WENDLING; XAVIER, 2001; MOLINA; MAYOL, 2003; COMIRAN et al., 2012), dentre outros estudos.

Algumas vantagens são apresentadas na estaquia quando comparada a outras técnicas de propagação vegetativa, como a enxertia, a mergulhia e a alporquia, se destacando a maior rapidez na formação da muda, o baixo custo, a maior uniformidade e o maior número de mudas a partir de uma planta matriz (HIGA, 1983). Para algumas espécies comerciais, a exemplo do eucalipto (*Eucalyptus* spp), a estaquia possibilita alta viabilidade econômica no estabelecimento de plantios clonais, mas não se aplica a todas as espécies florestais (PAIVA; GOMES, 1995). Em contrapartida, quando a estaquia é comparada com técnicas mais recentes, tais como a miniestaquia e a microestaquia, esta apresenta desvantagens, como maiores variações de crescimento das mudas, além de um menor potencial de enraizamento (ALFENAS et al., 2009). Aliado a este fato, a estaquia em erva-mate têm apresentado uma série de limitações para uso em escala comercial, como a dificuldade de rejuvenescimento do material adulto e a falta de domínio das técnicas de manejo do ambiente de propagação (WENDLING, 2004; FERRARI et al., 2004).

3.4.2 Miniestaquia

O termo minijardim clonal foi designado para dar a idéia de extensão menor da área ocupada em relação aos jardins clonais de campo (ALFENAS et al., 2009). A miniestaquia tem possibilitado maximizar o enraizamento adventício e a produção de mudas de erva-mate

(WENDLING et al., 1999; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003). Requer menores concentrações de fitoreguladores, tempo de permanência das mudas e espaço em casa de vegetação, resulta em maior porcentagem e uniformidade no enraizamento e consequente qualidade do sistema radicial. Ademais, proporciona maior controle de pragas, de doenças, de água e de nutrientes nas minicepas (XAVIER et al., 2003; WENDLING et al., 2005; BRONDANI et al., 2009), o que possibilita a clonagem de genótipos de difícil enraizamento (ALFENAS et al., 2009).

O processo de miniestaquia pode ser dividido em cinco fases: 1) a produção de brotos, primando pelos tratamentos culturais da minicepa, como a irrigação, a fertilização, o controle de doenças e pragas, a irradiação e a temperatura do ar; 2) o enraizamento da miniestaca; 3) a aclimatização à sombra; 4) o crescimento das miniestacas; e 5) a rustificação em pleno sol (ALFENAS et al., 2009). Os brotos são geralmente provenientes do enraizamento de estacas. Inicialmente, faz-se a poda do ápice da planta selecionada, formando minicepas que, em intervalos variáveis, emitem novas brotações que são coletadas e enraizadas em condições controladas de temperatura e umidade, formando uma nova muda (XAVIER; WENDLING, 1998; ALFENAS et al., 2009). O conjunto de minicepas é chamado de minijardim clonal.

Para maior eficiência e padronização da produção de miniestacas por minicepa ao longo do ano, a coleta das brotações deve ser realizada de forma seletiva e continuada, garantindo assim um bom estado vegetativo e um sistema radicial ativo (BRONDANI et al., 2009). As miniestacas geralmente variam de 4 a 6 cm de comprimento, contendo um par de folhas (miniestacas de base) ou dois pares de folhas (miniestacas de ponta ou de ápice), com a redução de aproximadamente um terço da área foliar (FERRARI et al., 2004; ALFENAS et al., 2009, ANDREJOW, 2006; BRONDANI et al., 2009). Os períodos de coleta variam conforme a época do ano, o clone e o vigor das brotações. Assim, a arquitetura da minicepa e a posição da coleta das brotações são fundamentais para garantir bons níveis de enraizamento das miniestacas. Além disso, é de fundamental importância manter túrgidas as minicepas e as brotações utilizadas para o preparo das miniestacas, pois o estresse hídrico pode alterar os níveis de hormônios e com isso, diminuir o seu potencial rizogênico (ALFENAS et al., 2009).

O minijardim pode ser implantado em diferentes tipos de recipientes, como vasos, caixas de fibra de vidro ou mesmo canaletões, o que facilita o manejo das minicepas, a aplicação dos tratamentos culturais e a coleta das brotações adventícias, reduzindo os custos de transporte e preparo das miniestacas. Por ser praticamente inerte, a areia tem sido usualmente empregada como leito de minijardim clonal (ALFENAS, 2009).

Diversas empresas florestais utilizam a miniestaquia para a produção de mudas em escala comercial (TEIXEIRA, 2001), no entanto, para algumas espécies arbóreas, como a erva-mate, há a necessidade de maiores estudos sobre a condução de minicepas e dos processos envolvidos no enraizamento de miniestacas, visando à produção comercial de mudas dessas espécies (WENDLING et. al., 2007).

3.4.3 Micropropagação

A micropropagação consiste no cultivo *in vitro* de órgãos, tecidos ou células vegetais, em meio de cultura apropriado e sob condições assépticas e controladas (GOLLE, 2010). A micropropagação oferece excelentes possibilidades para a produção comercial de mudas, pois permite a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (PAIVA; GOMES, 1995). Na micropropagação, as características do material a ser propagado exercem influência na taxa de multiplicação e na viabilidade econômica de sua aplicação, sendo um fator determinante para o aumento da produtividade e qualidade de plantas produzidas (FERRARI et al., 2004).

No geral, a micropropagação pode ser dividida em quatro fases distintas: 1) o estabelecimento, que é a introdução dos tecidos da cultura *in vitro*, em meio de cultura apropriado; 2) a multiplicação, que é a indução de brotos múltiplos nos explantes; 3) a formação de raízes adventícias; e 4) a aclimatização, que é a passagem gradual da condição *in vitro* para *ex vitro* (HARTMANN et al., 2011).

O estabelecimento *in vitro* de plantas adultas é uma etapa complexa da micropropagação, em virtude dos altos níveis de oxidação inicial e contaminação por microrganismos que, na maioria das vezes, são difíceis de serem eliminados. Para controlar esses microrganismos, antibióticos e fungicidas podem ser utilizados no tratamento dos propágulos.

Neste caso, a erva-mate pode ser estabelecida por meio de embriões zigóticos germinados *in vitro* (HORBACH, 2008). Os embriões zigóticos se constituem em uma ótima fonte de explantes, devido à natureza juvenil que confere alto poder regenerativo e capacidade de enraizamento aos propágulos, acelerando a propagação da erva-mate (HU; FERREIRA, 1990; LITZ, 1991).

O estágio fisiológico da planta de onde serão retirados os explantes exerce influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. Portanto, plantas bem nutridas e sem sintoma de deficiência hídrica, em geral, fornecem explantes mais responsivos ao enraizamento. Além disso, a condição fitossanitária da planta que irá fornecer o material a ser propagado é importante, porque irá determinar a facilidade em descontaminar os explantes durante o isolamento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A fase da multiplicação é a mais longa da micropropagação, e consiste em propagar o maior número de plantas possível (ALFENAS et al., 2009). Normalmente, o processo de multiplicação é realizado por meio da proliferação de gemas axilares ou brotos adventícios (BISOGNIN, 2011), com auxílio de fitorreguladores se necessário e originando novas partes aéreas ou tufo de brotos. A proliferação de gemas axilares permite alta taxa de propagação, além da obtenção de plantas com adequado crescimento (XAVIER et al., 2007). Os brotos obtidos na fase de multiplicação são transferidos para meio propício ao enraizamento, podendo ser realizado *in vitro* ou *ex vitro* (HARTMANN et al., 2011).

A etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nos propágulos provenientes da multiplicação, que pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*. No enraizamento *in vitro*, as raízes são regeneradas em condições assépticas e a planta é transplantada para substrato. No enraizamento *ex vitro*, os propágulos multiplicados são manipulados como microestacas, sendo que o enraizamento se dá em substrato (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Algumas plantas micropropagadas podem permanecer *in vitro* (microcepas), enquanto as brotações são coletadas periodicamente, sendo os segmentos nodais (microestacas) os principais propágulos utilizados para a propagação (ASSIS, 1997). Já a aclimatização é uma etapa crítica da micropropagação que implica na passagem dos explantes de uma condição heterotrófica para a condição autotrófica, significando, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. Devido a este fato, nesta etapa é indispensável a manutenção de alta umidade relativa para a sobrevivência da planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; HARTMANN et al., 2011).

3.4.4 Microestaquia

Na microestaquia, propágulos vegetativos, denominados microestacas, são rejuvenescidos em laboratório de micropropagação e enraizados *in vitro*, ou *ex vitro*, (ALFENAS, 2009). A microestaquia é uma otimização da miniestaquia, no qual os brotos utilizados para a produção das microestacas são coletados em microjardim clonal, utilizando estrutura semelhante de operação de mudas oriundas de minijardim clonal. A diferença entre a miniestaquia e a microestaquia é que, enquanto as mudas para a formação do minijardim clonal são oriundas de estaquia, as mudas para a formação do microjardim clonal são oriundas da micropropagação (CAMPINHOS et al., 1999).

A microestaquia apresenta algumas desvantagens e limitações, como a maior sensibilidade das microestacas às condições ambientais e a dependência de laboratório de micropropagação para o rejuvenescimento de material (ASSIS, 1997). No entanto, a microestaquia oferece algumas vantagens quando comparada com a miniestaquia em relação ao enraizamento dos propágulos, sendo essa mais evidente em clones de difícil enraizamento, indicando, nesses casos, possível efeito de rejuvenescimento durante a micropropagação (TITON, 2001).

Para o melhor desempenho dos propágulos coletados e enraizados, é importante que as microcepas estejam em equilíbrio nutricional e hormonal e também com regime de irrigação e controle adequado de doenças (CAMPINHOS et al., 1999). Embora o uso de fitoreguladores na microestaquia não seja necessário para algumas espécies (ASSIS et al., 1992; XAVIER; COMÉRIO, 1996; ASSIS, 1997), o tratamento de microestacas de erva-mate com 1.000 mg L⁻¹ de AIB tem sido eficiente para o enraizamento (QUADROS, 2009). A microestaquia já está sendo utilizada para a produção de mudas de espécies nativas, visando aproveitar ao máximo a juvenildade dos propágulos e maximizar o enraizamento (XAVIER et al., 2001; SCHUCH et al., 2007).

As microestacas podem ser enraizadas *in vitro* ou *ex vitro*. O enraizamento *in vitro* ocorre em meio de cultura, com manutenção do material vegetal em sala de crescimento, enquanto o enraizamento *ex vitro* ocorre em substrato em casa de vegetação. Portanto os propágulos são retirados e, após tratamento com auxina, estes são inseridos diretamente em substrato e colocados em casa de vegetação, sob condições de umidade e temperatura adequados para o mesmo. Esse procedimento não só proporciona uma adequada transição do

ambiente de cultura *in vitro* para o *ex vitro*, como também exige menor manejo das plantas em comparação com o enraizamento *in vitro* (HARTMANN et al., 2011).

A microestaquia pode apresentar resultados superiores à miniestaquia no enraizamento e na sobrevivência das microestacas (TITON, 2001). Contudo, em espécies arbóreas, apesar de a microestaquia ter sido considerada o método mais eficaz para o rejuvenescimento dos tecidos, seu uso ainda é limitado por falta de domínio tecnológico e pelo elevado custo se comparada com os demais métodos de rejuvenescimento (WENDLING; XAVIER, 2001).

3.4.5. Fatores que influenciam o enraizamento

O enraizamento adventício é um processo anatômico e fisiológico complexo, associado à desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais totipotentes para a formação de meristemas que darão origem ao sistema radicial (ALFENAS et al., 2009). A origem das raízes adventícias em propágulos de plantas lenhosas perenes normalmente está em células vivas do parênquima, no floema secundário, podendo às vezes, estar no câmbio do floema ou de lenticelas (HARTMANN et al., 2011). Existem dois padrões de formação de raízes adventícias nos tecidos propagados vegetativamente: a formação de raízes diretamente das células próximas do sistema vascular (organogênese direta), que normalmente ocorre em espécies de fácil enraizamento; e a formação indireta de raízes (organogênese indireta), em que as divisões celulares não são direcionadas, havendo a formação de calo por um período transitório, antes das células se dividirem num padrão organizado para iniciar o enraizamento adventício (HARTMANN et al., 2011).

Como a capacidade de formação de raízes é controlada geneticamente, podem haver diferenças entre espécies e até mesmo dentro da espécie, tornando a competência natural de enraizamento um processo complexo (HIGA, 1983; DAMIANI et al., 2009). O potencial de enraizamento adventício pode ser classificado em plantas de fácil, moderado e difícil enraizamento. Em plantas de fácil enraizamento, os tecidos apresentam todos os componentes essenciais à iniciação do enraizamento, inclusive auxinas, o que aumenta a rapidez na formação de raízes adventícias. Nas plantas de moderado enraizamento, os componentes essenciais se apresentam em quantidades satisfatórias, porém a auxina é o fator limitante, requerendo a aplicação exógena para aumentar o potencial rizogênico. Em plantas de difícil enraizamento, os componentes indutores do enraizamento não estão presentes, ou as células

são pouco responsivas, sendo que a aplicação exógena de auxinas promove pouca ou nenhuma resposta ao enraizamento adventício (HARTMANN et al., 2011). Desta forma, o sucesso da produção de mudas por clonagem é altamente dependente dos fatores que afetam a formação de raízes adventícias, não só no percentual de enraizamento obtido, mas também na qualidade das raízes formadas, dificultando o estabelecimento de protocolos de propagação vegetativa.

As dificuldades para o enraizamento dos propágulos podem ser minimizadas mediante uma série de medidas aplicadas antes e durante o processo, controlando diversos fatores (ASSIS; TEIXEIRA, 1998), como a aplicação e a concentração de fitorregulador, o ambiente de enraizamento, o substrato e a juvenilidade da planta fornecedora dos propágulos (VALLE; CALDEIRA, 1978; BERTOLOTTI; GONÇALVES, 1980; GOMES, 1987; XAVIER, 2002; FERRARI et al., 2004). Os fitorreguladores (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico), moléculas sinalizadoras e metabólitos secundares (poliaminas, fenóis, salicilatos e compostos fenólicos) influenciam direta ou indiretamente a iniciação de raízes adventícias. No entanto, as respostas rizogênicas dependem do equilíbrio endógeno entre as auxinas e citocininas, da aplicação do fitorregulador, da espécie e do estado de maturidade dos propágulos (BHATTACHARYA, 1988; FACHINELLO et al., 2005; WENDLING; XAVIER, 2005; HARTMANN et al., 2011).

A temperatura e a umidade relativa do ar exercem papel fundamental no enraizamento (LOACH, 1988), sendo a faixa ideal entre 25 e 30 °C e umidade relativa do ar acima de 80% (GOULART; XAVIER, 2008). Igualmente, a disponibilidade hídrica do substrato é de grande importância no enraizamento, até que ocorra a iniciação de raízes para a absorção de água e nutrientes, tudo devido à sensibilidade das brotações à desidratação (CASO; DOTTA, 1997; SCHMIDT, 1993).

O substrato também pode afetar o desenvolvimento e qualidade das raízes adventícias (PAIVA; GOMES, 1995). Um substrato adequado tem como função promover a sustentação do propágulo vegetativo durante o período de enraizamento, além de proporcionar um ambiente escuro e opaco, reduzindo a penetração da luz na base do propágulo.

A escolha do substrato depende diretamente das características físico-químicas dos componentes que o irão formar (ALFENAS, 2009). Como é difícil encontrar material puro com as características ideais para um substrato, os compostos devem ser misturados a fim de melhorar suas propriedades físico-químicas (SANTOS et al., 2000). Além das características físico-químicas, é importante que o substrato seja isento de pragas, patógenos e substâncias tóxicas (KAMPF, 2005).

Em relação às propriedades físicas, o tamanho das partículas tem influência determinante sobre o volume de água e ar retido do substrato, sendo que partículas maiores tornam o meio com alto espaço de aeração e partículas menores fecham os poros, aumentando a capacidade de retenção de água (FERMINO, 2003). Sendo assim, o substrato deve possuir baixa densidade, boa capacidade de absorção e retenção de água, boa aeração e drenagem, (KAMPF, 2005; HARTMANN et al., 2011). Quimicamente, o substrato deve ser preferencialmente inerte, afim de permitir a manipulação dos nutrientes de acordo com a necessidade da espécie. Dentre os substratos comumente utilizados, pode-se destacar a vermiculita, a perlita, a areia, a turfa, a casca de eucalipto ou pinus, a casca de arroz carbonizada e o pó de carvão (ALFENAS et al., 2009).

O estágio fisiológico da planta matriz deve ser considerado na capacidade de enraizamento adventício. A coleta das brotações deve ser realizada, em geral, quando a planta se encontra em estágio de crescimento vegetativo, sem contudo, ter iniciado a floração (HIGA, 1983). Destaca-se que os níveis de irradiação em plantas matrizes influenciam as respostas morfogenéticas do material a ser propagado (IRITANI; SOARES, 1982; LOACH, 1988). Isso se deve aos níveis hormonais endógenos e nutricionais e ao balanço entre promotores e inibidores de enraizamento (ANDREJOW, 2006).

Em algumas espécies, a presença das folhas primárias no material vegetativo é benéfica ao enraizamento, sendo que geralmente, utilizam-se um ou dois pares de folhas cortadas pela metade. Isto se deve ao fato de que, na folha, há a produção de assimilados e cofatores de enraizamento. Em geral, o alto teor de carboidratos favorece o enraizamento (HIGA, 1983; ALFENAS et al., 2009), enquanto o excesso de alguns nutrientes no propágulo, como o manganês e nitrogênio prejudicam a rizogênese (FACHINELLO et al., 2005).

