

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

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE ERVA-  
MATE (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire –  
Aquifoliaceae).**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Micheli Angélica Horbach**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE ERVA-MATE  
(*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae).**

por

**Micheli Angélica Horbach**

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

**Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

***A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso  
em todas as suas folhas.***

*Johann Wolfgang von Goethe*

## Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dilson Antônio Bisognin, pelo constante incentivo, disponibilidade, pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação e, especialmente, pela confiança depositada no meu trabalho de dissertação.

Ao Prof. Frederico D. Fleig, pela sempre empolgada contribuição, trocas de idéias e pela disponibilização de material para os experimentos.

À Prof. Lia Reiniger, pela disponibilidade e ensinamentos durante a disciplina de Biotecnologia Florestal.

A todos os professores, funcionários e alunos do curso de pós-graduação em Engenharia Florestal da UFSM, e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização dessa dissertação.

Ao pessoal do Viveiro Florestal, pela disponibilização do local e ajuda nos experimentos.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos, que garantiu o sustento financeiro necessário à realização deste curso.

Gostaria de agradecer as Sofias (Paula Kielse, Camila, Lu, Ju e Ana Carolinda), por toda a amizade e companheirismo durante o mestrado.

À Engenheira Florestal Paula Kielse pela ajuda na correção do texto.

A todos os colegas e amigos do laboratório de cultura de tecidos, em especial aos amigos Tiago, Liege, Kenia, Douglas, Marlene, Ronilda e Francisco.

Aos meus amigos, Elisabete, Grazilda, Michele, André, Evaldo, Charlotte e Josita, por todo o incentivo e amizade.

Por todos os almoços e jantas, agradeço às amigas, Jaque, Veri e Fernanda.

À minha irmã, Aurea, a nova Cirurgiã Dentista da cidade.

Por último, aos meus pais, Luci e Ernesto, de quem sou fã incondicional, pelos seus exemplos, apoio e grande amor.

A todos agradeço profundamente, e dedico o resultado do trabalho.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae).**

AUTORA: Micheli Angélica Horbach

ORIENTADOR: Dilson Antônio Bisognin

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 24 de Março de 2008.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma espécie de grande importância no sul do Brasil, pelo valor econômico e cultural que apresenta. O presente trabalho teve por objetivos analisar a propagação de erva-mate por estaquia, o estabelecimento e desinfestação *in vitro* de segmentos nodais de plantas adultas e a micropropagação de plantas oriundas de embriões imaturos. Para a estaquia, testaram-se três doses de AIB (0, 4000 e 8000 mg L<sup>-1</sup>) e dois comprimentos de estacas (3 e 10 cm). As estacas foram avaliadas quanto à sobrevivência, o enraizamento, o número de raízes, de folhas e de brotos e o comprimento de raízes e de brotos, aos 135 dias. No experimento de desinfestação, segmentos nodais de brotações de ano de erva-mate foram imersos em etanol 70%, por 2 e 4 min. e, depois, em NaOCl 2%, por 15, 25 e 35 min e, então inoculados em meio com ¼ do MS. Aos 15 dias avaliaram-se a percentagem de explantes contaminados, oxidados e sadios. Na micropropagação, plântulas de erva-mate, obtidas de embriões imaturos, foram submetidas a diferentes meios de cultura (MS, ¼ MS e WPM) por 50 dias, com avaliação do incremento obtido para as variáveis número de folhas e comprimento de plântulas. Para a multiplicação dessas plantas, foram testadas a adição de diferentes doses (0; 0,01; 0,1; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) de BAP ao meio de cultura com ¼ do MS. Foram avaliados o número de brotos, folhas e entrenós, o comprimento dos brotos e a altura das plantas, aos 50 dias de cultivo. No enraizamento de brotos de erva-mate foram utilizadas doses (0; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>) de AIB, por 15 e 30 dias. As avaliações constaram da percentagem de enraizamento e de calo obtidas, do número e comprimento de raízes, do número de folhas e altura das plantas, aos 30 dias de cultivo. Plantas de erva-mate, produzidas *in vitro*, foram aclimatizadas em diferentes substratos (vermiculita média, areia e casca de coco) com temperatura e luminosidade controladas. A maior percentagem de estacas enraizadas, em ambos os comprimentos, foi com a dose de 4000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, sendo que as estacas de 3 cm obtiveram uma maior percentagem de enraizamento. Segmentos nodais de brotações de ano de erva-mate apresentam a maior sobrevivência com a desinfestação com álcool 70% por 4 min. e em NaOCl 2% por 25 min. O meio com ¼ dos sais do MS pode ser utilizado como o meio de cultura base para o cultivo *in vitro* de plantas de erva-mate. A adição de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP ao meio de cultura base aumenta o número de brotos adventícios em erva-mate, além de formar tufos após alguns subcultivos, possibilitando a manutenção de plantas como microcepas, para o fornecimento de brotos. O enraizamento *in vitro* de erva-mate pode ser realizado em apenas uma fase de 30 dias, com a adição de até 3 mg L<sup>-1</sup> de AIB ao meio com ¼ dos sais do MS. Plantas de erva-mate, produzidas *in vitro*, podem ser aclimatizadas nos substratos casca de coco ou areia em ambiente com temperatura e luminosidade controladas.