Sabe-se que há uma correlação negativa entre o teor de nitrogênio com o enraizamento e o vigor do sistema radicial (MOE; ANDERSON, 1988). Desta maneira, para manter a alta taxa de carboidratos e baixos índices de nitrogênio em plantas matrizes, a adubação nitrogenada deve ser reduzida, o que restringe o crescimento da parte aérea e permite o acúmulo de carboidratos. Por consequência, os brotos laterais da planta matriz devem ter preferência do que brotos terminais, devido ao crescimento mais lento, ocasionando maior armazenamento de carboidratos (HARTMANN et al., 2011).

A expressão da juvenilidade ontogenética aumenta no sentido do ápice para a base da planta (ALFENAS et al., 2009). Portanto, brotações de regiões inferiores ou centrais de uma árvore possuem características mais juvenis do que aqueles originados das regiões superiores ou periféricas (HIGASHI et al., 2000).

A competência ao enraizamento está diretamente relacionada ao grau de juvenilidade em que se encontram os propágulos e isso se manifesta com maior frequência em espécies de difícil enraizamento. A perda da juvenilidade se caracteriza pela redução da capacidade morfogênica dos tecidos, com resultado da maturidade natural que ocorre com o desenvolvimento ontogenético da planta (THORPE et al., 1991; FACHINELLO et al., 2005). Portanto, tecidos jovens ou rejuvenescidos apresentam maiores índices de enraizamento, com sistema radicial de melhor qualidade e bem desenvolvido, associado ao maior vigor de crescimento das mudas produzidas.

3.4.6 Técnicas de rejuvenescimento

A perda da juvenilidade de um propágulo está relacionada com mudanças progressivas nas características morfológicas e de desenvolvimento, como a forma da folha, o padrão de ramificação, o crescimento da parte aérea, o vigor e a competência de formar brotos e raízes adventícias (HARTMANN et al., 2011), fazendo com que as mudas produzidas não expressem o seu potencial de crescimento, o que se constitui em um risco no estabelecimento de plantios clonais (ALFENAS et al., 2009). Assim, o sucesso da produção massal de mudas por propagação vegetativa depende da adoção de práticas de manejo para manter ou rejuvenescer os propágulos (HACKETT, 1988; HIGASHI et al., 2000), como a poda drástica e a propagação vegetativa seriada (ELDRIDGE et al., 1994; ALFENAS et al., 2009).

A poda drástica quebra a dominância apical e estimula o crescimento das gemas na porção inferior da planta matriz, para aumentar a produção de propágulos juvenis (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), pois a juvenilidade é maior na base do que no ápice da planta (ALFENAS et al., 2009). Em algumas espécies o anelamento parcial ou total na base do tronco já é suficiente para induzir brotações epicórmicas juvenis (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), não sendo necessária a poda.

Propágulos vegetativos oriundos de ramos jovens tendem a apresentar maior percentual de enraizamento. Assim, técnicas que permitam ao ramo retornar à fase juvenil, evitarão a diminuição do potencial de enraizamento, à medida que a planta-matriz envelhece (FACHINELLO et al., 2005).

A propagação vegetativa por micropropagação, enxertia, estaquia e miniestaquia seriada (WENDLING, 2002; FERRARI et al., 2004) também podem ser utilizadas para o

rejuvenescimento de algumas espécies ou clones. O potencial de enraizamento e o vigor dos propágulos aumentam com os cultivos subsequentes *in vitro* (WENDLING, 2002). Nestes métodos, o rejuvenescimento é alcançado, principalmente, em virtude do estresse induzido pelos cortes de tecidos (VON ADERKAS; BONGA 2000 apud WENDLING, 2002).

3.4.7 Formação de jardim clonal

A formação de jardim clonal a partir de plantas rejuvenescidas permite a obtenção de maior vigor e qualidade das brotações necessárias para a produção massal de mudas por propagação vegetativa, principalmente no que se refere a competência para o enraizamento, tornando possível clonar comercialmente genótipos de difícil enraizamento. Um jardim clonal pode ser formado com plantas regeneradas de estacas e de miniestacas, denominado de minijardim clonal, ou de microestacas, denominado de microjardim clonal (ALFENAS et al., 2009).

Para a formação de um minijardim clonal, poda-se a parte aérea de plantas propagadas por semente ou por estaquia, formando as minicepas que, em intervalos regulares, emitem novos brotos que são coletados para o preparo das miniestacas, as quais são colocadas para enraizar em câmara úmida, formando novas plantas (ALFENAS et al., 2009; ANDREJOW, 2006). O conjunto de minicepas é chamado de minijardim clonal. O microjardim clonal é formado a partir de partes aéreas alongadas *in vitro* e enraizadas *in vitro*, ou *ex vitro* em casa de vegetação. Após a formação da muda, seu ápice é podado para a formação da microcepa, que fornecerá novos brotos que serão utilizados para o preparo das microestacas (FERRARI et al., 2004). O conjunto de microcepas é chamado de microjardim clonal.

Tanto o minijardim quanto o microjardim clonal pode ser formado em diferentes tipos de recipientes, como vasos de polipropileno de diferentes volumes e caixas de fibra de vidro com variadas formas e dimensões (HIGASHI et al., 2002). Para espécies arbóreas, tais sistemas têm sido estabelecidos em tubetes de plástico ou em sistema de canaletão de fibrocimento sob teto translúcido e fixo, em casa de vegetação e com fertirrigação por gotejamento ou subirrigação em tanques móveis de hidroponia ou inundação temporária (XAVIER, 2002; ALFENAS et al., 2009; ANDREJOW, 2006).

Um canaletão é uma estrutura formada por concreto, amianto ou outro material, instalada sobre bases fixas, onde podem ser cultivadas as minicepas e microcepas (FERRIANI

et al., 2010). Entretanto, os custos envolvidos na utilização destas estruturas são bastante altos, não sendo abrangente a todo tipo de viveiro ou casa de vegetação e necessitando cuidados a fim de evitar a salinização do substrato desses jardins (XAVIER, 2002; ALFENAS et al., 2009; ANDREJOW, 2006).

A produtividade do jardim clonal por cepas que o constituem são variáveis, principalmente em função do sistema utilizado, da arquitetura da cepa e do ambiente de enraizamento (PAIVA; GOMES, 1995; HIGASHI; SILVEIRA, 2004; TITON, 2001; HARTMANN et al., 2011).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed da UFV, 2009. 500 p.

ANDREJOW, G.M.P. **Minijardim clonal de *Pinus taeda* L.** 2006, 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE 2000. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de Comunicações, 2000. 80p.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnaean Society*, 161: 105-121.

ARANDA, D. **Área de distribución natural de la yerba mate**. Cerro Azul: INTA: Estación Experimental Agropecuaria, 1986. (Publicación miscelanea, 14).

ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1992. p. 824-836.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997, p. 300-304.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, v. 1, 1998, p. 261-296.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação e interesse ecológico. 1º ed., Rio de Janeiro: Instituto Souza Cruz, 2002, 326 p.

BERTOLOTI, G.; GONÇALVES, A. N. **Enraizamento de estacas**: especificações para construção do módulo de propagação. Piracicaba, SP: IPEF, 1980. 7 p. (Circular Técnica, 94).

BHATTACHARYA, N. C. Enzyme Activities During Adventitious Rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Dioscorides Press: Oregon, 1988, p. 88-101 (Advances in Plant Sciences Series, v. 2).

BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Brazilian Society of Plant Breeding, v.1, p. 35-43, 2011.

BRONDANI, G. E. et al. **Propagação Vegetativa de *E. benthamii* x *E. dunnii* por Miniestaquia**. Colombo: Embrapa Florestas – CNPF, 2009, 42 p.(Documentos 183).

CAMPINHOS, E. N. et al. Hidrojardim clonal Champion: uma otimização na produção de mudas de eucalipto. **Silvicultura**, v. 19, n.80, 1999.

CANSIAN, R. L. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie**. 2003. 82 p. São Carlos, Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1994. 640 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 2, 2006, 628 p.

CASO, O. H.; DOTTA, L. A. Propagación clonal por enraizamiento de estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y su promoción por 4-clororesorcinol. **Revista de la Facultad de Agronomía**, La Plata, v. 102, n. 1, p. 91-95, 1997.

COMIRAN, M; QUADROS, K, M; FISCHER, H; SCHWALBERT, R; BISOGNIN, D. A. Enraizamento de estacas de erva-mate coletadas em diferentes posições de ramos epicórmicos de erva-mate In: SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - SEPE. 2012, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria, UNIFRA.

DAMIANI, C. R. et al., Luminosidade e IBA no enraizamento de microestacas de mirtilheiro dos grupos *rabbiteye* e *southern highbush*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p. 650-655, 2009.

ELDRIDGE, K. G. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 1994. 178 p.

FACHINELLO, J. C. et al. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Pelotas: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p.69-109.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2004. 22 p. (Documentos, n.94).

FERREIRA, A. G.; KASPARY, R.; FERREIRA, H. B.; ROSA, L. M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hill. **Brasil Florestal**, Brasília, v.53, p. 29-33, 1983.

FERRIANI, A. P. ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Agroambiente**, v. 4, p. 102-109, 2010.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2000, p. 1-5 (Comunicado Técnico, n. 45).

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* dc.** 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GOMES, A. L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).

GOULART, B.; XAVIER, A. Efeito do tempo de armazenamento de minestacas no enraizamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 671-677, 2008.

GRAÇA, M. E. C. et al. **Estaquia de Erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas – CNPF, 1988. 6 p. (Circular Técnica, n. 18).

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, p. 183 – 296, 1998, 864 p.

GROPPO, M. 2013. *Aquifoliaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4878>).

HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Dioscorides Press: Oregon, 1988, p. 11 – 28 (Advances in Plant Sciences Series, v. 2).

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; JUNIOR DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippings, 2011. 900 p.

HIGA, R. C. V. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por estaquia. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE, 10., 1983, Curitiba. **Anais...** Colombo: Embrapa-CNPF, 1983. p. 119-123. (Documentos, 15).

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica - IPEF**, n. 192, 2000.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de Eucalyptus**. Circular técnica IPEF, n. 194, 2002. 21p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. A. Fertirrigação em viveiros de mudas de *Eucalyptus* e *Pinus*. In: BOARETTO, A. E.; VILLAS BOAS, R. L.; SOUZA, W. F. PARRA, L. R. V. (Eds.) 1ed. **Fertirrigação: teoria e prática**. Piracicaba, v. 1, p. 677-725, 2004.

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

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Org.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 71- 86.

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

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* através da aplicação de reguladores de crescimento. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBS. p. 313-317.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agrolivros, 2005, 256p.

KRICUN, P. S. D. Propagación vegetativa de plantas adultas de yerba mate. In: **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 137-150.

KRICUN, P. S. D.; BELINGHERI, L. D. **Propagación vegetativa de plantas juveniles del genero *Ilex*, provenientes de la Cuenca del Plata**. INTA: Estacion Experimental Agropecuaria Cerro Azul. Misiones – Argentina, 2002, 4 p. (Informe Técnico n° 81).

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 Espécies arbóreas de uma floresta com Araucária**. 1983. 233 f. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

LITZ, R. E. Cultivo de embriones y óvulos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A.; (Org.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: CIAT, 1991, p. 295-312.

LOACH, K. Water relations and adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Dioscorides Press: Oregon, 1988, p. 102 – 116 (Advances in Plant Sciences Series, v. 2).

MACCARI JUNIOR, A. et al. Industria ervateira no estado do Parana – fornecimento de materia-prima. **Revista Acadêmica**, v. 4, n. 1, p. 63-70, 2006.

MAYOL, R. M. Experiencias da macropropagación de la yerba mate. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3; FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVA-MATE, 2003, Chapecó. **Anais...**Chapecó: Epagri, 2003. 1 CD-ROM.

MEDRADO, M. J. S et al. **Implantação de Ervais**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2000. 26 p. (Circular Técnica, n.41).

MOE, R. M.; ANDERSON, A. S. Stock plant environmental and subsequent adventitious rooting. In: Davies, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988, v. 9, p. 214-234.

MOLINA, S. P.; MAYOL, R. M. Efecto de la longitud y diámetro en la mortalidad de estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Resultados preliminares. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3.; FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVA-MATE, 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Epagri, 2003. disponível em CD-ROM.

NIKLAS, O. C. Empleo de circunstancias promotoras de enraizamiento en estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Citrusmisiones**, n. 18, p. 12-9, 1988.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: UFV, MG, 1995. 40 p. (Boletim, n.332).

PICHET, J. A. T. DE F. **Efeito de soluções alcoólicas do ácido indol 3 butírico no enraizamento de estacas de árvores adultas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

POLETTI, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate / podridão-de-raízes**. 97 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

QUADROS, K. M.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Desinfestação de erva-mate *in vitro*. In: V EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS. **Anais...**Colombo, PR, 2006.

QUADROS, K. M. **Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire)** Relatório de estágio (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

SAND, H. A. Propagación agamica de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Nota Técnica** n. 40, INTA, Misiones, 1989, 11 p.

SANTOS, S. R. F. **Multiplicação de genótipos de erva-mate pelo processo de estaquia**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS. 2011.

SCHIMDT, L. **Vegetative Propagation, guideline on grafting, air-layering and cuttings**. n. 5, Philippines: UNDP/FAO, Fiels Manual, 1993.

SCHUCH, M. W. et al. AIB e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. “Climax” através de microestaquia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1446-1449, 2007.

STURION, J. A. et al. **Métodos de produção de sementes melhoradas de erva-mate.** Colombo: Embrapa Florestas – CNPF, 1999, 17p. (Circular Técnica, 34).

STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate.** Colombo: Embrapa Florestas – CNPF, 1988, 10 p. (Circular Técnica, 17).

TARRAGÓ, J.; SANSBERRO, P.; MROGINSKI, L. Uso de sustancias antioxidantes en el enraizamiento de estacas de yerba mate. **Actas Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, 1999, p: 5-8.

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

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília, 2001. **Micropropagation: technology and application.** Dordrecht: Kluwer Academic Press. p. 311-336.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991, p. 311-336.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia.** 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VALLE, C. F.; CALDEIRA, C. J. Fatores que afetam o enraizamento de estacas de *Eucalyptus* spp. **Boletim Informativo IPEF**, v. 6, n. 18, p. 107-117, 1978.

WENDLING, I.; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais.** Viçosa, MG: Aprenda Fácil, v. 3, 223 p. 2005.

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

WENDLING, I.; XAVIER, A.; TITON, M. Miniestaquia na silvicultura clonal de *Eucalyptus*. **Revista Folha Florestal**, Viçosa, n. 1, p. 16-17, 1999.

WENDLING, I. **Miniestaquia e micropropagação seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis***. 2002. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

WENDLING, I. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras**. Colombo: Embrapa Florestas-CNPq, 2004. 46 p. (Documentos, n.91).

WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3.; FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVAMATE, 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Epagri, 2003. 1 CD-ROM.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**. V. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido 3-indolibutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.921-930, 2005.

XAVIER, I. et al. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, p. 403-411. 2001.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Árvore**, v.27, n.3, p.351-356, 2003.

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

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa: UFV, 2002, 64p.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; WENDLING, I. Miniestaca na clonagem de *Eucalyptus*. **Informativo Técnico SIF**, n. 11. Viçosa, 1998.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA - CNPF, 1988. 7p. (Circular Técnica, 16).

5 CAPITULO I

COMPORTAMENTO DE CLONES DE ERVA-MATE EM QUATRO CULTIVOS *IN VITRO*

RESUMO

Pouco se sabe sobre a ecofisiologia e conservação *in vitro* de clones de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) e até mesmo da resposta morfogênica de diferentes explantes. Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de plantas de erva-mate oriundas de segmentos apicais e segmentos nodais de erva-mate em quatro cultivos *in vitro*, a fim de maximizar a taxa de multiplicação e viabilizar a manutenção em banco de germoplasma. Foram excisados o segmento apical e sucessivo segmento nodal de brotações assépticas de oito clones estabelecidos e mantidos *in vitro*, em quatro cultivos sequentes, totalizando 375 plantas, que foram avaliadas aos 30 dias de cultivo quanto à porcentagem de sobrevivência, ao enraizamento, à emissão de novas folhas e ao número de segmentos nodais produzidos por explantes. Do quarto cultivo foram aclimatizadas 60 plantas completas, sendo 30 plantas oriundas de segmentos apicais e 30 oriundas de segmentos nodais. A competência dos explantes foi mantida entre os quatro cultivos. Plantas de erva-mate oriundas tanto de segmentos nodais quanto de segmentos apicais podem ser multiplicadas e enraizadas *in vitro* com altas taxas de multiplicação. Plantas completas podem ser utilizadas para a conservação *in vitro* de clones de erva-mate e também como fonte de novos segmentos nodais e apicais. Segmentos nodais e apicais enraizados *in vitro* podem ser aclimatizados em casa de vegetação para a produção de mudas de erva-mate com alta taxa de sobrevivência.

Palavras-chave: Banco de germoplasma. Multiplicação. Produção de mudas.

BEHAVIOR OF HOLLY CLONES IN FOUR CULTURES *IN VITRO*

ABSTRACT

Little is known about the ecophysiology and conservation *in vitro* of holly clones (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) and even the morphogenic response of different explants. This study aimed to evaluate the performance of holly plants derived from the apical and nodal segments of holly in four cultures *in vitro*, in order to maximize the multiplication rate and enable the maintenance of a germplasm bank. Were excised the apical and successive nodal segment of aseptic shoots from eight clones established and maintained *in vitro*, in four sequential cultures, totaling 375 explants, which were evaluated at 30 days of cultivation as the percentage of survival, rooting, issuing of new leaves and number of nodal segments produced by explants. From the fourth cultivation were acclimatized 60 complete plantlets, being 30 plants from apical segments and 30 derived from nodal segments. The competence of the explants was maintained between the four cultures. Holly plants derived both nodal segments as of apical segments can be multiplied and rooted *in vitro* with high rates of multiplication. Complete plants can be used for *in vitro* conservation of holly clones and also as a source of new nodal and apical segments. Nodal and apical segments rooted *in vitro* can be acclimatized in a greenhouse for seedlings of holly with a high survival rate.

Keywords: Germplasm bank. Multiplication. Plantlet production.

5.1 Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) é uma espécie arbórea típica das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul (OLIVEIRA; ROTTA, 1985). O cultivo compõe um dos sistemas agroflorestais mais antigos e característicos da Região Sul do Brasil, assume expressiva importância ambiental e socioeconômica, e se constitui em uma excelente opção, principalmente para pequenos proprietários rurais (POLETTTO, 2010). Embora esta espécie seja cultivada há muito tempo, ainda não há um controle eficiente de implantação dos ervais, acarretando na má qualidade do produto final (VALDUGA et al., 1997), já que a maioria das plantas são oriundas de sementes, que resulta em povoamentos com grande variabilidade genética. A alta desuniformidade das plantas estabelecidas dificulta o manejo e a aplicação dos tratamentos culturais, o que acaba elevando os custos de produção além de afetar a qualidade do produto final (HIGA, 1982).

Além disso, a produção de mudas seminais é dificultada, devido a germinação ocorrer somente após um período de até seis meses de estratificação. A estratificação é necessária para o rompimento da dormência das sementes, pois os embriões permanecem em estágio cordiforme mesmo quando os frutos estão maduros (HEUSER; MARIATH, 2000). Alternativamente, mudas podem ser produzidas via vegetativa, que é o processo de multiplicação em que ocorre a mitose sucessiva em um propágulo vegetativo especializado, resultando em novas plantas geneticamente idênticas (BISOGNIN, 2011). A propagação vegetativa apresenta diversas vantagens, como a possibilidade de clonagem de apenas indivíduos selecionados, maximização da produção e da qualidade das mudas, alta uniformidade e produtividade dos novos povoamentos e possibilita explorar os componentes não aditivos da variância no melhoramento genético (BISOGNIN, 2011). A aplicação comercial da propagação vegetativa da erva-mate ainda depende do desenvolvimento de protocolos eficientes, que viabilizem técnica e economicamente a produção massal de mudas.

Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a micropropagação possibilita a produção de uma grande quantidade de mudas a partir de poucas fontes de material vegetal original (SOUZA et al., 2009). A micropropagação de espécies arbóreas vem ganhando cada vez mais destaque, sendo que suas principais aplicações encontram-se na conservação de germoplasma, na limpeza clonal, na multiplicação de clones para o melhoramento genético e como ferramenta para outras técnicas biotecnológicas (XAVIER et al., 2007; GOLLE, 2010). Na micropropagação podem ser multiplicados, em grande escala, clones selecionados de grande

interesse comercial (FARIA et al., 2007). Além disso, é também uma ferramenta para estudar o metabolismo e a fisiologia do desenvolvimento e da reprodução das plantas (TEIXEIRA, 2001; SADO, 2009).

A conservação e multiplicação *in vitro* de germoplasma é uma estratégia importante e extremamente útil na conservação de espécies com sementes recalcitrantes ou de baixo poder germinativo, requerendo cultivos periódicos de segmentos vegetais, em condições propícias ao desenvolvimento das brotações adventícias (VIEIRA, 2000). Além de aumentar a taxa de multiplicação e proporcionar a manutenção *in vitro* dos clones, esta estratégia possui diversas vantagens em relação à conservação no campo, tais como a maior qualidade fitossanitária, além de possibilitar a conservação de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e facilitar a disponibilidade de material para os programas de melhoramento (VALOIS et al., 2001; SOUZA et al., 2009).

É essencial que o método de conservação garanta a máxima viabilidade e estabilidade genética dos propágulos, em um local controlado e acessível, de forma a facilitar a multiplicação (CIAT, 1984). Desta maneira, durante a etapa de multiplicação, são necessários vários cuidados a fim de manter a homogeneidade do cultivo e do material genético, tanto no processo dos cultivos sequentes, quanto ao tipo e tamanho do material multiplicado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As taxas de multiplicação *in vitro* podem ser ainda incrementadas com a utilização de explantes adequados e que apresentam as melhores respostas de crescimento (MOREIRA, 2008). Apesar da existência de trabalhos de micropropagação de erva-mate, pouca informação está disponível sobre a multiplicação e conservação *in vitro* de clones.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de clones de erva-mate em quatro sequentes cultivos *in vitro*, a fim de maximizar a taxa de multiplicação e viabilizar a manutenção em banco de germoplasma.

5.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Foram utilizadas brotações assépticas de oito clones oriundos de embriões zigóticos. Os embriões zigóticos foram inoculados de acordo com Horbach et al. (2011). As plântulas formadas tiveram seus ápices podados, que permaneceram *in vitro* para o crescimento de brotações (Figura 1).

Em câmara de fluxo laminar, o segmento apical e o sucessivo segmento nodal, com 5 mm de comprimento, foram excisados de cada broto, sendo mantidas uma gema axilar e uma folha cortada pela metade. Todos os segmentos produzidos nos cultivos foram inoculados e mantidos em meio de cultura até o enraizamento e crescimento da parte aérea. Após a obtenção de uma nova planta completa, foi iniciado um novo cultivo a partir dos segmentos apicais e nodais produzidos, até o quarto cultivo.

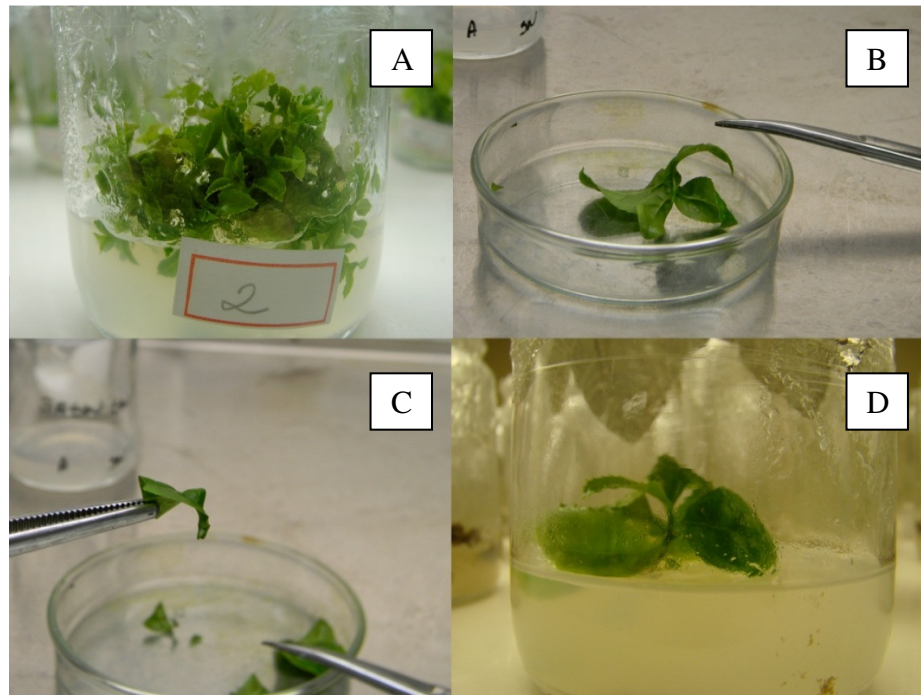


Figura 1 – Erva-mate cultivada *in vitro*; A – Brotações oriundas de embriões zigóticos para coleta de explantes e início do primeiro cultivo; B – Coleta de brotações assépticas para o primeiro cultivo, contendo o segmento apical e o sucessivo segmento nodal; C – Brotação seccionada em segmento apical e nodal para posterior cultivo e enraizamento *in vitro*; D – Nova planta obtida por cultivo de segmento apical, que fornece explantes para novo cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Figure 1 – Holly grown *in vitro*. A - Shoots originated from zygotic embryos for collecting explants and initial of first crop; B – Collection of aseptic shoots for the first crop, containing the apical segment and the subsequent nodal segment; C – Shoots sectioned into apical and nodal segments for subsequent cultivation and *in vitro* rooting; D - New plant obtained by cultivation of apical segment, which provides explants for new cultivation. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

As avaliações foram realizadas aos 30 dias após a inoculação para a origem do explante (segmento apical e nodal) e, posteriormente para cultivos (primeiro, segundo, terceiro e quarto). Tanto para a origem dos explantes quanto para os cultivos, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, enraizamento, emissão de novas folhas e o número de segmentos nodais (produtividade de novos explantes, ou seja, o crescimento da parte aérea de cada explante visando a formação de novos explantes). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições de número variável de explantes/repetições, representativos de oito clones de erva-mate. O número de segmentos apicais e nodais foi de 25, 50, 100 e 200, respectivamente para os cultivos de um a quatro.

Dos explantes avaliados no quarto cultivo, 30 plantas completas oriundas de segmentos apicais e 30 de segmentos nodais foram submetidas à aclimatização em casa de vegetação. Essas mudas foram plantadas em vasos contendo uma mistura de substrato comercial a base de casca de pinus, areia de granulometria grossa e casca de arroz carbonizada (1:1:1) (QUADROS, 2009). Os vasos foram irrigados diariamente, e as plantas avaliadas aos 30 dias para o número de folhas emitidas, número total e comprimento médio de raízes (cm) e comprimento da maior raiz (cm). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de seis plantas completas em cada repetição.

Foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias e, quando necessário, transformados antes da análise estatística. O programa estatístico utilizado foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 7.5 para Windows (SPSS Inc. Chicago II).

5.3 Resultados

A porcentagem de sobrevivência dos explantes após o quarto cultivo foi de 97,6% (Tabela 1). A perda de explante por contaminação foi baixa entre os quatro cultivos, com a média geral de 1,8% explantes contaminados. Explantes oriundos de segmentos apicais não diferiram de explantes oriundos de segmentos nodais para as variáveis estudadas (Apêndice 1). Houve diferença significativa entre os cultivos somente para a porcentagem de enraizamento (Apêndice 2). Em média, 71,8% dos explantes enraizaram, 73,2% dos explantes emitiram folhas e apresentavam 1,5 segmentos nodais aos 30 dias de cultivo.

Tabela 1 – Valores de probabilidade do teste F ($P < 0,5$), média e coeficiente de variação (CV%) para as porcentagens de sobrevivência, enraizamento, emissão de folhas e número de segmentos nodais por explantes de erva-mate oriundos de segmentos apicais e nodais e em quatro cultivos sequentes *in vitro* aos 30 dias. Santa Maria, UFSM, 2013.

Table 1 – Probability values of the F test ($P < 0.5$), mean and coefficient of variation (CV%) for the percentages of survival, rooting, leaf emergence and number of nodal segments per explant of holly originated from apical and nodal segments and in four sequent *in vitro* cultures at 30 days. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Fontes de Variação	Sobrevivência (%)	Enraizamento (%)	Emissão de folhas (%)	Número de segmentos Nodais
Origem do segmento	0,530	0,733	0,159	1,000
Cultivos	0,611	0,000	0,499	0,176
Média	97,6	71,8	73,2	1,5
CV %	5,6	22,2	19,4	37,0

Os explantes não perderam a capacidade de enraizamento ao longo dos quatro cultivos, propiciando 78,0 % e 83,1 % de enraizamento sucessivamente no primeiro e quarto cultivo (Tabela 2). Os explantes produzidos no segundo cultivo apresentaram a menor porcentagem de enraizamento, sendo que os demais cultivos não diferiram entre si. A porcentagem de enraizamento variou entre 52,4%, no segundo cultivo, e 83,1%, no quarto cultivo.

Tabela 2 – Porcentagem de enraizamento de explantes de erva-mate em quatro cultivos *in vitro* (primeiro, segundo, terceiro e quarto), avaliados aos 30 dias. Santa Maria, UFSM, 2013.

Table 2 – Percentage of rooting from holly explants in four *in vitro* cultures (first, second, third and fourth), evaluated after 30 days. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Cultivos	Enraizamento (%)
1	78,0 a*
2	52,4 b
3	73,5 a
4	83,1 a

*Valores seguidos de letra diferente diferem entre si pelo teste F, a 5 % de probabilidade de erro.

Explantes do quarto cultivo que enraizaram *in vitro* foram submetidos à aclimatização em casa de vegetação (Figura 2). Após 30 dias de aclimatização, plantas completas oriundas de segmento apical apresentaram maior número de raízes do que aquelas oriundas de segmento nodal (Tabela 3). No entanto, explantes de segmento nodal e apical não diferiram quanto ao número de folhas e quanto ao comprimento de raízes. Após 30 dias de aclimatização, os explantes apresentavam em média 3,3 folhas, a maior raiz com 2,1 cm e um

comprimento médio das raízes de 1,0 cm. A sobrevivência das mudas após 30 dias de aclimatização foi de 97% (dados não amostrados).

Tabela 3 – Número de folhas e número e comprimento de raízes de plantas oriundas de segmentos nodais e apicais enraizados *in vitro* e aclimatizados por 30 dias em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Table 3 – Number of leaves and number and length of root from nodal and apical segments rooted *in vitro* and acclimatized for 30 days in a greenhouse. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Origem das plantas	Folhas (unidade)	Raízes (unidade)	Comprimento da maior raiz (cm)	Comprimento de raízes (cm)
Segmentos apicais	3,6 ^{ns}	14,5 a*	2,1 ^{ns}	1,0 ^{ns}
Segmentos nodais	3,0	11,0 b	2,0	1,0
Média	3,3	12,8	2,1	1,0
CV %	48,0	19,2	32,2	24,9

*valores seguidos de letra diferente diferem entre si pelo teste F, a 5 % de probabilidade de erro.

ns: valores não significativos pelo teste F a 5 % de probabilidade de erro.

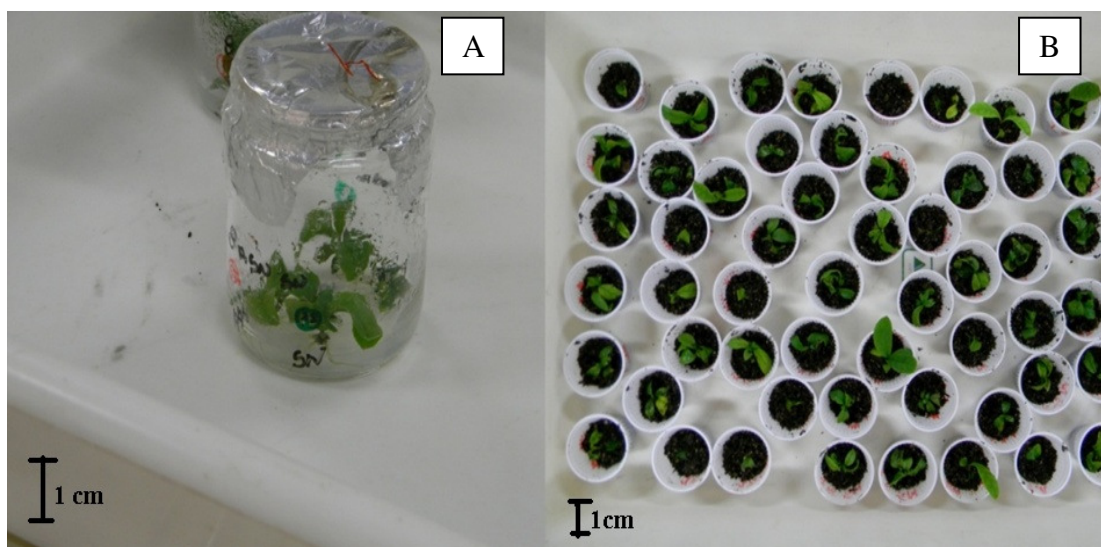


Figura 2 – Aclimatização em casa de vegetação de plantas de erva-mate oriundas de segmentos nodais e segmentos apicais, enraizados *in vitro* do quarto cultivo: A – Aspecto geral das plantas *in vitro*, com parte aérea e sistema radicular, antes da aclimatização; B – Plantas individualizadas colocadas em substratos para a aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Figure 2 - Acclimatization in greenhouse of holly plants derived from nodal segments and apical segments, rooted *in vitro* from the fourth cultivation: A - General view of the *in vitro* plants with shoot and root system before acclimatization, B - Individualized plants placed on substrates for acclimatization in greenhouse. Santa Maria, RS, UFSM, 2013

5.4 Discussão

Este trabalho foi realizado para obter informações sobre a multiplicação e conservação *in vitro*, a fim de maximizar a taxa de multiplicação e desenvolver tecnologias de manutenção de clones de erva-mate em banco de germoplasma. Explantes oriundos de segmentos nodais e apicais foram submetidos a quatro cultivos sequentes, apresentando altas taxas de multiplicação (1,5 segmento nodal) já aos 30 dias de cultivo e demonstrando que clones de erva-mate podem ser mantidos *in vitro*, sendo que tanto segmentos apicais quanto segmentos nodais apresentam altas porcentagens de enraizamento (71,8%) e de crescimento da parte aérea (73,2% dos explantes apresentaram novas folhas). Portanto, clones de erva-mate podem ser multiplicados *in vitro* a partir de segmentos apicais e nodais, dando origem a plantas completas, fornecedoras de novos explantes. Essas plantas enraizadas *in vitro* podem ser mantidas *in vitro* ou diretamente aclimatizadas em casa de vegetação para a produção de mudas, que, por sua vez, podem ser rustificadas e utilizadas para a formação de novos bosques.

A possibilidade de utilizar tanto segmento apical quanto nodal representa uma grande vantagem na multiplicação e conservação *in vitro* de erva-mate, pelo fato desses propágulos envolverem órgãos meristemáticos pré-formados, o que proporciona maior estabilidade genética das plantas micropropagadas (FARIA et al., 2007). Estudos com propágulos de ipê (*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos) evidenciaram diferenças entre explantes oriundo de segmentos apicais e nodais, além de apresentarem baixa porcentagem (7,7%) de enraizamento (PAIM, 2011). Em estudos realizados com pitangueira (*Eugenia involucrata* DC.), explantes oriundos de segmentos nodais foram considerados mais promissores ao cultivo *in vitro* do que aqueles oriundos de segmentos apicais (GOLLE, 2010). Neste experimento, não houve diferença de enraizamento entre explantes de segmentos nodais e apicais, além desses explantes apresentarem alta (71,8%) porcentagem média de enraizamento.