**Palavras-chave:** produção de mudas, propagação vegetativa, estaquia, cultura de tecidos, espécie nativa.

## ABSTRACT

Master Thesis  
Graduate Program of Forest Engineering  
Federal University of Santa Maria

### ***IN VITRO AND EX VITRO PROPAGATION OF MATE (Ilex paraguariensis Saint Hilaire – Aquifoliaceae).***

AUTHOR: Micheli Angélica Horbach

ADVISER: Dilson Antônio Bisognin

Place and Data Defence: Santa Maria, March 24<sup>th</sup> 2008

Mate (*Ilex paraguariensis*) is an important species in Southern Brazil for its economical and cultural values. The present work had the objectives of analyzing the propagation of mate by cuttings, disinfection and *in vitro* establishment of nodal segments from adult plants and micropropagation of plants originated from immature embryos. Mate cutting were submitted to three (0, 4000 and 8000 mg L<sup>-1</sup>) IBA doses and two lengths (3 and 10 cm) of cutting. The cuttings were evaluated at 135 days for survival, rooting and formation of roots, leaves and shoots. In the disinfection experiments, nodal segments of one-year-old shoots were immersed in alcohol solution of 70% for two and four min., in 2% of NaOCl for 15, 25 and 35 min. and inoculated in ¼ of MS medium. The percentage of contaminated, oxidized and healthy explants were evaluated at 15 days. In micropropagation, mate seedlings from immature embryos were submitted to different culture mediums (MS, ¼ MS and WPM) for 30 days and evaluated for number of leaves and length of seedlings. For the multiplication, different doses (0; 0,01; 0,1; 1,0 and 2,0 mg L<sup>-1</sup>) of BAP were tested in ¼ MS culture medium. At 50 days, they were evaluated for the number of shoots, leaves and internodes, shoots length and height. Different doses (0; 0,5; 1,0 and 1,5 mg L<sup>-1</sup>) of IBA were evaluated for rooting and kept explants either for 15 or 30 days in the medium. *In vitro* plants of mate were acclimatized in different (vermiculite, sand or coconut shells) substrates, with controlled temperature and light environmental conditions. The highest percentage of rooted cuttings, in both evaluated length, were with 4000 mg L<sup>-1</sup> of IBA. Cuttings with 3 cm length produced the highest percentage of rooted cuttings. Nodal segments of one-year-old shoots have the highest survival, with the disinfection with alcohol 70% for four minutes and NaOCl 2% for 25 min. The ¼ of MS salts medium can be used as basal medium for *in vitro* culture of mate plants. The basal medium with 2 mg L<sup>-1</sup> of BAP increases the number of adventitious shoots and promotes shoot proliferation after some sub cultivations, enabling *in vitro* plant maintenance as microstump, as shoot supply. *In vitro* rooting can be achieved in one cycle of 30 days of cultivation, with the addition of 3 mg L<sup>-1</sup> of IBA to the medium with ¼ of MS salts. *In vitro* plants of mate can be acclimatized in coconut shells or sand in controlled temperature and light conditions.

**Key words:** plantlet production, vegetative propagation, cutting, tissue culture, native species.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Enraizamento de estacas de erva-mate em 4000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, aos 180 dias da instalação do experimento: estacas de 10 cm (A); estacas de 3 cm (B). Santa Maria, RS, 2007..... 19
- Figura 2 – Cepas de erva-mate em vaso, com brotos aptos à coleta para o estabelecimento *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.....24
- Figura 3 – Plântulas de erva-mate após 50 dias de cultivo em diferentes meios de cultura. Santa.....32
- Figura 4 – Parâmetros observados por plântula de erva-mate cultivada em meio com ¼ de MS e diferentes doses de BAP, aos 50 dias de cultivo: número de brotos (A); comprimento de brotos (B); número de entrenós (C) e número de folhas (D). Santa Maria, RS, 2007.....33
- Figura 5 – Aspecto da multiplicação *in vitro* de erva-mate após sucessivos subcultivos em meio nutritivo com ¼ do MS, acrescido de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Santa Maria, RS, 2007.....34
- Figura 6 – Parâmetros observados em brotos de erva-mate colocados para enraizar em meio com ¼ de MS, acrescido de diferentes doses de AIB (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>), aos 30 dias de cultivo; percentagem de enraizamento (A); número de raízes (B); comprimento de raízes (C); percentagem de explantes com calo (D). Santa Maria, RS, 2007.....37
- Figura 7 – Parâmetros observados em brotos de erva-mate colocados para enraizar em meio ¼ do MS com diferentes doses de AIB (0; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>), aos 30 dias de cultivo: percentagem de enraizamento (A), número de raízes (B); comprimento de raízes (C); percentagem de explantes com calo (D). Santa Maria, RS, 2007.....38
- Figura 8 – Enraizamento *in vitro* de brotos de erva-mate: raízes formadas em brotos cultivados 15 dias em meio com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (A I); raízes formadas em brotos cultivados por 30 dias em meio com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (A II); aspecto do enraizamento de erva-mate em meio de cultura ¼ do MS, acrescido de diferentes doses de AIB (0, 0,5, 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>) (B), aos 30 dias de cultivo; enraizamento de brotos inoculados em meios com diferentes doses de AIB (0;

0,5, 1,0 e 1,5 mg L <sup>-1</sup> ), aos 45 dias de cultivo (C); enraizamento de brotos inoculados em meio de cultura com ¼ do MS, acrescido de diferentes doses de AIB (0; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L <sup>-1</sup> ), aos 45 dias de cultivo (D). Santa Maria, RS, 2007.....	39
Figura 9 – Aclimatização de plantas de erva-mate em areia, casca de coco e vermiculita, aos 30 dias. Santa Maria, RS, 2007. ....	41



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentagem de sobrevivência e número de folhas para estacas de ano de plantas adultas de erva-mate. Santa Maria, RS, 2007.....	18
Tabela 2 – Percentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes e brotos formados em estacas de ano de plantas adultas de erva-mate tratadas com diferentes doses de AIB, aos 135 dias. Santa Maria, RS, 2007. ....	20
Tabela 3 – Percentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes e brotos formados em estacas de ano de plantas adultas de erva-mate, em diferentes comprimento de estacas, aos 135 dias da instalação do experimento. Santa Maria, RS, 2007.....	20
Tabela 4 – Percentagens de contaminação por fungos e/ou bactérias, de oxidação e de sobrevivência, em segmentos nodais de erva-mate, aos 15 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.....	29
Tabela 5 – Incremento do número de folhas e da altura de plântulas de erva-mate inoculadas em diferentes meios de cultura, após 50 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.....	32
Tabela 6 – Enraizamento, número de raízes, comprimento de raízes, altura, número de folhas e presença de calos em brotos de erva-mate, submetidas a diferentes doses de AIB e tempos de exposição de 15 e 30 dias em meios com AIB, avaliados aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.....	36
Tabela 7 – Sobrevivência de plantas de erva-mate na aclimatização, utilizando diferentes tipos de substratos, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007. ....	41

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 Descrição da espécie.....	4
3.2 Macropropagação por estaquia .....	5
3.3 Micropropagação .....	8
3.3.1 Meio de cultura.....	8
3.3.2 Estabelecimento de explantes <i>in vitro</i> .....	9
3.3.3 Multiplicação .....	12
3.3.4 Enraizamento .....	13
3.3.5 Aclimatização .....	14
4. CAPÍTULO I – PROPAGAÇÃO POR ESTAQUIA DE ERVA-MATE .....	15
4.1 Introdução.....	15
4.2 Material e Métodos .....	16
4.3 Resultados e Discussão .....	17
4.4 Conclusões .....	22
5. CAPÍTULO II – MICROPROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE .....	23
5.1 Introdução.....	23
5.2 Material e Métodos .....	24
5.2.1 Condições de cultivo .....	24
5.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais .....	24
5.2.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> de embriões zigóticos.....	25
5.2.4 Teste de meio de cultura.....	26
5.2.5 Multiplicação <i>in vitro</i> .....	26
5.2.6 Enraizamento <i>in vitro</i> .....	27
5.2.7 Aclimatização .....	27
5.2.8 Análise estatística .....	28
5.3 Resultados e Discussão .....	28

5.3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais .....	28
5.3.2 Teste de meio de cultura .....	31
5.3.3 Multiplicação <i>in vitro</i> .....	33
5.3.4 Enraizamento <i>in vitro</i> .....	35
5.3.5 Aclimatização .....	40
5.4 Conclusões .....	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma espécie arbórea pertencente à família Aquifoliaceae, que ocorre no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2003). Essa espécie é utilizada na América do Sul desde épocas pré-colombianas, sendo empregada no preparo do chimarrão (BACKES e IRGANG, 2002). Considerada como a espécie símbolo do estado do Rio Grande do Sul, a erva-mate apresenta grande importância na economia e na cultura dos estados sulinos (BAKES e IRGANG, 2002). No ano de 2006 foram produzidas 233.360 toneladas de erva-mate no Brasil, com a região sul concentrando 99,8% de toda a produção, destacando-se o estado do Paraná, com 65,5% (152.971 t) do total nacional, seguido por Santa Catarina (41.833 t) e Rio Grande do Sul (38.127 t) (IBGE, 2006). Entretanto, apesar de sua importância econômica, pouco se conhece quanto ao melhoramento e à produção de mudas de qualidade superior desta espécie.