O número de segmentos nodais produzidos por explante pouco variou entre os quatro cultivos avaliados, sem apresentar diferenças significativas. Em explantes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), também foi observado comportamento diferenciado com relação número de segmentos nodais produzidos (FARIA et al., 2007).

Na aclimatização, os explantes apresentaram alta taxa de sobrevivência (97%). Plantas completas oriundas de segmentos apicais apresentaram maior quantidade de raízes quando

comparadas àquelas oriundas de segmentos nodais. No entanto, não houve diferença entre o comprimento da maior raiz e comprimento médio de raízes entre plantas completas oriundas de segmentos nodais e apicais.

Para diversas espécies vegetais, o cultivo *in vitro*, proporciona, num curto espaço de tempo, a obtenção de grandes quantidades de novas plantas a partir de um único explante (XAVIER et al., 2007). Isso é de extrema importância para espécies arbóreas como a erva-mate, já que o processo de clonagem pode produzir plantas em larga escala e com a qualidade necessária para atender a demanda do mercado (MOREIRA, 2008). Neste sentido, a micropropagação a partir de segmentos apicais e nodais têm possibilitado altas taxas de multiplicação de muitas espécies e mantido a estabilidade genética dos clones. No entanto, a própria condição *in vitro* pode levar à instabilidade genética e à variação somaclonal, o que ainda está para ser avaliado em erva-mate. Assim, é importante monitorar a estabilidade das culturas e avaliar periodicamente os efeitos do cultivo continuado *in vitro*, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas (VIEIRA, 2000). Portanto, para a obtenção de altas taxas de multiplicação por meio de cultivos sequentes, e o sucesso na fase de enraizamento dos clones selecionados, devem ser levadas em consideração aspectos como a qualidade e homogeneidade dos explantes produzidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GOLLE, 2010).

Os quatro cultivos avaliados neste experimento tiveram a duração de 12 meses, e o período entre os cultivos foi de 90 dias, com o total de 366 explantes completos, sobreviventes ao final do quarto cultivo (explantes com parte aérea e sistema radicial). Depois de formado o próximo cultivo, os explantes doadores dos segmentos apicais e nodais continuaram *in vitro* e suas partes aéreas permaneceram crescendo normalmente, podendo assim serem novamente coletadas e utilizadas para aumentar o número de mudas produzidas, sendo que a competência dos explantes foi mantida entre os quatro cultivos. Portanto, esses resultados indicam a viabilidade da manutenção de banco de germoplasma *in vitro* de explantes de erva-mate, visando a posterior coleta sucessiva de propágulos vegetativos e a multiplicação intensiva, aumentando assim os benefícios em relação aos custos, devido à otimização da taxa de multiplicação dos propágulos produzidos.

A sobrevivência e enraizamento têm sido considerados as variáveis mais aceitas para indicar um resultado de rejuvenescimento dos propágulos (GEORGE, 1993; ELDRIDGE et al, 1994; HARTMANN et al., 2011). As altas porcentagens de sobrevivência (97,6%), enraizamento *in vitro* (71,8%) e aclimatização em casa de vegetação (97% de plantas sobreviventes), aliado à alta produtividade de plantas completas (366 explantes completos)

apresentados pelos clones na multiplicação intensiva em todos os cultivos deste experimento, demonstram a alta juvenildade dos tecidos e a viabilidade do uso desta técnica para a produção de mudas de erva-mate em larga escala, tanto de segmentos apicais quanto de segmentos nodais, nas condições que foi realizado este experimento. Cabe ressaltar que durante a aclimatização em casa de vegetação, as plantas completas oriundas de segmentos apicais diferiram daquelas de segmentos nodais apenas para o número de raízes produzidas.

5.5 Conclusões

Clones de erva-mate podem ser multiplicados e enraizados *in vitro* a partir de segmentos nodais e apicais, o que resulta em altas taxas de multiplicação. Plantas completas podem ser utilizadas para a conservação *in vitro* de clones de erva-mate e também como fonte de novos segmentos nodais e apicais. Segmentos nodais e apicais enraizados *in vitro* podem ser aclimatizados em casa de vegetação para a produção de mudas de erva-mate.

5.6 Referências Bibliográficas

BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Brazilian Society of Plant Breeding, v.1, p. 35-43, 2011.

CIAT. **El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca *in vitro***; unidad audiotutorial. Cali,1984. 44 p. (CIAT. Guia de Estudio. Serie 045C-05.03).

ELDRIDGE, K. G. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; LEDO, C. A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; CUNHA, M. A. P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.535-543, 2007

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - the technology**. v. 1, Exegetics, England, 1993. 574p.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *eugenia involucrata* dc.** 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, p. 183 – 296, 1998, 864 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; JUNIOR DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippings, 2011. 900 p.

HEUSER, E. D.; MARIATH, J. E. A. Comportamento do embrião de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) ao longo do seu desenvolvimento. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000 **Anais...** Porto Alegre: Edição dos organizadores, 2000. p. 137-139.

HIGA, R. C. V. Estaquia de erva mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) - Resultados preliminares. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., **Anais...** Belo Horizonte, MG, 1982. p. 304-305.

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

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas.** 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2008.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural da erva-mate. In: X Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: Silvicultura da Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). EMBRAPA – CNPF, **Anais...** Curitiba, 1985. 145p. p.17-36. (Documento 15).

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos.** 79 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

POLETTI, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate / podridão-de-raízes.** 97 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

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

SADO, M. **Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva**, 2009, 89 f., Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, SP.

SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P.; MONTARROYOS, A. V.; SANTOS, V. S.; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas – EMBRAPA, 2009. 24 p. (Circular técnica n. 90).

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília, 2001. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press. p. 311-336.

VALDUGA, E.; FREITAS, R. J. S.; REISMANN, C. B.; NAKASHIMA, T. **Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate**. Boletim do CEPPA, Curitiba, v. 15, n.1, p. 25-36, 1997.

VALOIS, A. C.C.; NASS, L.L.; GOES, M de. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I. S. de; VALADARESINGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 124-147, 2001.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de Germoplasma *in vitro* - Tecnologias *in vitro* aplicadas à conservação de recursos genéticos vegetais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 2000.

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

6 CAPÍTULO II

ACLIMATIZAÇÃO E ENRAIZAMENTO *EX VITRO* DE MICROESTACAS DE ERVA-MATE

RESUMO

A técnica de microestaquia e enraizamento *ex vitro* pode resultar em mudas com o sistema radicial de melhor qualidade e com maior número de raízes secundárias, quando comparada com a estaquia convencional. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aclimatização e o enraizamento *ex vitro* de microestacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) em diferentes substratos. As microestacas foram oriundas de brotações de microcepas mantidas *in vitro*, de quatro clones de erva-mate. Em câmara de fluxo laminar, as brotações foram coletadas e levadas para a casa de vegetação onde as microestacas foram padronizadas para 1 cm de comprimento, com um segmento nodal e uma ou duas folhas cortadas pela metade e colocadas em diferentes substratos. Os substratos avaliados foram divididos em dois experimentos, sendo que no primeiro experimento, as microestacas foram plantadas em substratos utilizados puros (areia de granulometria grossa, casca de arroz carbonizada, vermiculita de granulometria média, fibra de coco e substrato comercial a base de casca de pinus) e no segundo experimento, as microestacas foram plantadas em substratos compostos em iguais proporções de volume (casca de arroz carbonizada e areia grossa; casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial à base de casca de pinus; e casca de arroz carbonizada e substrato comercial à base de casca de pinus). As microestacas foram avaliadas aos 30 e 60 dias para a porcentagem de enraizamento, de calo, de brotação, de mortalidade, de microestacas inalteradas e o comprimento da maior raiz. Microestacas de erva-mate produzidas *in vitro* podem ser aclimatizadas e enraizadas em câmara úmida na casa de vegetação, utilizando o substrato composto de casca de arroz carbonizada e substrato comercial ou casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial.

Palavras-chave: Substrato. Propagação vegetativa. Produção de mudas. Microestaquia.

ACCLIMATIZATION AND *EX VITRO* ROOTING OF HOLLY MICROCUTTINGS

ABSTRACT

The technique of microcuttings and *ex vitro* rooting can result in plantlets with a better quality radicular system and with larger number of secondary roots, when in comparison with conventional cuttings. The objective of this work were evaluate the acclimatization and *ex vitro* rooting of holly microcuttings (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) in different substrates. The microcuttings were derived from shoots of microstumps maintained *in vitro*. In laminar flow, the shoots were collected and taken to the greenhouse where microcuttings were standardized to 1 cm long, with one nodal segment and one or two leaves cut in half and placed on different substrates. The evaluated substrates were split into two experiments, whereas in the first experiment, the microcuttings were planted in pure substrates (coarse sand, carbonized rice husk, medium vermiculite, coconut fiber and commercial substrate based on bark pine) and in the second experiment, the microcuttings were planted in composed substrates in equal volume ratios (carbonized rice husk and coarse sand; carbonized rice husk, coarse sand and commercial substrate based on bark pine; and carbonized rice husk and commercial substrate based on bark pine). The microcuttings were evaluated at 30 and 60 days for percentage of rooting, callus, shooting, mortality, unchanged microcuttings and longest root length. Holly microcuttings produced *in vitro* can be acclimatized and rooted in humid chamber at greenhouse, using the composed substrate of carbonized rice husk and commercial substrate or carbonized rice husk, coarse sand and commercial substrate.

Keywords: Substrate. Vegetative propagation. Plantlet production. Microcuttings.

6.1 Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) é uma espécie arbórea, amplamente cultivada no sul do Brasil e países limítrofes (POLETTI, 2010). Na implantação dos ervais, a produção de mudas se dá predominantemente por sementes. No entanto, as sementes de erva-mate apresentam poder germinativo baixo e desuniforme (5% a 20%), inviabilizando assim sua semeadura direta nos recipientes, pois produzem mudas heterogêneas que precisarão permanecer por mais tempo em viveiros (STURION, 1988).

Para a produção de mudas de qualidade de erva-mate, a propagação vegetativa é o método que possibilita o maior avanço genético em um programa de melhoramento (BRONDANI et al., 2009). O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos acelera a propagação da erva-mate e se constitui em uma ótima fonte de explantes, isto devido à natureza juvenil do tecido que confere alto poder regenerativo e maior capacidade de enraizamento aos propágulos (HU; FERREIRA, 1990; LITZ, 1991; HARTMANN et al., 2011). Plântulas originadas a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos podem ser utilizadas para a produção de microestacas via propagação vegetativa, por meio da coleta dos brotos induzidos nesses explantes.

Na microestaquia, os propágulos vegetativos, denominados microestacas, são obtidos a partir da micropropagação *in vitro* (ALFENAS et al, 2009), sendo que, esses propágulos vegetativos podem ser enraizados em meio de cultura apropriado (*in vitro*), ou diretamente em substrato (*ex vitro*). O enraizamento *ex vitro* e a posterior aclimatização em substrato, produzem um sistema radicial de melhor qualidade, possibilitando maior suprimento de água e nutrientes para a planta (DÍAZ-PÉREZ et al., 1995), o que pode viabilizar o uso comercial da microestaquia, pela redução de tempo e dos custos de produção das mudas (MACIEL et al., 2002).

Vários fatores influenciam no desenvolvimento da planta propagada, podendo-se citar o tipo de substrato como um fator de extrema importância, já que este afeta diretamente a formação das raízes (MENEZES JÚNIOR, et al. 2000). As características físicas do substrato são consideradas as mais influentes no enraizamento, já que as características químicas podem ser facilmente modificadas no manuseio pelo produtor da muda (NOGUEIRA, 2001). O substrato utilizado não deve ser muito compacto, deve possuir baixa densidade, boa capacidade de absorção e de retenção de água, boa aeração e drenagem e ser isento de patógenos, de substâncias tóxicas e de sementes de plantas daninhas. Além da necessidade de

garantir o enraizamento, é a formação de várias raízes na planta, sendo que para a aclimatização *ex vitro* das microestacas, o uso de substratos porosos auxilia na produção de um maior número de raízes secundárias (HARTMANN et al., 2011; KAMPF, 2005; CABEZAS, 2012).

Devido às diferentes características físico-químicas, é necessário definir o melhor substrato para cada espécie e tipo de propágulo (DAMIANI; SCHUCH, 2009). O substrato pode ser formado por um ou pela combinação de diferentes materiais. Para a produção de mudas de espécies florestais é recomendada a utilização de até três tipos de materiais na composição do substrato (GONÇALVES et al., 2000). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aclimatização e o enraizamento *ex vitro* de microestacas de erva-mate em diferentes substratos utilizados puros e em composição.

6.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Foram utilizadas brotações de quatro clones oriundos embriões zigóticos. Os embriões zigóticos foram inoculados de acordo com Horbach et al. (2011). As plântulas formadas tiveram seus ápices podados, que permaneceram *in vitro* para o crescimento de brotações. Em câmara de fluxo laminar, as brotações foram coletadas e levadas para a casa de vegetação, mantendo-se as microcepas *in vitro*. Na casa de vegetação, as microestacas foram padronizadas para 1 cm de comprimento, com um segmento nodal e uma ou duas folhas cortadas pela metade. Após a padronização, as microestacas tiveram sua base imersa em solução de 1.000 mg L⁻¹ de ácido 3-indolibutírico (AIB) por 10 s (QUADROS, 2009) e então colocadas individualmente em copos plásticos drenados contendo o substrato a ser avaliado. Os copos plásticos foram mantidos em bandejas de polietileno drenadas, em câmara úmida, com nebulização intermitente com o auxílio de um umidificador, acionado 12 vezes ao dia por 15 min. a fim de manter a umidade relativa do ar acima de 80%. A câmara úmida estava instalada no interior da casa de vegetação climatizada, regulada para a temperatura máxima de 37°C. Os substratos avaliados foram divididos em dois experimentos:

6.2.1 Experimento 1

As microestacas foram plantadas em substratos utilizados puros. Os substratos avaliados foram: areia de granulometria grossa, casca de arroz carbonizada, vermiculita de granulometria média, fibra de coco, e substrato comercial a base de casca de pinus.

6.2.2 Experimento 2

As microestacas foram plantadas em substratos compostos em iguais proporções de volume. As combinações dos substratos foram: casca de arroz carbonizada e areia grossa; casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial à base de casca de pinus; e casca de arroz carbonizada e substrato comercial à base de casca de pinus.

6.2.3 Avaliações

Os substratos avaliados nos experimentos 1 e 2 foram submetidos à análise físico-química (Laboratório de Análises de Substratos para Plantas – UFRGS) (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise físico-química de substratos utilizados puros e em composição, no enraizamento *ex vitro* de microestacas de erva-mate em casa de vegetação.

Table 1 – Physico-chemical analysis of substrates pure and in composition, in *ex vitro* rooting of holly microcutting at greenhouse.

Análise	Areia grossa	Casca de arroz carbonizada	Substrato comercial	Fibra de coco	Vermiculita	C A* (1:1 v/v)	C S (1:1 v/v)	C A S (1:1:1 v/v)
DU**	1.716,57	402,83	544,62	167,65	172,13	1.104,58	449,68	951,03
DS	1.712,98	306,78	325,89	79,19	146,57	1.058,43	285,23	846,71
PT	40,59	67,68	72,14	81,19	80,88	55,96	68,49	59,71
EA	21,19	27,06	19,54	34,43	22,8	31,2	25,65	24,24
AFD	15,43	12,65	9,92	18,19	7,19	7,39	11,98	12,17
AT	0,4	2,54	3,25	2,44	3,28	1,09	2,92	2,36
AR	3,57	25,43	44,43	26,13	47,61	16,28	27,94	20,94
CRA(10)	19,4	40,62	57,54	46,76	55,15	24,76	42,84	35,47
CRA(50)	3,97	27,97	29,08	28,57	47,66	17,37	30,86	23,3
CRA(100)	3,57	25,43	24,12	26,13	43,08	16,28	27,94	20,94
pH	5,69	5,41	5,52	5,79	7,02	5,84	5,62	5,55
CE	0,25	0,43	1,73	0,54	0,71	0,36	0,51	0,52

*C A-casca de arroz carbonizada e areia grossa; C S-casca de arroz carbonizada e substrato comercial; C A S-casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial.

**DU – densidade úmida (kg m^{-3}); DS – densidade seca (kg m^{-3}); PT – porosidade total (%); EA – espaço de aeração (%); AFD – água facilmente disponível (%); AT – água tamponante (%); AR: água remanescente (%); CRA10, 50 e 100 – capacidade de retenção de água sob sucção de 10, 50 e 100 cm de coluna de água determinado em base volumétrica (%); pH – determinado em água; CE – condutividade elétrica obtida em solução (mS cm^{-1}).

Aos 30 dias após o plantio, as microestacas foram avaliadas quanto à porcentagem de enraizamento, brotação, formação de calo, microestacas inalteradas (quando a estaca estava viva, mas não enraizou, não formou calo e não emitiu brotação) e mortalidade. Aos 60 dias, as microestacas foram avaliadas quanto à porcentagem de enraizamento, brotação, mortalidade e comprimento da maior raiz, sendo então transferidas para bancada sob tela de sombreamento de polietileno com 50% de permeabilidade aos raios solares, para completar a aclimatização na casa de vegetação. As avaliações foram realizadas utilizando técnica não-destrutiva e as variáveis foram avaliadas de maneira independente, ou seja, a mesma microestaca pode ter enraizado e/ou brotado e/ou formado calo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro microestacas cada. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias e, quando necessário, transformados antes da análise estatística. Foi realizada a análise da variância e as médias foram comparadas por teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc. Chicago II).