A produção de mudas de boa qualidade é um requisito essencial no setor florestal para o estabelecimento de povoamentos com melhor sanidade e produtividade, especialmente quando se trata de espécies nativas, em que a produção de plantas, muitas vezes, é realizada de maneira empírica. Dessa forma, um maior conhecimento sobre a propagação da erva-mate se faz necessário, tanto para superar problemas de dormência das sementes quanto para aprimorar a reprodução assexuada, essencial para o estabelecimento de povoamentos uniformes. Como alternativa para a superação da dormência das sementes, pode-se utilizar o cultivo de embriões *in vitro* e posterior micropropagação. Já para a multiplicação de matrizes selecionadas, a estaquia pode ser uma boa opção, pela menor exigência de mão-de-obra qualificada e também de investimentos.

Apesar de mudas micropropagadas serem mais onerosas do que aquelas obtidas por outras técnicas de propagação vegetativa, estes clones geralmente trazem um valor agregado, além da opção de multiplicação em larga escala, capaz de compensar os custos de produção (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A micropropagação tem sido aplicada com sucesso no rejuvenescimento de clones de interesse comercial, que apresentam dificuldades de enraizamento, por causa da

maturidade dos propágulos utilizados. Além disso, para as espécies que apresentam dificuldades no cultivo por sementes, a utilização do cultivo de embriões torna-se uma ferramenta útil para a regeneração direta de plantas que possuem sementes dormentes, com recalcitrância, ou que são abortadas em estágios iniciais de desenvolvimento (BAJAJ, 1986). Dessa forma, a micropropagação de erva-mate apresenta-se como uma estratégia viável e com grande potencial de aplicação para a propagação desta espécie.

A reprodução assexual, reprodução vegetativa de partes da planta original, permite a multiplicação de famílias elites ou indivíduos selecionados (THORPE, 1991), podendo ser a base para a produção de mudas com comprovado potencial genético. A propagação vegetativa de erva-mate pode promover uma maior produtividade e homogeneidade para os ervais, sendo a estaquia uma excelente opção em relação às mudas obtidas por sementes. Entretanto, a propagação vegetativa de espécies florestais, muitas vezes, apresenta alguns problemas, como por exemplo, a dificuldade de enraizamento de materiais adultos e o baixo vigor das mudas produzidas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Portanto, o aperfeiçoamento e utilização de tecnologias de macropropagação e micropropagação de erva-mate, pode otimizar a produção de mudas, além de possibilitar a obtenção de plantas de melhor qualidade.

## 2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivos avaliar a propagação da erva-mate, por meio da macropropagação por estaquia, do estabelecimento de segmentos nodais *in vitro* e da micropropagação.

### 2.2 Objetivos Específicos

- i) Propagar vegetativamente plantas adultas de erva-mate em estufa, por meio da estaquia de brotos de ano, com diferentes comprimento de estacas e doses de AIB;
- ii) Estabelecer *in vitro* segmentos nodais de plantas adultas, oriundos de brotos de cepas, utilizando diferentes tempos de exposição em agentes desinfestantes;
- iii) Testar diferentes meios no cultivo de plântulas originadas de embriões zigóticos e micropropagá-las.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Descrição da espécie

A erva-mate é uma árvore perenifólia, pertencente à família Aquifoliaceae, que pode alcançar até 30 m de altura e 100 cm de diâmetro à altura do peito. Quando as plantas são manejadas para a produção, atingem altura entre 3 e 5 m (CARVALHO, 2003). A espécie é dióica, com flores díclinas e um dos sexos abortivos, com processo reprodutivo iniciando em até dois anos após o plantio de mudas oriundas de propagação vegetativa, e aos cinco anos de mudas provenientes de sementes (CARVALHO, 2003). A frutificação ocorre de janeiro a março. Os frutos são bagas esféricas, com quatro sementes (BACKES e IRGANG, 2002). As sementes são dormentes em razão da dureza do tegumento, e pelo motivo do embrião ser rudimentar, permanecendo em estágio de coração mesmo quando os frutos estão maduros (HU, 1975). A dormência das sementes é quebrada pelo processo de estratificação, por meio do armazenamento das sementes em camadas de areia úmida por um período aproximado de 120 dias (BACKES e IRGANG, 2002).

As sementes de erva-mate possuem em média 3,72 mm de comprimento e 2,41 mm de largura (MUTINELLI, 1981) e, o embrião, um tamanho aproximado de 0,25 mm (NIKLAS, 1987). Onze espécies do gênero *Ilex* apresentam embriões com os seguintes estágios de desenvolvimento: estágio de coração, de torpedo, maduro e germinação (HU, 1975), com início do crescimento embrionário imediatamente após a retirada dos embriões das sementes, desde que transferidos para meio de cultura apropriado. Uma hipótese provável para a dormência das sementes de erva-mate é que esta espécie possui uma dissincronia entre o amadurecimento do fruto e do embrião, com parada do desenvolvimento embrionário pelo acúmulo de inibidores no endosperma, em consequência da maturidade do fruto (HU et al., 1979).

A erva-mate é uma espécie clímax que cresce em associações mais evoluídas com o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*), sendo característica da Floresta Ombrófila Mista Montana (Mata de Araucária) e da Floresta Estacional Semidecidual no noroeste do Paraná e sul matogrossense (CARVALHO, 2003). No Brasil, a espécie está distribuída desde o Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do

Sul, em Minas Gerais e em pequenos nichos de ocorrência do pinheiro-do-paraná no Rio de Janeiro e São Paulo (CARVALHO, 2003).

O principal produto da erva-mate é o mate, uma bebida estimulante usada tanto como infusão quente (chimarrão) ou fria (tererê). A árvore pode ser utilizada para fins ornamentais, além de suas folhas fornecerem substâncias para a conservação de alimentos e para a fabricação de desodorante pela indústria de cosméticos (BACKES e IRGANG, 2002). A madeira tem usos secundários, sendo utilizada na fabricação de lâminas de ótima qualidade, entretanto, não é recomendada para lenha e produção de celulose e papel (CARVALHO, 2003).

### 3.2 Macropropagação por estaquia

Plantas originadas via seminal possuem características genótípicas distintas entre si, já na propagação vegetativa, apresentam o mesmo genótipo da planta que as originou (HARTMANN et al., 2002). Assim, um dos principais objetivos da propagação vegetativa é possibilitar a multiplicação de árvores adultas que apresentam características superiores (THORPE, 1991).

A estaquia é uma técnica de propagação vegetativa que apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas, a exemplo da enxertia e da alporquia, em consequência da rápida resposta das plantas, da simplicidade e baixo custo de utilização da técnica, da uniformidade das plantas geradas e da possibilidade de um maior número de plantas por matriz, além de não apresentar problemas de incompatibilidade como na enxertia (HIGA, 1983).

A técnica de estaquia promove o desenvolvimento de um novo sistema de raízes e brotos adventícios (HARTMANN et al., 2002), sendo a formação desse sistema dependente de células que se desdiferenciam para a inicialização e formação de novos pontos de crescimento meristemático (HARTMANN et al., 2002; ALFENAS et al., 2004). Assim, o processo de formação de raízes adventícias pode ser dividido em pelo menos dois estágios de desenvolvimento: a iniciação de primórdios, seguida ao corte do tecido, e a emergência e crescimento das raízes (NÉMETH, 1986).

Nas espécies que apresentam dificuldade de enraizamento, alguns fatores associados à planta matriz podem promover melhores respostas rizogênicas, dentre estes, a coleta de estacas de materiais vegetativos, sem presença de flores ou frutos



e, se possível, a utilização de plantas mais jovens ou de explantes oriundos de regiões meristemáticas (HIGA, 1983). Além disso, a seleção das plantas a serem propagadas deve se basear na eficiência fisiológica e na facilidade de resposta ao enraizamento das mudas, além da presença de características de interesse nos indivíduos (HIGA, 1983).

No enraizamento de estacas utiliza-se, na maioria dos casos, uma auxina para acelerar a formação de raízes (HINOJOSA, 2000) e, no caso específico da erva mate, o ácido indolbutírico (AIB) tem se mostrado o fitorregulador mais eficiente na indução de raízes, especialmente pela baixa mobilidade e estabilidade química (IRITANI e SOARES, 1981).

Outro fator que interfere a formação rizogênica em estacas são as condições ambientais durante o período de enraizamento. Assim, para otimização da propagação de plantas, se faz necessário o manejo das condições microclimáticas (luminosidade, umidade relativa, temperatura, entre outros), dos fatores edáficos (o meio de propagação ou solo, nutrientes, entre outros) e dos fatores bióticos (interação do propágulo com outros organismos) (HARTMANN et al., 2002; HIGA, 1983; SCHMIDT, 1993). Além disso, a disponibilidade hídrica exerce grande influência no enraizamento das estacas, pois as mesmas são muito mais sensíveis à desidratação até que ocorra a formação de raízes para a absorção de água e nutrientes (CASO e DOTTA, 1997; SCHMIDT, 1993).

Para o enraizamento de estacas da maioria das espécies nativas, também é importante a manutenção de, pelo menos, um par de meias folhas na estaca. Este procedimento é indicado porque as folhas, especialmente as mais novas e as gemas atuam como fontes de carboidratos, reguladores de crescimento e outros compostos essenciais para o início da formação de raízes (ALFENAS et al., 2004; IRITANI e SOARES, 1981). Porém, o desenvolvimento rápido e precoce dessas gemas pode mobilizar as reservas necessárias à iniciação radicular e, conseqüentemente, afetar o enraizamento das estacas (IRITANI e SOARES, 1981).