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Experimento 1

Na avaliação aos 30 dias, os substratos utilizados puros diferiram entre si para a porcentagem de microestacas enraizadas e porcentagem de mortalidade (Tabela 2). A porcentagem média de enraizamento das microestacas foi de 33% (Apêndice 3).

A porcentagem de brotação e a presença de calo foram baixas para todos os tratamentos, com as médias de 4% e 7% respectivamente, e a porcentagem de microestacas inalteradas e mortalidade foi de 30% para essas duas variáveis. A areia grossa proporcionou a maior porcentagem de enraizamento, embora não tenha diferido do substrato comercial, da casca de arroz carbonizada e da vermiculita. A areia grossa também promoveu a menor porcentagem de mortalidade de microestacas, diferindo estatisticamente no substrato comercial e na vermiculita. A fibra de coco proporcionou alta porcentagem de mortalidade (65%), não diferindo da casca de arroz carbonizada.

Tabela 2 – Avaliação das microestacas de erva-mate cultivadas *ex vitro* em casa de vegetação em diferentes substratos utilizados puros, após 30 e 60 dias do plantio. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Table 2 –Evaluation of holly microcuttings cultivated *ex vitro* in a greenhouse at different substrates used pure, after 30 and 60 days after planting. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Substrato	Enraizamento (%)	Brotação (%)	Calo (%)	Inalteradas (%)	Mortalidade (%)
Avaliação realizada aos 30 dias					
Areia grossa	55,0 a*	0,0 ^{ns}	15,0 ^{ns}	30,0 ^{ns}	10,0 a
Casca de arroz carbonizada	35,0 ab	5,0	0,0	25,0	35,0 ab
Substrato comercial	40,0 a	0,0	15,0	35,0	15,0 a
Fibra de coco	5,0 b	10,0	0,0	20,0	65,0 b
Vermiculita	30,0 ab	5,0	5,0	40,0	25,0 a
Média	33,0	4,0	7,0	30,0	30,0
CV %	19,8	6,9	0,6	15,9	29,4
Substrato	Enraizamento (%)	Brotação (%)	Compr. médio da maior raiz(cm)	Mortalidade (%)	
Avaliação realizada aos 60 dias					
Areia grossa	15,0 bc*	10,0 ab	0,13 cd	85,0 b	
Casca de arroz carbonizada	35,0 ab	25,0 ab	0,34 bc	55,0 ab	
Substrato comercial	55,0 a	50,0 a	0,57 ab	30,0 a	
Fibra de coco	0,0 c	0,0 b	0,00 d	75,0 b	
Vermiculita	50,0 a	25,0 ab	0,67 a	30,0 a	
Média	31,0	22,0	0,34	55,0	
CV %	16,0	16,1	17,3	50,8	

*Médias seguidas de letra diferente na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

^{ns}: valores não significativos pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Aos 60 dias, todos os substratos apresentaram diferenças estatísticas para as variáveis analisadas (Tabela 2). A porcentagem média de brotação foi de 22% e o comprimento médio da maior raiz foi 0,34 cm (Apêndice 4). A porcentagem de enraizamento foi maior no substrato comercial, mas não diferiu em vermiculita e em casca de arroz carbonizada. Para mudas seminais de café (*Coffea arabica* L.), o substrato comercial foi eficiente, porém necessita da complementação de nutrientes por meio da aplicação de solução nutritiva (ANDRADE NETO et al. 1999). Entretanto, em pessegueiro (*Prunus persica* L.), o substrato comercial utilizado puro não foi eficiente para o enraizamento e sobrevivência de estacas, quando comparado com a vermiculita utilizada pura (MAYER et al., 2012).

Algumas microestacas que já estavam enraizadas em areia grossa aos 30 dias acabaram não sobrevivendo aos 60 dias, diminuindo a porcentagem de enraizamento aos 60 dias quando comparada aos 30 dias (de 55,0% para 15,0%). Em trabalhos com araçazeiro (*Psidium cattleianum* S.), também foi observado menor enraizamento de estacas quando foi utilizado areia como substrato (NACHTIGAL; FACHINELLO 1995). Para a fibra de coco, todas as microestacas que haviam apresentado raízes e brotos aos 30 dias, não sobreviveram na segunda avaliação, apresentando 0% de porcentagem de enraizamento e de brotação aos 60

dias. Entretanto, na propagação da figueira (*Ficus carica* L.), o uso da fibra de coco pura como substrato foi recomendada por propiciar 86,9% de enraizamento em estacas (PIO et al., 2006).

O substrato de enraizamento que apresenta alta porosidade e baixa densidade, oferece menor resistência ao crescimento radicial (RISTOW et al., 2012). No entanto, o aumento nos valores de densidade seca do substrato pode apresentar efeitos benéficos às mudas, devido ao contato entre o sistema radicial e o substrato, além disso, reduz a perda de água do substrato por evaporação e aumenta a formação de raízes secundárias (LIBARDI, 2005). Todavia, a densidade seca é inversamente relacionada com a porosidade, e, quando a densidade aumenta, ocorre uma restrição ao crescimento das raízes das plantas (SINGH; SINJU, 1998). Os valores de densidade seca e porosidade total apresentaram grande variação entre os substratos avaliados (Tabela 1). A fibra de coco apresentou a menor densidade seca ($79,2 \text{ kg m}^{-3}$) enquanto a areia grossa apresentou a maior ($1.713,0 \text{ kg m}^{-3}$), além de que, a fibra de coco apresentou a maior porosidade total (81%) e a areia apresentou a menor porosidade total (40,6%). Porém, o substrato fibra de coco e areia grossa não foram eficientes para o enraizamento de microestacas de erva-mate (0% e 35% de enraizamento respectivamente). Desta maneira, pode-se presumir que a relação entre a densidade e a porosidade do substrato interferem no enraizamento de microestacas de erva-mate.

6.3.2 Experimento 2

Em substratos compostos, aos 30 dias, a porcentagem de enraizamento, de brotação e mortalidade diferiu entre os tratamentos (Tabela 3). A porcentagem média de enraizamento entre as microestacas foi alta (71,7%), e a porcentagem média de brotação e calo foi de 53,3% e 13,3% respectivamente (Apêndice 5). Em nenhuma das composições de substrato, as microestacas ficaram inalteradas, e a porcentagem de mortalidade entre as microestacas foi de 28,3%.

Os tratamentos compostos por casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial e compostos por casca de arroz carbonizada e substrato comercial propiciaram altas porcentagens de enraizamento (95% e 70% respectivamente), e baixa porcentagem de mortalidade (5% e 30 % respectivamente). Esses resultados confirmam que o uso de substratos compostos pode favorecer o enraizamento adventício de microestacas de erva-mate.

Tabela 3 – Avaliação de microestacas de erva-mate cultivadas *ex vitro* em casa de vegetação após 30 e 60 dias do plantio, utilizando diferentes composições de substratos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Table 3 - Evaluation of holly microcuttings cultivated *ex vitro* in a greenhouse at 30 and 60 days after planting, using different substrate compositions. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Substratos / Composição	Enraizamento (%)	Brotação (%)	Calo (%)	Mortalidade (%)
Avaliação realizada aos 30 dias				
C A *	50,0 b **	15,0 b	25,0 ^{ns}	50,0 b
C S	70,0 ab	75,0 a	5,0	30,0 ab
C A S	95,0 a	70,0 a	10,0	5,0 a
Média	71,67	53,33	13,33	28,33
CV %	34,6	46,3	9,2	22,0

Substratos/ Composição	Enraizamento (%)	Brotação (%)	Compr. médio da maior raiz(cm)	Mortalidade (%)
Avaliação realizada aos 60 dias				
C A *	50,0 b **	15,0 b	0,48 b	50,0 b
C S	80,0 a	70,0 a	1,66 a	20,0 a
C A S	85,0 a	75,0 a	1,83 a	15,0 a
Média	71,67	53,33	1,33	28,33
CV %	25,1	46,3	20,8	1,2

*C A-casca de arroz carbonizada e areia grossa (1:1); C S-casca de arroz carbonizada e substrato comercial a base de casca de pinus(1:1); C A S-casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial a base de casca de pinus (1:1:1). **Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade de erro; ns: valores não significativos pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

O uso de substrato composto também está diretamente relacionado com a maior qualidade das mudas de erva-mate produzidas por sementes (FERRON, 1997). A composição de substratos é preferível, pois dificilmente um material reúne todas as características apropriadas e as condições necessárias requeridas por uma espécie (WENDLING; GATTO, 2002; SCHUCH et al., 2007; FISCHER et al., 2008).

Aos 60 dias, os substratos compostos diferiram entre si para todas as variáveis analisadas (Tabela 3). A porcentagem média de enraizamento, de brotação e de mortalidade foi de 71,7% e 53,3% e 28%, respectivamente, sendo que estes valores não se alteraram, quando comparados com a avaliação realizada aos 30 dias (Apêndice 6). O comprimento médio da maior raiz das microestacas foi de 1,3 cm. No tratamento casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial, houve mortalidade de microestacas já enraizadas aos 30 dias. Este substrato apresentou alta densidade seca (846,7 kg m⁻³) e porosidade de 59,7%, sendo que neste substrato, a porcentagem de enraizamento foi de 85% na avaliação final.

Além da melhoria das propriedades físico-químicas, a mistura de compostos para a formação do substrato pode auxiliar na formação e estabilidade do torrão. Utilizando substratos puros, a estabilidade do torrão será menor, pois haverá partículas de tamanhos

semelhantes o que pode comprometer a agregação das partículas com as raízes das plantas, enquanto que nos substratos formados por misturas de compostos, haverá partículas de tamanhos variáveis dando maior estabilidade ao torrão formado e facilitando todo o processo de produção além de diminuir os danos no sistema radicial no momento da expedição das mudas.

O tratamento composto por casca de arroz carbonizada e areia grossa apresentou a maior mortalidade também aos 60 dias, além do menor comprimento médio da maior raiz e a menor porcentagem de brotação (Tabela 3). Para microestacas de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), a composição substrato comercial mais casca de arroz carbonizada apresentou a maior porcentagem de enraizamento e maior comprimento de raiz (PELIZZA et al., 2011). Entretanto, em estacas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), o comprimento de raízes foi semelhante entre os substratos utilizados em composição (GIACOBBO et al., 2007).

Utilizando a composição de substrato comercial e areia, Meneguete et al. (2004) obtiveram 90 % de sobrevivência em estacas de orquídea (*Epidendrum ibaguense* Lindl.). Comportamento semelhante foi observado no enraizamento de miniestacas de erva-mate, sendo que a composição de casca de arroz carbonizada, substrato comercial e vermiculita foi indicada também por Brondani et al. (2007). Neste estudo, substratos compostos por casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial, e por casca de arroz carbonizada e substrato comercial apresentaram a maior porcentagem de enraizamento, o maior comprimento da maior raiz, as maiores brotações e as menores porcentagens de mortalidade. Analisando o pH dos substratos compostos por casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial, e por casca de arroz carbonizada e substrato comercial, observou-se o valor de 5,55 e 5,62 respectivamente, corroborando com os valores de pH ideal para substratos de 5,5 a 6,5, indicados por Penningsfeld (1983).

Os substratos utilizados puros e em composição apresentaram valores extremamente variados para a densidade úmida, desde 167,65 kg m⁻³ para a fibra de coco, até 1.716,57 kg m⁻³ para areia grossa (Tabela 1). O valor de porosidade total de um substrato, segundo Carrijo et al. (2002), deve estar acima de 85%. Entretanto, os substratos avaliados apresentaram a porosidade total abaixo desta faixa, variando desde 40,6% na areia grossa, até 81,2% na fibra de coco.

Os valores de condutividade elétrica indicado para as espécies florestais são extremamente variáveis, mas, de maneira geral, devem estar entre 1,5 a 3,0 mS cm⁻¹ (BUNT, 1988). Neste estudo, com exceção do substrato comercial, que apresentou condutividade

elétrica nesta faixa ($1,7 \text{ mS cm}^{-1}$), os demais substratos estudados apresentaram valores de condutividade elétrica abaixo do recomendado.

O pH do substrato deve estar entre 5,5 até 6,5, pois nesta faixa, há maior disponibilidade de nutrientes, além de haver a diminuição da toxidez causada por alumínio e manganês nesse substrato (PENNINGSFELD, 1983; DANIEL, 2006). A maioria dos substratos apresentaram o pH nesta faixa, com exceção da casca de arroz carbonizada, que ficou abaixo desta faixa (5,4) e o da vermiculita, que ficou acima desta faixa (7,0).

Em relação às propriedades físico-químicas avaliadas em substratos utilizados puro e em composição, a relação entre densidade seca e porosidade se mostrou como importante fator limitante para o enraizamento de microestacas de erva-mate, da mesma forma, que o pH para o enraizamento deve ser de 5,5 a 5,6.

A caracterização físico-química dos substratos é de fundamental importância, podendo influenciar diretamente no crescimento inicial das plantas (BASTOS et al., 2007; RISTOW et al., 2012). No entanto, deve-se considerar que é difícil obter um substrato que atenda todas as características ideais para determinada cultura, devendo-se selecionar as características mais importantes do substrato para cada espécie vegetal (FERRAZ et al., 2005). Dentre as mais relevantes características físicas e químicas dos substratos relacionadas com a qualidade da mudas, estão a densidade seca e úmida, a porosidade, a disponibilidade de água e ar, os valores de pH e a condutividade elétrica (KAMPF, 2005). No entanto, existem grandes conflitos em relação aos valores ideais destas características para as diferentes espécies e métodos de propagação das plantas.

Nos últimos anos, a casca de arroz carbonizada passou a ser intensamente utilizada como substrato para plantas, tanto na forma pura como misturada a outros materiais, em função de suas características favoráveis (STEFFEN et al., 2010). Segundo Couto et al. (2003), a adição de casca de arroz carbonizada a outros materiais é importante para melhorar as propriedades físicas do substrato. Para espécies florestais, o uso de substratos contendo de 40 a 70% de casca de arroz carbonizada são considerados os mais adequados para o crescimento de mudas (GUERRINI; TRIGUEIRO, 2004). Neste estudo, a casca de arroz carbonizada quando utilizada pura apresentou baixa porcentagem de enraizamento (35%) e alta porcentagem de mortalidade (55%). No entanto, quando a casca de arroz carbonizada foi utilizada em composição com areia grossa e substrato comercial, a porcentagem de enraizamento foi alta (85%) e a porcentagem de mortalidade baixa (15%). Esses resultados mostram que é possível realizar a aclimatização e o enraizamento *ex vitro* de microestacas de erva-mate em câmara úmida na casa de vegetação (Figura 1), com a obtenção de altas

porcentagens de plantas completas. Para tanto, pode-se utilizar substrato composto, em proporções iguais de casca de arroz carbonizada e substrato comercial, ou casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial.



Figura 1 – Microestacas de erva-mate: A – Vista geral das microestacas de erva-mate enraizadas *ex vitro*, em casa de vegetação em câmara úmida, utilizando diferentes composições de substratos. B – Detalhe das raízes adventícias em microestacas de erva-mate, em avaliação aos 60 dias. C – Detalhe da microestaca plantada em copos plásticos drenados contendo substrato em composição e dispostos em casa de vegetação. D – Microestaca de erva-mate, com sistema radicial e parte aérea após 60 dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Figure 1 – Holly microcuttings: A – Overview of holly microcuttings rooted *ex vitro*, at greenhouse in humid chamber, using different substrate compositions. B - Detail of adventitious roots in holly microcuttings, in assessment at 60 days. C - Microcuttings detail planted in drained plastic cups containing substrate in composition and arranged in greenhouse. D - Holly microcutting, with root system and shoots after 60 days. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

6.4 Conclusões

Microestacas de erva-mate podem ser aclimatizadas e enraizadas *ex vitro* com substrato composto em proporções iguais de casca de arroz carbonizada e substrato comercial ou casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial.

6.5 Referências Bibliográficas

ANDRADE NETO, A.; MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, P. T. G. Avaliação de substratos alternativos e tipos de adubação para a produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 270-280, 1999.

BASTOS, D.C.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; LIBARDI, M. N.; ALMEIDA, L. F. P.; ENTELMANN, F. A. Diferentes substratos na produção de porta-enxertos de caramboleira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.312-316, 2007.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; SANTIN, D.;BENEDETTI, E. L.;ROVEDA, L. F.; ORRUTÉA, A. G. Ambiente inicial de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. **Scientia Agrária**, Curitiba, v.8, n.3, p. 257-267, 2007.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; ARAÚJO, M. A.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F. Composições de substratos e ambientes de enraizamento na estaquia de *Ilex paraguariensis* a. St.-hil. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 1, p. 41-49, 2009.

BUNT, A.C. **Media and mixes for container grown plants: a manual on the preparation and use of growing media for pot plants**. London: Unwin Hyman, 1988. 309p.

CABEZAS, W. P. V. **Desenvolvimento e qualidade de mudas clonais de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em função da adubação fosfatada em substratos**. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R.S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 533-535, 2002.

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A.C. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Mirabolano (*Prunus cerasifera* E) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, p.125-128, 2003.

DAMIANI, C. R.; PELIZZA, T. R.; SCHUCH, M. W.; RUFATO, A. R. Luminosidade e IBA no enraizamento de microestacas de mirtilheiro dos grupos *rabbiteye* e *southern highbush*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p. 650-655, 2009.

DANIEL, O. **Silvicultura**, Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Agrárias. Brasil, 2006. 196p.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SUTTER, E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, n. 2, p. 225-232, 1995.

FERRAZ, M. V.; CENTURION, J. F.; BEUTLER, A. N. Caracterização física e química de alguns substratos comerciais. **Acta Scientiarum Agr.** V. 27, n. 2, p. 209-214, 2005.