Outro evento a ser considerado no enraizamento de estacas se baseia no fato do envelhecimento da planta diminuir o potencial de iniciação de raízes adventícias (HACKETT, 1988). Na estaquia, cada segmento mantém a “memória fisiológica” do status de maturidade que possuía no ramo de onde foi coletado e, dependendo dos níveis de juvenildade ou maturidade, pode gerar diferentes tipos de sistemas radiculares (ASSIS e MAFIA, 2007). Por isso, a idade da planta doadora tem grande

influência no enraizamento de estacas de erva-mate, pois, passado os três primeiros anos de vida, o fator juvenilidade se perde, apesar da planta ainda não ter alcançado a maturidade reprodutiva (SAND, 1989). Assim, para tentar recuperar essa competência de desdiferenciação, o corte da planta no campo pode ser uma opção, pois induz a emissão de brotos por meio de gemas basais (KRICUN, 1995). Outra tecnologia relevante no rejuvenescimento de plantas adultas é a micropropagação, por meio de vários subcultivos, ou a utilização das técnicas de enxertia, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, nas quais se utiliza porta-enxertos juvenis para promoverem o rejuvenescimento dos propágulos, além da estaquia seriada (WENDLING e XAVIER, 2001). A utilização de enxertia seriada *in vitro* em *Sequoia sempervirens*, depois de alguns ciclos, promoveu a restauração da capacidade de enraizamento dos brotos, com crescimento tão vigoroso quanto os originados de plântulas (HUANG et al., 1992).

A posição de coleta do propágulo para a estaquia também tem influência no enraizamento. A escolha do melhor propágulo para a clonagem é essencial para que não ocorram perdas devido à incapacidade de regeneração do material, e nem a formação de mudas com baixo vigor (WENDLING e XAVIER, 2001). Os brotos epicórmicos são menos eficientes em comparação com os brotos basais de cepas, pois, por causa da posição na árvore, estas se encontram fisiologicamente maduras e menos propensas ao enraizamento (ALFENAS et al., 2004). Assim, propágulos mais próximos da base conservam uma maior juvenilidade em relação aos que se encontram nas posições mais apicais, em consequência da sua formação ser mais próxima da época de germinação do que aquelas das regiões intermediárias ou apicais (HARTMANN et al., 2002). Portanto, os brotos de cepas possuem características juvenis que facilitam a recuperação da competência ao enraizamento, além da manifestação de todo o potencial genético da planta (ALFENAS et al., 2004).

Durante o processo de enraizamento também pode ocorrer a oxidação das estacas, causada especialmente pelo acúmulo de fenóis, promovendo um efeito negativo na formação de raízes e, conseqüentemente, uma redução da sobrevivência das estacas (CASO e DOTTA, 1997). A erva-mate, assim como muitas espécies lenhosas, possui um alto conteúdo de fenóis, dessa maneira, os ferimentos provocados durante o manuseio e o preparo das estacas podem promover o acúmulo de fenóis na base, causando o enegrecimento dos tecidos e

morte da estaca (SAND, 1989). Contudo, a oxidação pode ser evitada com o uso de antioxidantes, a exemplo da polivinilpirrolidona (PVP) e do ácido cítrico (FERRARI et al., 2004).

### 3.3 Micropropagação

#### 3.3.1 Meio de cultura

A propagação *in vitro* de plantas compreende várias técnicas que utilizam o cultivo asséptico em laboratório, sendo a micropropagação uma das tecnologias usadas para regenerar ou propagar novas plantas, além de acelerar o processo de propagação clonal (HARTMANN et al., 2002). A micropropagação é composta por quatro estágios principais: o estágio I que é o estabelecimento do explante no meio de cultura; o estágio II em que ocorre a multiplicação ou indução de brotos múltiplos; o estágio III com a formação de raízes e o estágio IV que é a aclimatização, com a transferência gradual das plantas para a condição *ex vitro* (HARTMANN et al., 2002; NIKLAS, 1986). Alguns autores ainda acrescentam o estágio 0 que é a preparação das plantas, por meio de tratamentos de desinfestação, para diminuir a contaminação quando estas forem introduzidas *in vitro* (DEBERGH e READ, 1991).

No estabelecimento de uma cultura *in vitro* é necessária a utilização de meios de cultura que propiciem condições necessárias para o crescimento das plantas. Dessa forma, o meio deve fornecer um suporte semi-sólido, nutrientes, energia e algumas vitaminas suplementares. Muitas culturas, também, requerem a adição de fitorreguladores para regenerar ou propagar novas plantas (HARTMANN et al., 2002). Há ainda consideráveis diferenças do efeito de clone no comportamento *in vitro* das culturas, pois, se por um lado há clones que se adaptam bem a diversos tipos de meios, por outro, alguns clones ou grupo de clones necessitam de meios de cultura específicos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O crescimento e o desenvolvimento de uma planta dependem de sinais internos e externos que são trasladados de uma parte a outra da planta por mensageiros químicos chamados de hormônios (HINOJOSA, 2000). Essas substâncias tanto podem ser produzidas pelas plantas naturalmente (fitohormônios) ou serem sintéticas (fitorreguladores), sendo os maiores grupos formados pelas auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (HARTMANN et al., 2002;

TERMIGNONI, 2005). Dessa forma, a adição de fitorreguladores no meio de cultura visa suprir possíveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). As auxinas promovem a divisão celular nas etapas de indução de calos e raízes nos explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A dose de auxina na planta não está distribuída uniformemente, variando ao longo do caule com maior quantidade no ápice caulinar, gemas de crescimento, sementes em formação, folhas novas, ápices radiculares, grãos de pólen e câmbio (HINOJOSA, 2000). Além disso, a dose varia com a idade da planta, época do ano e atividade metabólica (HINOJOSA, 2000). Para a indução de calos são comumente usados o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido naftalenoacético (ANA), o picloram e o thidiazuron e, para a indução de raízes, preferencialmente são utilizados o ácido indolbutírico (AIB) e o ANA. O ácido indolacético (AIA) se mostra menos eficiente por não ser suficientemente termo e foto-estável (HINOJOSA, 2000), e o 2,4-D tende a estimular uma maior formação de calos, podendo inibir o processo de iniciação radicular (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As citocininas também estimulam a divisão celular (HARTMANN et al., 2002) e são fundamentais na etapa de regeneração de calos e na brotação de gemas axilares ou apicais na cultura de tecidos de plantas, entretanto, o enraizamento pode ser dificultado se estas permanecerem muito tempo em contato com o material regenerado, em decorrência de um possível efeito residual da citocinina (BARRUETO CID, 2000). Alguns estudos sugerem que o BAP promove a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* em erva-mate, mostrando-se muito eficiente na formação de brotos (PAULA, 1992; ZANIOLO e ZANETTE, 1999; MAJADA et al., 2000).

### 3.3.2 Estabelecimento de explantes *in vitro*

#### 3.3.2.1 Cultivo de segmentos nodais

A micropropagação pode ser utilizada no rejuvenescimento de árvores adultas, por meio de subcultivos, reestabelecendo a competência ao enraizamento e o vigor de árvores adultas (ASSIS e MAFIA, 2007; ALFENAS et al., 2004), com

promoção de uma maior homogeneidade fisiológica dos tecidos, tanto em potencial de enraizamento quanto na qualidade do sistema radicular (ASSIS e MAFIA, 2007).

A micropropagação, pela proliferação de gemas axilares, tem sido muito utilizada para propagação de espécies lenhosas (XAVIER et al., 2007). Além disso, essa tecnologia facilita o enraizamento de plantas que falham em enraizar *in vivo*, com redução do descarte de matrizes de interesse (NÉMETH, 1986; ALFENAS et al., 2004; ASSIS e MAFIA, 2007). Foi verificado em plantas micropropagadas de *Eucalyptus* spp. um aumento na eficiência do processo rizogênico, com maior produção de mudas e diminuição do tempo de permanência no viveiro, além do aumento do vigor vegetativo se comparadas às plantas obtidas por macropropagação (TITON et al., 2002).

Muitos fatores podem influenciar o cultivo *in vitro* de plantas, a exemplo do tipo de órgão utilizado como fonte de explante, da idade fisiológica e ontogenética da planta, da estação na qual os explantes são obtidos (THORPE, 1991). Dessa forma, a seleção e o manejo da fonte do explante é um importante aspecto no sucesso da micropropagação por segmentos nodais de plantas adultas, além disso, deve-se considerar as características genéticas e epigênicas (juvenilidade) da fonte dos explantes, o controle de patógenos e as condições físicas da planta (HARTMANN et al., 2002).

Uma das maiores dificuldades do estabelecimento de segmentos nodais *in vitro* é a grande contaminação e oxidação inicial dos explantes. A desinfestação é o processo no qual se remove a contaminação no intuito de regenerar ou propagar plantas sadias (HARTMANN et al., 2002). Dentre os produtos mais conhecidos na assepsia dos explantes está o hipoclorito de sódio (NaOCl), usado geralmente na dose de 1 a 5%, por intervalos de 5 e 30 min. A grande vantagem desse agente desinfestante se deve a sua solubilidade em água e, portanto, a facilidade de remoção apenas com os enxágues, diminuindo os efeitos tóxicos residuais nos tecidos. Imersões em etanol 70% também são usadas, contudo, podem provocar toxicidade aos explantes quando utilizado em longos períodos de tempo (BARRUETO CID e ZIMMERMANN, 2006). É sabido que baixas doses de um agente desinfetante associadas a curtos tempos de imersão favorecem a sobrevivência dos explantes, contudo, essa condição nem sempre promove uma desinfestação adequada. No caso inverso, o controle do patógeno pode ser mais eficiente, porém, a viabilidade

dos explantes pode ser reduzida, com perdas de material por fitotoxidez (BARRUETO CID e ZIMMERMANN, 2006).

Vários autores têm verificado a ocorrência de oxidação e contaminação endógena em explantes de erva-mate, especialmente quando estes provêm de plantas diretamente do campo (PANICK, 1995; MROGINSKI et al., 1999; BERNASCONI et al., 1996; MROGINSKI et al., 2000; SANTOS e WENDLING, 2003). Estudos indicam a existência de uma grande dificuldade em desenvolver protocolos eficazes de desinfestação dos explantes de erva-mate, com superação dos efeitos fitotóxicos ocasionados pela oxidação dos fenóis. Para minimizar a contaminação, os explantes têm sido retirados de plantas que se encontram em condições de viveiro (BERNASCONI et al., 1996), e que foram submetidas a tratamentos periódicos com fungicidas antes da coleta dos explantes (PANICK, 1995; ZANIOLO e ZANETTE, 1999; HÖRNER et al., 2002).