FERRON, R. M. Produção de mudas de erva-mate em tubetes plásticos. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...** Colombo: Embrapa, 1997, p. 153-172 (Documentos, 33).

FISCHER, D. L. O.; FACHINELLO, J. C.; ANTUNES, L. E. C.; TOMAZ, Z. F. P.; GIACOBBO, C. L. Efeito do ácido 3-indolibutírico e da cultivar no enraizamento de estacas lenhosas de mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 285-289, 2008.

GIACOBBO, C. L.; FACHINELLO, J. C.; BIANCHI, V. J. Enraizamento de estacas do porta-enxerto de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. EMC, em diferentes substratos, concentrações de ácido 3-indolibutírico e enxertia de raiz. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 64-70, 2007.

GONÇALVES, J. L. M.; SANTARELLI, E. G.; MORAES NETO, S. P.; MANARA, M. P. **Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização.** In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. Nutrição e fertilização florestal. Piracicaba, IPEF, p.309-350, 2000.

GUERRINI, I. A.; TRIGUEIRO, R. M. Atributos físicos e químicos de substratos compostos por bio sólidos e casca de arroz carbonizada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, n. 28, p.1069-1076, 2004.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; JUNIOR DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900 p.

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

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Org.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 71- 86.

KAMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agrolivros, 2005, 256p.

LIBARDI, P. L. **Dinâmica da água no solo**. Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2005, 344p.

LITZ, R. E. Cultivo de embriones y óvulos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A.; (Org.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: CIAT, 1991, p. 295-312.

MACIEL, S. C.; VOLTOLINI, J. A.; PEDROTTI, E. L. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira marubakaido micropropagado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 2, p. 289-292, 2002.

MAYER, N. A.; VARGAS, D. P.; CUNHA, P. M.; PEREIRA, J. F. M.; UENO, B. Clonagem de porta-enxertos de pessegueiro em citropotes. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012 **Anais...**Bento Gonçalves, 2012. p. 5310-5313.

MENEGUCE, B.; OLIVEIRA, R. B. D; FARIA, R. T. Propagação vegetativa de *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2004.

MENEZES JÚNIOR, F. O. G.; FERNANDES, H. S.; MAUCH, C. R.; SILVA, J. B. Caracterização de diferentes substratos e seu desempenho na produção de mudas de alface em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, n. 3, p.

NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C. Efeito de substratos e do ácido 3-indolibutírico no enraizamento de estacas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.1, p. 34-39, 1995.

NOGUEIRA, A.C. Germinação de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl em diferentes substratos e temperaturas. **Informativo Abrates**, Londrina, v.11, n.2, p.274, 2001.

PELIZZA, T. R.; DAMIANI, C. R.; RUFATO, A. R.; SOUZA, A. L. K.; RIBEIRO, M. F.; SCHUCH, M. W. Microestaquia em mirtilheiro com diferentes porções do ramo e substratos. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p.319-324, 2011.

PENNINGSFELD, F. Kultursubstrate für den gartenbau, besonders in Deutschland: ein kritischer Überblick. **Plant and Soil**, The Hague, v.75, p.269-281, 1983.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; CHALFUN, N. N. J.; GONTIJO, T. C. A.; MENDONÇA, V.; CARRIJO, E. P.; CHAGAS, E. A. Propagação de estacas apicais de figueira: diferentes ambientes, ácido 3-indolibutírico e tipo de estaca. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 30, n. 5, p. 1021-1026, 2006.

POLETTI, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate/podridão-de-raízes**. 97 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

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

RISTOW, N. C.; ANTUNES, L. E. C.; CARPENEDO, S. Substratos para o enraizamento de microestacas de mirtilheiro cultivar georgiagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 262-268, 2012.

SCHUCH, M. W. et al. AIB e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. “Climax” através de microestaquia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1446-1449, 2007.

SINGH, B.P.; SINJU, U.M. Soil physical and morphological properties and root growth. **Horticulture Science**, Alexandria, v. 33, p. 966-971, 1998.

STEFFEN, G. P. K.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, R. B.; BELLÉ, R. Húmus de esterco bovino e casca de arroz carbonizada como substratos para a produção de mudas de boca-de-leão. **Acta Zoológica Mexicana**, Caracas, n. 2, p. 345-357, 2010.

STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas – CNPF, 1988, 10 p. (Circular Técnica, 17).

WENDLING, I.; GATTO, A. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa, MG: Aprenda fácil, 2002. v. 2, 146p.

7 CAPÍTULO III

PROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE POR MINIESTAQUIA

RESUMO

A erva-mate é uma espécie arbórea de grande importância na sua região de ocorrência. Devido aos problemas relacionados à propagação por sementes, estudos visando o melhor conhecimento dos fatores que influenciam o enraizamento adventício de erva-mate são de grande valor. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de clones de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) em minijardim clonal instalado no sistema fechado de cultivo em areia, e o uso do ácido 3-indolibutírico (AIB) na sobrevivência e competência ao enraizamento de miniestacas. Foram avaliados quatro clones de erva-mate (CE1, CE2, EF6 e EF7), em duas coletas de miniestacas. Após a coleta e padronização, as miniestacas foram tratadas com ou sem AIB. Essas tiveram sua base imersa em solução de 1.000 mg L⁻¹ de AIB ou em água de torneira por 10 segundos, e então colocadas em copos plásticos drenados contendo substrato composto por casca de arroz carbonizada, areia de granulometria grossa e substrato comercial a base de casca de pinus (1:1:1) e dispostas em câmara úmida localizada no interior da casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi o fatorial de quatro clones e duas doses de AIB (com ou sem AIB) no delineamento inteiramente casualizado, com 18 repetições de número variável de miniestacas por repetição. Ao todo, foram avaliadas 1.079 miniestacas. As avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias quanto à porcentagem de sobrevivência, miniestacas inalteradas, formação de calo e broto e enraizamento. Na segunda coleta, foi realizado o acompanhamento da evolução do enraizamento para os quatro clones, quantificando as miniestacas enraizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo. A porcentagem de sobrevivência das miniestacas foi alta (91,9%) e os clones diferem no período de indução à iniciação radicial e na competência ao enraizamento, sendo que a aplicação de ácido 3-indolibutírico na dose de 1.000 mg L⁻¹ não afeta o enraizamento de miniestacas de erva-mate. O sistema fechado de cultivo em areia é viável

para a condução e o manejo de minicepas de erva-mate visando à produção de mudas pela miniestaquia.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire. Minijardim clonal. Produção de mudas.

PROPAGATION OF HOLLY BY MINICUTTINGS

ABSTRACT

Holly is a tree of great importance in his region of occurrence. Due to problems related of holly propagation by seed, studies aiming better understand the influence factors of holly adventitious rooting are of major value. The objective of this study was to evaluate the behavior of holly clones (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire.) in clonal minigarden installed in a closed cultivation system with sand and the use of 3-indolibutíric acid (IBA) on survival and rooting competence of minicuttings. Were evaluated four holly clones (CE1, CE2, and EF6 EF7), in two minicutting collections. After collection and standardization, the minicuttings were treated with or without IBA. These has your base immersed in a solution of 1000 mg L⁻¹ IBA or in tap water for 10 seconds, and then placed in drained plastic cups containing composed substrate of carbonized rice husk, coarse sand and commercial substrate based on pinus bark (1:1:1) and placed in a humid chamber located inside the greenhouse. The experimental design used was factorial to four clones and two doses of IBA (with or without IBA) in a completely randomized design, with 18 replications from variable number of minicuttings through repetition. Altogether, 1,079 minicuttings were evaluated. Evaluations were performed at 30 and 60 days for percentage of survival, unchanged cuttings, callus and shoot formation and rooting. In the second collection, was performed a rooting evolution monitoring for the four clones, quantifying the rooted minicuttings at 15, 30, 45, 60 and 75 days of cultivation. The minicuttings survival percentage was high (91.9%) and the clones differ in induction period for root initiation and competence to rooting, whereas the application of 3-indolibutíric acid at a dose of 1.000 mg L⁻¹ does not affect the rooting of holly minicuttings. The closed system of cultivation in sand is feasible for the conduct and management of holly ministumps aiming the production of seedlings by minicuttings.

Keywords: *Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire. Clonal minigarden, Plantlet production.

7.1 Introdução

A maior parte da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire) produzida no Sul do Brasil provém de ervais nativos ou de plantas originadas de sementes, sem critérios de seleção das plantas matrizes (WENDLING, 2004). O uso de matrizes não selecionadas afeta a produtividade e a qualidade das mudas e dificulta a multiplicação de clones superiores para o estabelecimento de plantios comerciais (DIAS et al., 2012). As sementes de erva-mate possuem baixa qualidade fisiológica e dormência por imaturidade embrionária e pelo tegumento impermeável, necessitando passar por um período de estratificação que dificulta a produção uniforme de mudas. Além disso, os povoamentos formados por mudas de origem seminal dificulta o manejo dos plantios e acarreta a diminuição da qualidade do produto final, podendo comprometer o sucesso do empreendimento (XAVIER et al., 2003). Como alternativa, a propagação vegetativa pode superar as limitações da produção de mudas por sementes (SANTOS, 2002; WENDLING, 2004).

Denomina-se minijardim clonal o conjunto de minicepas estabelecidas em casa de vegetação, que se destina à produção de propágulos vegetativos visando o enraizamento pela técnica de miniestaquia (ALFENAS et al., 2009). Atualmente, a miniestaquia representa o principal método adotado por viveiros florestais para clonagem de eucalipto (ALFENAS et al., 2009). A miniestaquia é um método de propagação vegetativa que pode ser adaptada e utilizada com eficácia na propagação de espécies, como a erva-mate (SANTOS, 2002) e obter vantagens similares aos alcançados na clonagem do eucalipto (DIAS et al., 2012). Este método, considerado uma otimização da estaquia convencional, apresenta algumas vantagens, como a redução de área para a instalação do minijardim clonal e de custos de manejo das mudas, além de proporcionar maior qualidade, velocidade e percentual de enraizamento quando comparada à estaquia convencional (XAVIER et al., 2003; WENDLING, et al., 2007).

A implantação dos minijardins clonais deve ser realizada com materiais rejuvenescidos, para permitir a obtenção de maior vigor e qualidade dos brotos produzidos, além de apresentarem maior competência para o enraizamento das miniestacas (ALFENAS et al., 2009). Entretanto, esse método não tem se mostrado viável economicamente para todas as espécies, sobretudo pela falta de conhecimento e domínio tecnológico do processo de maturidade e rejuvenescimento dos tecidos vegetais e ainda dos fatores inerentes à indução de

raízes adventícias (ANDREJOW, 2006; DIAS et al., 2012), o que requer ajustes e adaptações da técnica para cada espécie.

O minijardim clonal de espécie florestal, normalmente, é estabelecido em tubetes individuais, ou em sistema de canaletões, sob teto translúcido e inundação temporária. A instalação destas estruturas é bastante onerosa, não sendo apropriado à todo tipo de viveiro ou casa de vegetação (XAVIER, 2002; ALFENAS et al., 2009; ANDREJOW, 2006). Outros tipos de sistemas foram desenvolvidos para espécies anuais, tais como o sistema fechado de cultivo em areia, com sub-irrigação por inundação (BISOGNIN, 2007). Este sistema propicia a maximização da produção de material vegetativo, a redução dos custos de instalação e manutenção e a facilidade do manejo das plantas. Para a erva-mate, este sistema está sendo adaptado, principalmente no que se refere ao manejo e a condução das minicepas para a coleta das miniestacas. Cabe ressaltar que são escassas as pesquisas de manejo e produção de minijardim clonal para espécies nativas (DIAS et al., 2012), principalmente com minicepas oriundas de propagação vegetativa.

Independente do sistema utilizado para a instalação do minijardim clonal, a padronização da qualidade das miniestacas é fundamental para o sucesso da miniestaquia (ALFENAS et al., 2009). Portanto, é necessário conhecer a resposta de clones e os fatores que afetam o enraizamento das miniestacas, bem como a necessidade de aplicação de reguladores de crescimento, como por exemplo, ácido 3-indolibutírico (AIB). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a propagação de clones de erva-mate e o uso de ácido 3-indolibutírico para o enraizamento das miniestacas.

7.2 Material e Métodos

O estudo foi realizado na casa de vegetação climatizada do Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. O minijardim clonal foi estabelecido em sistema fechado de cultivo com o leito de areia, instalado no interior da casa de vegetação, com temperatura mínima de 15 °C e máxima de 37 °C, sem controle de umidade.

O minijardim clonal foi constituído por uma bandeja de polietileno (55 x 34 x 15 cm), onde foi adicionada uma camada de 7 cm de brita média para drenagem da solução e uma tela fina de polietileno para separar a brita do substrato, formado por uma camada de 5 cm de

areia grossa lavada (partículas entre 1 e 3 mm de diâmetro). A drenagem da solução nutritiva ocorreu por dois orifícios dispostos na parte frontal da bandeja (Figura 1). O substrato foi coberto por plástico de dupla face (com a face branca para cima), com aberturas para receber as plantas espaçadas de 10 x 10 cm, sendo estabelecidas 12 plantas matrizes em cada bandeja.

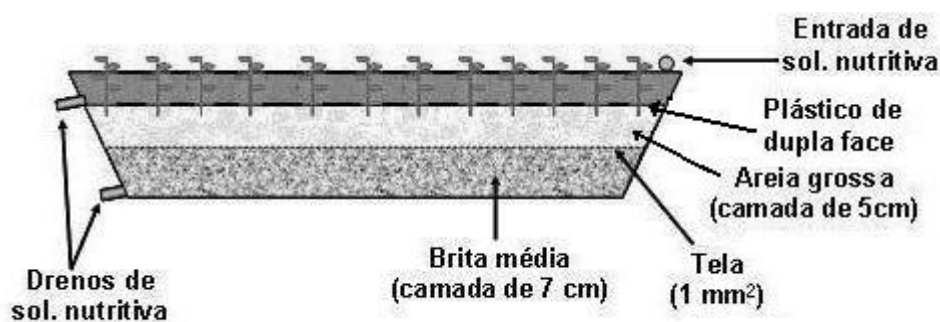


Figura 1 – Desenho mostrando organização dos estratos do minijardim clonal, instalado em bandeja de polietileno, em sistema fechado de cultivo em areia e com fertirrigação sob inundação, utilizado para a manutenção e condução de minicepas de erva-mate, adaptado de Bandinelli (2009).

Figure 1 – Drawing showing the organization of strata from clonal minigarden, installed on polyethylene tray, in closed system of cultivation with sand and under flood fertigation, used for maintaining and conducting of holly ministumps, with adaptation from Bandinelli (2009).

O minijardim clonal recebeu irrigações diárias de 15 min., com o auxílio de uma bomba submersa de baixa vazão, acionada por um controlador de horário. A irrigação encharcava totalmente o substrato até formar uma lâmina de solução nutritiva na superfície (sub-irrigação por inundação). O nível da lâmina de solução nutritiva era controlado pelo dreno da parte inferior da bandeja. Como o sistema de cultivo era fechado, o excedente de solução nutritiva era coletado e retornava para o reservatório, e ficava armazenada até ser novamente utilizada (Figura 2).

A solução nutritiva foi modificada de Wendling et al. (2007) e foi constituída pelos seguintes nutrientes: 54,20 mg L⁻¹ de N na forma de nitrato; 69,90 mg L⁻¹ de N na forma de amônio; 16,28 mg L⁻¹ de P; 170,68 mg L⁻¹ de K; 161,40 mg L⁻¹ de Ca; 33,70 mg L⁻¹ de Mg; 79,65 mg L⁻¹ de S; 0,50 mg L⁻¹ de B; 0,50 mg L⁻¹ de Cu; 5 mg L⁻¹ de Fe; 1 mg L⁻¹ de Mn; 0,2 mg L⁻¹ de Zn; 0,07 mg L⁻¹ de Mo. A solução nutritiva foi diluída para 50% da concentração original. O pH e a condutividade elétrica corrigidos duas vezes por semana. O pH foi mantido em 6,0 (com o uso de HCl ou NaOH) e a condutividade elétrica para 1000 µS/cm (com o uso de água de torneira ou solução nutritiva concentrada).

Foram avaliados os clones CE1, CE2, EF6 e EF7. Os clones CE1 e CE2 foram provenientes de microestacas enraizadas *ex vitro* e aclimatizadas em casa de vegetação, conforme descrito no capítulo 2, sendo as mudas formadas transferidas para o minijardim clonal. Os clones EF6 e EF7 foram provenientes de estacas enraizadas de brotações epicórmicas estimuladas pelo fogo de duas matrizes adultas com 10 anos de idade, selecionadas em povoamento localizado na Área Experimental do Departamento de Ciências Florestais da UFSM, as quais foram numeradas e etiquetadas. Após enraizamento e aclimatização, as mudas formadas foram transferidas para o minijardim clonal.

Para a transferência das mudas para o minijardim clonal, as plantas tiveram suas raízes lavadas, para a retirada total do substrato, e então, foram acomodadas no leito de areia grossa. A poda de formação foi realizada 90 dias após o estabelecimento das plantas no minijardim clonal, a 8 cm de altura, sendo deixadas as folhas que estavam abaixo da altura do corte (Figura 2). Quatro dias antes e após à poda de formação, o minijardim clonal foi irrigado somente com água de torneira.

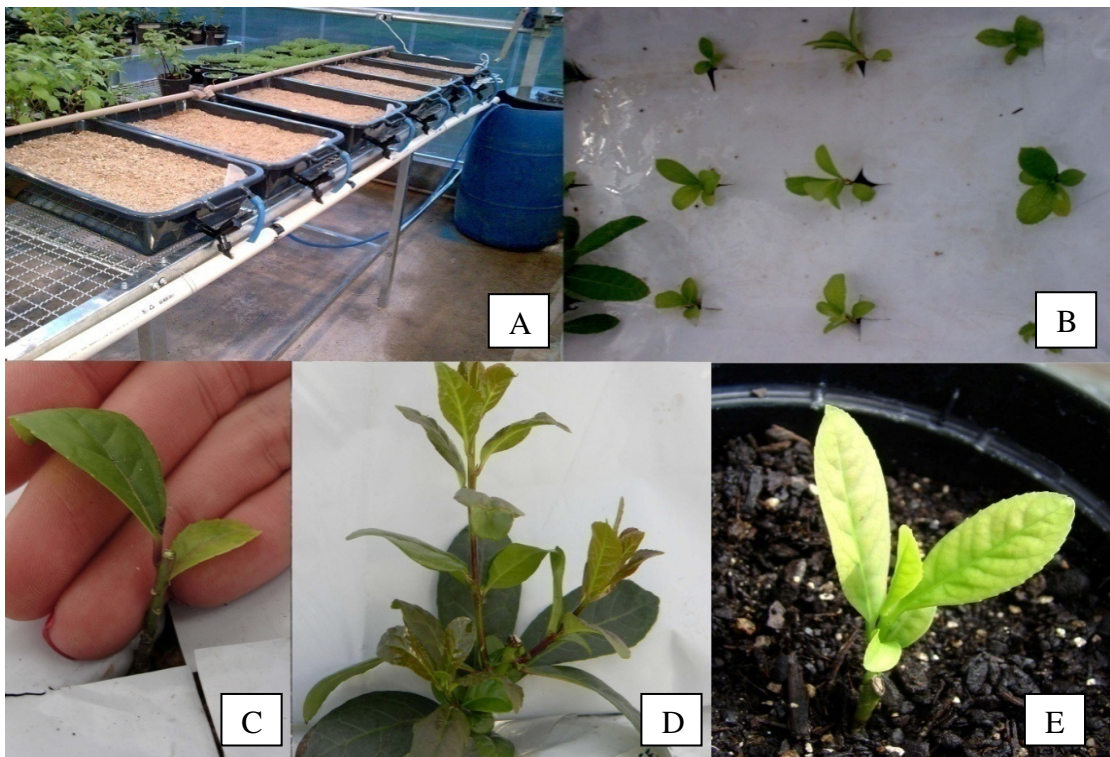


Figura 2 – Instalação do minijardim clonal de erva-mate em bandeja de polietileno: A – Instalação do sistema fechado de cultivo em areia, sobre bancada da casa de vegetação; B – Instalação das mudas no sistema de cultivo sem solo; C – poda de formação das plantas; D – emissão das brotações após poda de formação; E – miniestaca enraizada em câmara úmida. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Figure 2 – Installation of holly clonal minigarden on polyethylene tray: A - Installation of system of cultivation with sand on the greenhouse bench; B - Installation of plantlets in soilless system; C - formation pruning plants; D - issuance of shoots after pruning formation; E - minicuttings rooted in humid chamber. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

A coleta das brotações para o preparo das miniestacas foi efetuada sempre que os ramos apresentavam-se lignificados, mas ainda flexíveis, de onde foram preparadas as miniestacas de gema única e, sem a porção apical, com tamanho de 1,5 cm, um segmento nodal e uma folha reduzida pela metade. Todas as miniestacas foram plantadas em copos plásticos drenados, com capacidade para 50 mL. O substrato foi composto de iguais proporções de areia grossa, casca de arroz carbonizada e substrato comercial à base de casca de pinus. Os cultivos foram mantidos em copos plásticos com drenos, acomodados em bandeja drenada de polietileno (55 x 34 x 15 cm) e dispostas em câmara úmida para o enraizamento.

O enraizamento das miniestacas foi realizado em câmara úmida que foi instalada no mesmo ambiente, e com sistema de nebulização intermitente (umidificador), programado para acionar por 1 minuto sete vezes ao dia, visando manter a umidade relativa do ar acima de 80%.

As miniestacas foram provenientes de duas coletas, sendo tratadas com ou sem AIB. As miniestacas tratadas tiveram sua base imersa em solução de 1.000 mg L⁻¹ de AIB por 10 segundos e então colocadas no substrato. No tratamento sem AIB, as miniestacas tiveram sua base imersa em água de torneira.

Aos 30 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, de miniestacas inalteradas e de emissão de calo e broto. Aos 60 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, de miniestacas inalteradas, de emissão de calo e broto e a porcentagem de enraizamento. Na segunda coleta foi acompanhada a evolução do enraizamento, quantificando as miniestacas enraizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo.

Foi utilizado um fatorial de clones (CE1, CE2, EF6, EF7) e aplicação de AIB (0 e 1.000 mg L⁻¹) no delineamento inteiramente casualizado, totalizando oito tratamentos, com 18 repetições de miniestacas oriundas de duas coletas e com número variável de miniestacas por repetições (no mínimo 5), totalizando 1.079 miniestacas. Foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias e, quando necessário, transformados antes da análise estatística, realizada com o auxílio do programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal).

7.3 Resultados e Discussão

Não foi verificada interação entre clones e uso de AIB para todas as variáveis analisadas (Tabela 1). Os clones diferiram entre si para todas as variáveis analisadas aos 30 e 60 dias (Apêndice 7-13).

Aos 30 dias, a porcentagem de sobrevivência entre as miniestacas foi de 82,4%. O AIB propiciou influência na porcentagem de miniestacas inalteradas e na emissão de calo e broto. Miniestacas tratadas com AIB apresentaram maior porcentagem de miniestacas inalteradas e menor porcentagem de emissão de calo e broto. A porcentagem média de miniestacas inalteradas foi de 60,3% e a emissão média de calo e broto em miniestacas foi de 22,3%.

Aos 60 dias não houve influência do AIB nas variáveis estudadas. A porcentagem de miniestacas sobreviventes foi 91,9%, de miniestacas inalteradas foi 34,2%, a emissão de calo e broto foi de 56,5% e a porcentagem de enraizamento de miniestacas foi 7,3%.

Tabela 1 – Valores do F calculado, média geral e coeficiente de variação para a sobrevivência, miniestacas inalteradas, emissão de calo e broto e enraizamento em miniestacas de erva-mate em avaliação aos 30 e 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2013.

Table 1 – Values of F calculated, overall mean and coefficient of variation for survival, unchanged minicuttings, callus formation and shoot and rooting in holly minicuttings in assessment at 30 and 60 days. Santa Maria, UFSM, 2013.

Fonte de Variação	Sobrevivência	Inalteradas	Calo e broto	
Avaliação aos 30 dias				
Clone (A)	4,39*	14,03*	7,68*	
AIB (B)	0,00 ^{ns}	9,39*	5,08*	
A X B	0,69 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,57 ^{ns}	
Média (%)	82,4	60,3	22,3	
CV %	20,5	22,9	65,7	
Fonte de Variação	Sobrevivência	Inalteradas	Calo e broto	Enraizamento
Avaliação aos 60 dias				
Clone (A)	11,41*	36,16*	24,93*	21,81*
AIB (B)	0,39 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,67 ^{ns}
A X B	0,13 ^{ns}	1,96 ^{ns}	1,07 ^{ns}	0,71 ^{ns}
Média (%)	91,9	34,2	56,5	7,3
CV %	16,1	55,7	40,2	16,6

* valores significativos a 5 % de probabilidade de erro, pelo teste F.

^{ns} valores não significativos a 5 % de probabilidade de erro, pelo teste F.

Aos 30 dias, a porcentagem de sobrevivência foi alta em todos os clones, no entanto, a maioria das miniestacas sobreviventes ainda permaneciam inalteradas (Tabela 2). Miniestacas coletadas do clone EF7 e CE1 apresentaram maior porcentagem de sobrevivência, não diferindo estatisticamente do clone CE2. A maior porcentagem de miniestacas inalteradas foi observada nos clones CE1 e EF7. A emissão de calo e broto foi maior entre miniestacas do clone CE2, não diferindo do clone EF6.

Tabela 2 – Porcentagem de sobrevivência, miniestacas inalteradas, formação de calo e broto e enraizamento em miniestacas de erva-mate oriundas de quatro clones (CE1, CE2, EF6 e EF7) e avaliadas 30 e 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2013.

Table 2 – Percentage of survival, unchanged minicuttings, callus and shoot formation and rooting in holly minicuttings belonging to four clones (CE1, CE2, and EF6 EF7) and evaluated at 30 and 60 days. Santa Maria, UFSM, 2013.

Clone	Sobrevivência (%)	Inalteradas (%)	Calo e broto (%)	
Avaliação aos 30 dias				
CE1	84,0 a*	71,7 a	12,3 b	
CE2	83,4 ab	47,2 b	36,2 a	
EF6	74,8 b	55,2 b	20,2 ab	
EF7	87,4 a	67,0 a	20,3 b	
Clone	Sobrevivência (%)	Inalteradas (%)	Calo e broto (%)	Enraizamento (%)
Avaliação aos 60 dias				
CE1	87,5 b	27,7 b	55,5 b	25,9 a
CE2	96,6 a	13,2 b	83,4 a	2,2 b
EF6	84,4 b	27,0 b	56,9 b	0,9 b
EF7	99,0 a	68,9 a	30,1 c	0,0 b

*Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade de erro.

Aos 60 dias, as miniestacas do clone EF7 e CE2 apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência (Tabela 2). O clone EF7 apresentou a maior porcentagem de miniestacas inalteradas e a menor porcentagem de formação de calo e broto. A maior porcentagem de enraizamento foi entre as miniestacas do clone CE1 (25,9%), não diferindo estatisticamente dos demais clones. O clone EF7 apresentou alta porcentagem de sobrevivência e de porcentagem de miniestacas inalteradas, porém apresentou baixa porcentagem de emissão de calo e broto e não apresentou miniestacas enraizadas aos 60 dias.

A porcentagem média de sobrevivência de miniestacas aos 60 dias foi alta (91,9%). A porcentagem de sobrevivência das mudas é um parâmetro bastante utilizado como indicador

da eficiência da produção de mudas via miniestaquia. Comparativamente, as miniestacas de cedro rosa (*Cedrela fissilis* Vell.) apresentaram 79% de sobrevivência, sendo a miniestaquia considerada uma técnica viável para a produção de mudas desta espécie (XAVIER, et al., 2003). Da mesma forma, miniestacas de erva-mate coletadas de minicepas oriundas de estaquia convencional, apresentaram sobrevivência de 61,3% após 90 dias de cultivo (BRONDANI et al., 2008). Diante do exposto, os valores de sobrevivência alcançados neste estudo estão condizentes aos encontrados na literatura para a viabilidade da técnica da miniestaquia, principalmente em relação às miniestacas coletadas de minicepas oriundas de estaquia convencional.

Entre os clones, houve grandes diferenças em relação às variáveis analisadas. Os clones EF7 e CE2 apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência, o clone EF7 apresentou maior porcentagem de miniestacas inalteradas, o clone CE2 apresentou maiores porcentagens de formação de calo ou broto, e o clone CE1 apresentou maior enraizamento.

Em relação ao uso do AIB, não houve benefícios na sobrevivência e enraizamento de miniestacas. Similarmente, há estudos evidenciando que, para várias outras espécies como a figueira (*Ficus carica* L.) (PIO et al, 2006), o quivi (*Actinidia deliciosa* A.Chev) (MANFROI et al., 1997), o louro-pardo (*Cordia trichotoma* V.) (KIELSE, 2012), clones de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) (TITON et al., 2003), o mogno (*Swietenia macrophylla* K.) (SANTOS, 2002), o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (TAGLIANI et al., 2010), o uso de AIB não auxilia no enraizamento de miniestacas. A falta de influencia do AIB no enraizamento pode ocorrer em função das miniestacas já possuírem níveis adequados de auxina endógena, sem a necessidade de aplicação exógena de AIB para promover o enraizamento (PIO et al., 2006).

No caso da necessidade de AIB para estimular o enraizamento, de custo elevado, deve-se ter o máximo de cuidado para não inviabilizar o empreendimento (ATROCH et al., 2007). Portanto, o enraizamento de miniestacas sem o fitoregulador AIB repercute diretamente na redução de custos de produção.

A porcentagem de enraizamento foi baixa para os clones CE2, EF6 e EF7. Inclusive, o clone EF7 não apresentou miniestacas enraizadas até a avaliação aos 60 dias. Entretanto, para o mesmo período, a porcentagem de sobrevivência foi alta e com a presença de miniestacas ainda inalteradas. Portanto, as miniestacas tardaram mais a apresentar raízes, necessitando maiores períodos de manutenção dessas em casa de vegetação.

Analisando a evolução do enraizamento das miniestacas por clone, se verificou que os clones apresentaram comportamento diversos quanto ao período de emissão de raízes (Figura

3). No Clone CE1, miniestacas tratadas com AIB iniciaram o enraizamento aos 30 dias, enquanto estacas tratadas sem AIB iniciaram enraizamento aos 45 dias. Miniestacas do clone CE2 tratadas com ou sem AIB iniciaram o enraizamento aos 45 dias. No clone EF6, as miniestacas tratadas com AIB enraizaram somente aos 75 dias, enquanto miniestacas tratadas sem AIB já apresentavam raízes aos 60 dias. Miniestacas do clone EF7 iniciaram o enraizamento aos 75 dias no tratamento com ou sem AIB.

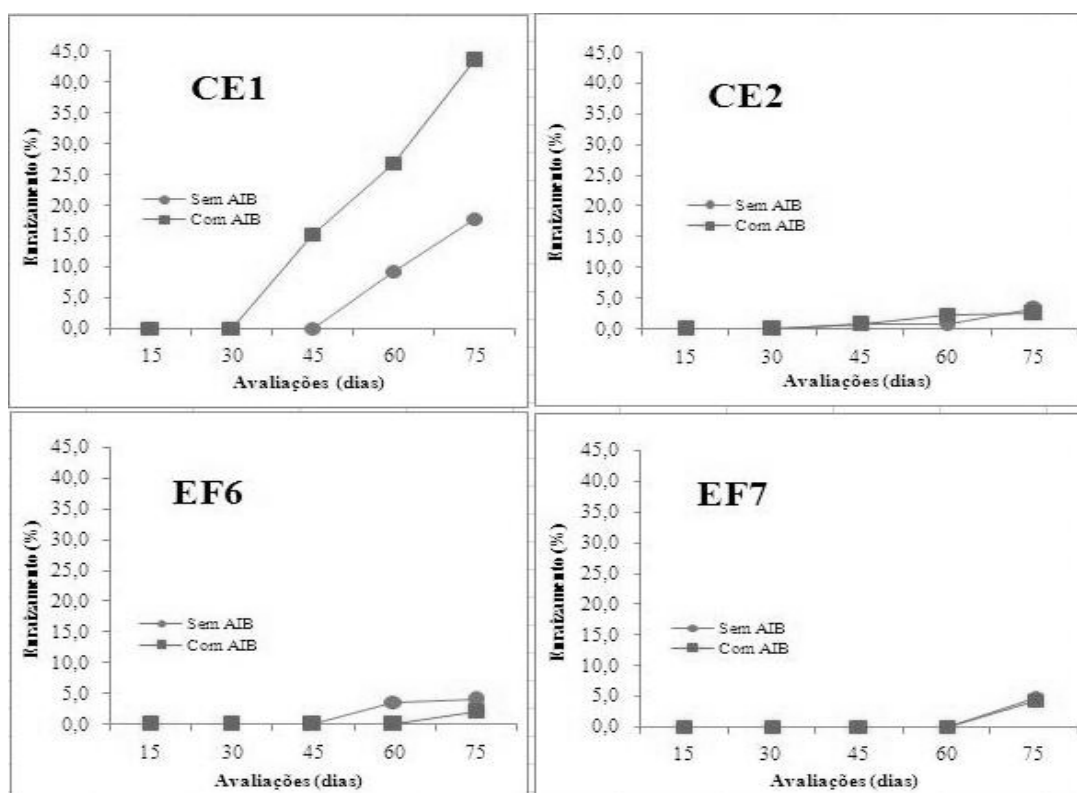


Figura 3 – Evolução do enraizamento de miniestacas de quatro clones de erva-mate (CE1, CE2, EF6 e EF7), tratadas com ou sem AIB (1000 ml L⁻¹) ao longo de cinco avaliações (15, 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Figure 3 – Evolution percentage of rooting of minicuttings from four holly clones (CE1, CE2, EF6 and EF7), treated with or without IBA (1000ml L⁻¹) over five evaluations (15, 30, 45, 60 and 75 days of cultivation). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Como os clones estudados possuem origens diferentes (micropropagação e resgate de material adulto), eram esperados resultados variáveis quanto à porcentagem de enraizamento e período de emissão de raízes. Em minijardim clonal de erva-mate oriundo de sementes, Wendling et al. (2007) obtiveram miniestacas enraizadas em 60 dias. No entanto, similar aos resultados encontrados neste estudo, Oliveira et al. (2001) observaram variação de 60 a 120 dias para a formação de raízes adventícias de diversas espécies nativas.

Sendo assim, a sobrevivência das miniestacas foi alta, mas o enraizamento tardou a iniciar. Como o AIB não influenciou estatisticamente as miniestacas para as variáveis estudadas, pode-se inferir que algum outro fator pode ter influenciado na resposta de enraizamento dos clones. Sabe-se que o ambiente de enraizamento ou o período de coleta dos propágulos vegetativos podem acarretar grandes variações na sobrevivência e enraizamento desses. Dentre os principais fatores que influenciam o enraizamento de propágulos pode-se destacar a umidade e a temperatura (ALFENAS et al., 2009; BRONDANI, et al., 2008; HARTMANN, 2011; DIAS et al., 2012). Desta maneira, o sucesso no enraizamento de miniestacas depende da utilização de clones selecionados além do controle desses fatores influentes.

O enraizamento parece ter sido influenciado pela formação de calo, pois anterior ao enraizamento, a maioria das miniestacas formaram calo (Figuras 4). Em alguns casos, somente a partir do calo é possível observar o surgimento dos primórdios radiciais (DIAS et al., 2012 b; FAGANELLO, 2012).

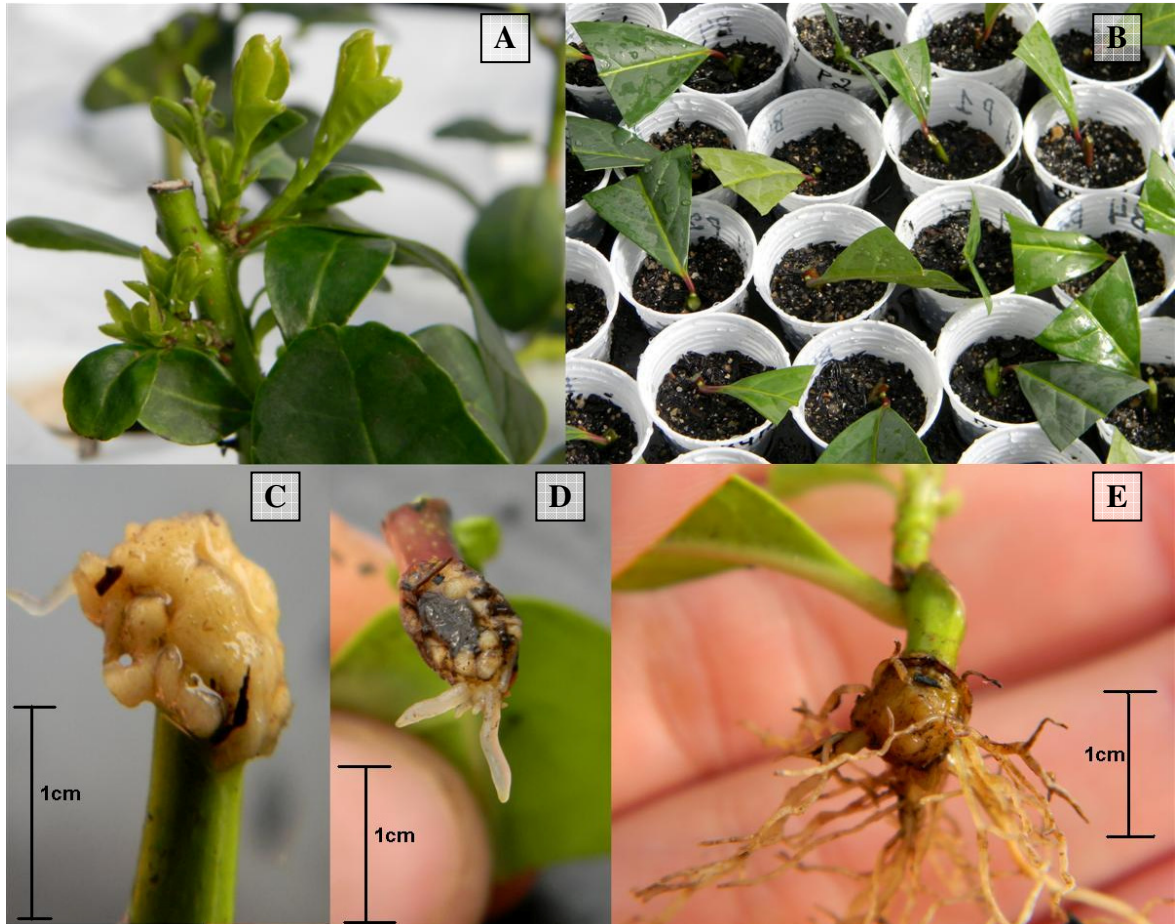


Figura 4 –Miniestacas de erva-mate: A – brotações das minicepas para posterior coleta e secção em miniestacas; B – miniestacas plantadas em copos plásticos drenados e dispostas em câmara úmida C, D, E – detalhe da formação de calo e raiz na base das miniestacas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Figure 4 – Minicuttings of holly: A – shoots of minicuttings for later collection and section of minicuttings; B – minicuttings arranged individually in plastic cups drained and placed in a humid chamber; C, D, E - detail of callus and root formation in minicuttings base. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

A porcentagem de sobrevivência das miniestacas foi alta (91,9%), sendo que tanto a sobrevivência quanto o enraizamento não foram beneficiados pelo uso do AIB na concentração de 1.000 mg L^{-1} . Os clones diferem na indução à iniciação radicial e evolução do enraizamento, sendo que miniestacas do clone CE1 apresentaram maior porcentagem de enraizamento. Assim, é necessário o controle e adequação do ambiente de enraizamento de miniestacas visando o aumento da porcentagem de enraizamento. O clone CE2 apresentou alta porcentagem de formação de calo ou broto e o clone EF7 apresentou alta porcentagem de miniestacas inalteradas. O minijardim clonal erva-mate, com o sistema fechado de cultivo em areia, instalado em bandeja de polietileno mostrou-se viável na sustentabilidade da produção.

7.4 Conclusões

Os clones diferem na indução ao enraizamento, sendo que a aplicação de ácido 3-indolibutírico na dose utilizada não afeta o enraizamento. O sistema fechado de cultivo em areia é viável para a condução e manejo de minicepas de erva-mate.

7.5 Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed da UFV, 2009. 500 p.

ANDREJOW, G.M.P. **Minijardim clonal de *Pinus taeda* L.** 2006, 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BANDINELLI, M. G. **Micropropagação e miniestaquia na propagação de batata**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BISOGNIN, D. A. Produção de plantas matrizes de morangueiro. In: SEMINÁRIO SOBRE O CULTIVO HIDRÔNICO DE MORANGUEIRO, 2007, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: UFSM, CCR, Departamento de Fitotecnia. p. 9-17.

BRONDANI, G. E.; ARAÚJO, M. A.; WENDLING, I. KRATZ, D. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 57, p. 29-38, 2008.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A. WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil, **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; PAIVA, H. N.; CORREIA, A. C. G. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 36, n.3, p. 389-399, 2012 b.

FAGANELLO, L. R. **Propagação vegetativa de miniestacas de *Cordia trichotoma* em função de auxinas e época de coleta.** 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2012.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; JUNIOR DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900 p.

HORBACH, M. A. et al. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p. 113-119, 2011.

KIELSE, P. **Propagação vegetativa de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (vell.) arrab. ex steud.) por estaquia radicular e miniestaquia.** 117p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 2012.

MANFROI, V.; FRANCISCONI, A. H, D.; BARRADAS, C. I.; SEIBERT, E. Efeito do AIB sobre o enraizamento e desenvolvimento de estacas de quivi (*Actíndia deliciosa*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.43-46, 1997.

OLIVEIRA, M. C. de; RIBEIRO, J. F.; RIOS, M. N. da S. **Enraizamento de estacas para a produção de mudas de espécies nativas de mata de galeria.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 4 p. (Recomendação técnica, 41).

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, sócioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil.** 2003. 112 p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; CHALFUN, N. N. J.; GONTIJO, T. C. A.; MENDONÇA, V.; CARRIJO, E. P.; CHAGAS, E. A. Propagação de estacas apicais de figueira: diferentes ambientes, ácido 3-indolibutírico e tipo de estaca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 1021-1026, 2006.

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

SANTOS, G. A. **Propagação vegetativa de mogno, cedro rosa, jequitibá rosa e angico vermelho por miniestaquia.** 2002. 75 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TAGLIANI, M. C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; LAVIOLA, B. G.; WENDLING, I. Uso de ácido indol butírico na miniestaquia de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA; I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 2010, João Pessoa, PB, **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 294-298.

TITON, M.; XAVIER A.; OTONI, W. C.; REIS, G.G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *eucalyptus grandis* w. hill ex maiden. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.1, p.1-7, 2003.

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

WENDLING, I. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras**. Colombo: Embrapa Florestas-CNPQ, 2004. 46 p. (Documentos, n.91).

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

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Árvore**,v.27, n.3, p.351-356, 2003.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa: UFV, 2002, 64p.

8 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho proporcionou informações consideráveis sobre a multiplicação vegetativa *in vitro* e *ex vitro* da erva-mate e auxiliará para o avanço do estabelecimento de plantios selecionados com mudas clonais de qualidade, visando atender o mercado consumidor da espécie, que avança consideravelmente todos os anos. Além disso, os resultados apresentados para multiplicação *in vitro*, microestaquia e miniestaquia de erva-mate auxiliarão na elaboração de protocolos eficientes para a propagação de outras espécies arbóreas.

Foi possível manter o banco de germoplasma de erva-mate *in vitro* para sucessivas coletas, onde se alcançou alta produção de plantas completas por meio da multiplicação e enraizamento, tanto de segmentos apicais quanto de segmentos nodais, a partir de propágulos oriundos de embriões zigóticos. A competência dos explantes foi mantida ao longo de quatro cultivos.

Obtiveram-se resultados satisfatórios na aclimatização e enraizamento *ex vitro* de erva-mate utilizando como substrato a composição de casca de arroz carbonizada e substrato comercial à base de casca de pinus ou a composição de casca de arroz carbonizada, areia grossa e substrato comercial a base de casca de pinus, em proporções iguais.

Os clones diferiram na competência ao enraizamento, sendo que a aplicação de ácido 3-indolibutírico na dose de 1.000 mg L⁻¹ não afeta o enraizamento. O sistema fechado de cultivo em areia é viável para a condução e manejo de minicepas de erva-mate.

Mais estudos sobre os fatores que influenciam o enraizamento adventício devem ser realizados a fim de aumentar a taxa de multiplicação de clones selecionados de erva-mate.

9 APÊNDICES

Apêndice 1 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência, enraizamento, emissão de folhas e número de segmentos nodais de plantas de erva-mate em função da origem do explante (segmentos apicais e nodais), avaliado aos 30 dias.

		S.Q.	df	Q.M.	F	Sign.
Sobrevivência	Entre grupos	16,90	1	16,90	0,402	0,530
	Dentro de grupos	1598,70	38	42,07		
	Total	1615,60	39			
Enraizamento	Entre grupos	30,63	1	30,63	0,118	0,733
	Dentro de grupos	9847,15	38	259,14		
	Total	9877,78	39			
Emissão de folhas	Entre grupos	0,23	1	0,23	2,06	0,159
	Dentro de grupos	4,15	38	0,11		
	Total	4,38	39			
Número de segmentos nodais	Entre grupos	0,00	1	0,00	0,00	1,000
	Dentro de grupos	7,10	38	0,20		
	Total	7,10	39			

Apêndice 2 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência, enraizamento, emissão de folhas e número de segmentos nodais de plantas de erva-mate em função de quatro cultivos, avaliado aos 30 dias.

		S.Q.	df	Q.M.	F	Sign.
Sobrevivência	Entre grupos	78,60	3	26,20	0,614	0,611
	Dentro de grupos	1537,00	26	42,69		
	Total	1615,60	39			
Enraizamento	Entre grupos	5482,48	3	1827,49	14,968	0,000
	Dentro de grupos	4395,30	36	122,09		
	Total	9877,78	39			
Emissão de folhas	Entre grupos	0,28	3	0,09	0,805	0,499
	Dentro de grupos	4,10	36	0,11		
	Total	4,38	39			
Número de segmentos nodais	Entre grupos	0,90	3	0,30	1,742	0,176
	Dentro de grupos	6,20	36	0,17		
	Total	7,10	39			

Apêndice 3 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de calo, de microestacas inalteradas, de mortalidade e de enraizamento de microestacas de erva-mate em diferentes substratos utilizados puros, em câmara úmida, avaliado aos 30 dias.

		S.Q.	df	Q.M.	F	Sign.
Brotação	Entre grupos	280,00	4	70,00	0,583	0,679
	Dentro de grupos	1800,00	15	120,00		
	Total	2080,00	19			
Formação de calo	Entre grupos	680,00	4	170,00	2,550	0,082
	Dentro de grupos	1000,00	15	66,67		
	Total	1680,00	19			
Inalteradas	Entre grupos	1000,00	4	250,00	0,647	0,638
	Dentro de grupos	5800,00	15	386,67		
	Total	6800,00	19			
Mortalidade	Entre grupos	7600,00	4	1900,00	5,938	0,005
	Dentro de grupos	4800,00	15	320,00		
	Total	12400,00	19			
Enraizamento	Entre grupos	5320,00	4	1330,00	5,392	0,007
	Dentro de grupos	3700,00	15	246,67		
	Total	9020,00	19			

Apêndice 4 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de mortalidade, de enraizamento e de comprimento da maior raiz de microestacas de erva-mate em diferentes substratos utilizados puros, em câmara úmida, avaliado aos 60 dias.

		S.Q.	df	Q.M.	F	Sign.
Brotação	Entre grupos	5720,00	4	1430,00	3,460	0,034
	Dentro de grupos	6200,00	15	413,33		
	Total	11920,00	19			
Mortalidade	Entre grupos	10200,00	4	2550,00	7,806	0,001
	Dentro de grupos	4900,00	15	326,67		
	Total	15100,00	19			
Comprimento de raiz	Entre grupos	1,30	4	0,33	18,216	0,000
	Dentro de grupos	0,27	15	0,02		
	Total	1,57	19			
Enraizamento	Entre grupos	8680,00	4	2170,00	11,224	0,000
	Dentro de grupos	2900,00	15	193,33		
	Total	11580,00	19			

Apêndice 5 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de calo, de enraizamento e de mortalidade de microestacas de erva-mate em diferentes composições de substratos, em câmara úmida, avaliado aos 30 dias.

		S.Q.	df	Q.M.	F	Sign.
Brotação	Entre grupos	8866,66	2	4433,33	22,167	0,000
	Dentro de grupos	1800,00	9	200,00		
	Total	10666,67	11			
Formação de calo	Entre grupos	866,67	2	433,33	3,900	0,060
	Dentro de grupos	1000,00	9	111,11		
	Total	1866,67	11			
Enraizamento	Entre grupos	4066,67	2	2033,33	6,778	0,016
	Dentro de grupos	2700,00	9	300,00		
	Total	6766,67	11			
Mortalidade	Entre grupos	4066,67	2	2033,33	6,778	0,016
	Dentro de grupos	2700,00	9	300,00		
	Total	6766,67	11			

Apêndice 6 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de brotação, de enraizamento, de mortalidade e de comprimento da maior raiz de microestacas de erva-mate em diferentes composições de substratos, avaliado aos 60 dias.

		S.Q.	df	Q.M.	F	Sign.
Brotação	Entre grupos	20680,00	4	5170,00	26,741	0,000
	Dentro de grupos	2900,00	15	193,33		
	Total	23580,00	19			
Enraizamento	Entre grupos	4720,00	4	1180,00	16,091	0,000
	Dentro de grupos	1100,00	15	73,33		
	Total	5820,00	19			
Mortalidade	Entre grupos	4720,00	4	1180,00	16,091	0,000
	Dentro de grupos	1100,00	15	73,33		
	Total	5820,00	19			
Comprimento de raiz	Entre grupos	5,77	4	1,44	10,293	0,000
	Dentro de grupos	2,10	15	0,14		
	Total	7,88	19			

Apêndice 7 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 30 dias.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Clones (A)	3	2673.8195	891.2732	4.3885 *
Tratamento de AIB (B)	1	0.0005	0.0005	0.0000 NS
A X B	3	418.7205	139.5735	0.6872 NS
TRATAMENTOS	7	3092.5405	441.7915	
RESIDUO	136	27620.6157	203.0928	

Apêndice 8 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de miniestacas de erva-mate inalteradas, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 30 dias.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Clones (A)	3	6013.2040	2596.6969	14.032 *
Tratamento de AIB (B)	1	1340.9511	2871.8230	9.3877 *
A X B	3	417.7577	973.3268	0.9749 NS
TRATAMENTOS	7	7771.9128	1110.2733	
RESIDUO	136	19426.3744	142.8410	

Apêndice 9 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de calo e broto em miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 30 dias.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Clones (A)	3	6025.9398	2008.6466	7.6764 *
Tratamento de AIB (B)	1	1329.5976	1329.5976	5.0813 *
A X B	3	449.4259	149.8086	0.5725 NS
TRATAMENTOS	7	7804.9633	1114.9948	
RESIDUO	136	35586.4329	261.6649	

Apêndice 10 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de miniestacas de erva-mate em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Clones (A)	3	5761.0294	1920.3431	11.4129 *
Tratamento de AIB (B)	1	66.8584	66.8584	0.3974 NS
A X B	3	66.9034	22.3011	0.1325 NS
TRATAMENTOS	7	5894.7912	842.1130	
RESIDUO	136	22883.4460	168.2606	

Apêndice 11 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de miniestacas de erva-mate inalteradas, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Clones (A)	3	40501.4830	13500.4943	36.1578 *
Tratamento de AIB (B)	1	56.1847	56.1847	0.1505 NS
A X B	3	2197.1551	732.3850	1.9615 NS
TRATAMENTOS	7	38705.4393	6107.8318	
RESIDUO	136	174448.9141	373.3768	

Apêndice 12 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de calo e broto em miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Clones (A)	3	30149.9631	10049.9877	24.9339 *
Tratamento de AIB (B)	1	236.4605	236.4605	0.5867 NS
A X B	3	1291.0125	430.3375	1.0677 NS
TRATAMENTOS	7	31677.4360	4525.3480	
RESIDUO	136	54816.8001	403.0647	

Apêndice 13 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento em miniestacas de erva-mate, em função do clone e do tratamento com ácido 3-indolibutírico (AIB), avaliado aos 60 dias.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Clones (A)	3	11933.5551	3977.8517	21.8185 *
Tratamento de AIB (B)	1	121.2723	121.2723	0.6652 NS
A X B	3	391.1916	130.3972	0.7152 NS
TRATAMENTOS	7	12446.0190	1867.7027	
RESIDUO	136	24794.9232	223.4801	