### 3.3.2.2 Cultivo de embriões

O cultivo de embriões *in vitro* pode ser utilizado no estudo das necessidades fisiológicas e nutricionais dos embriões, no resgate de híbridos, na superação de dormência de sementes, além de propiciar a redução do tempo de germinação, por, geralmente, não necessitar de período de latência (HU e FERREIRA, 1990; LITZ, 1991; HARTMANN et al., 2002).

Em sementes que necessitam de estratificação, luz ou um período pós-maturação, a aplicação de fitorreguladores geralmente é benéfica para a germinação, especialmente as giberelinas, as citocininas e o etileno, por estarem relacionados com a quebra de dormência das sementes (ZAIDAN e BARBEDO, 2004). Aproximadamente 20% de embriões de erva-mate, em estágio de coração, converteram-se em plântulas quando cultivados *in vitro* em meio de cultura sem citocinina, porém, a adição desta ao meio pode modificar a taxa de desenvolvimento dos mesmos (SANSBERRO et al., 1998). Dessa maneira, quanto mais imaturo o embrião excisado, maior a exigência e, para muitas espécies, a adição de fitorreguladores é indispensável (HU e FERREIRA, 1990). Em erva-mate, embriões cultivados *in vitro* em meio acrescido de baixas doses de citocinina, originaram uma maior percentagem de germinação a partir dos 14 dias (SANSBERRO et al., 1998).

Após a formação dos cotilédones, o embrião passa de um estado heterotrófico para autotrófico, tornando-se menos exigente em termos de meio de cultivo (LITZ, 1991).

Os embriões de erva-mate, provenientes de frutos em vários estágios de maturação, apresentam divergências quanto ao crescimento *in vitro* quando submetidos à luz e ao escuro (FERREIRA et al., 1991). Dessa forma, enquanto que embriões provenientes de sementes, presentes em frutos brancos, não apresentaram diferenças no crescimento, embriões de frutos maduros (vermelhos ou pretos) apresentaram inibição no crescimento quando submetidos à luz (FERREIRA et al., 1991). Além disso, a maioria dos embriões excisados de sementes advindas de frutos claros cresce melhor *in vitro* do que embriões de sementes de frutos maduros, sugerindo a presença de inibidores que se acumulam no final do estágio de maturação dos frutos (FERREIRA et al., 1991). Em *Ilex opaca*, grande parte dos embriões cresce no escuro, porém, há pouco ou nenhum crescimento quando são incubados sob condições onde haja luminosidade (HU, 1976). Muitas variações no comportamento dos embriões também ocorrem em consequência da planta matriz e do controle genético, podendo influenciar no sucesso do estabelecimento *in vitro* (FERREIRA et al., 1991).

### 3.3.3 Multiplicação

A fase de multiplicação consiste na reprodução dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos em meio de cultura próprio, com o principal objetivo de produzir o maior número de plantas possíveis. Com relação ao meio de cultivo, a fase de multiplicação se caracteriza por possuir maiores doses de citocinina e, nos casos em que é necessário alongar os brotos, meios com menores doses de citocinina promovem maior alongamento, assim como maiores taxas de multiplicação (ALFENAS et al., 2004).

A multiplicação é um importante processo da micropropagação, podendo ser conduzida pela proliferação de gemas axilares, pela indução de gemas adventícias, tanto por organogênese direta quanto indireta, e pela embriogênese somática (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A proliferação de gemas ocorre, especialmente, em órgãos meristemáticos, os quais são estimulados a crescer com a manipulação de fitorreguladores no meio de cultura, originando novas partes aéreas ou tufos de brotos. Este sistema possibilita uma grande fidelidade genética do

material originado, com taxa de propagação relativamente alta, além da obtenção de plantas com bom crescimento (XAVIER et al., 2007). O sistema de micropropagação por organogênese envolve a obtenção de eixos caulinares monopolares, originados de gemas axilares pré-existentes ou de adventícias neoformadas (XAVIER et al., 2007). A embriogênese somática se refere ao desenvolvimento de embriões por meio de células somáticas, se diferenciando dos dois processos anteriores de micropropagação (via organogênese) por apresentar estruturas bipolares com sistemas vasculares fechados, enquanto que os outros dois métodos apresentam estruturas monopolares (SCHULTHEIS et al., 1990). A utilização de uma técnica em detrimento à outra varia em função da espécie, dos objetivos, da disponibilidade de material, equipamentos e mão-de-obra (XAVIER et al., 2007).

#### 3.3.4 Enraizamento

Brotos que crescem durante o estágio de multiplicação, usualmente não apresentam raízes, sendo necessário que sejam movidas a um meio de cultura ou à condições propícias ao enraizamento (HARTMANN et al., 2002). O enraizamento de espécies lenhosas é afetado pelo grau de maturidade dos tecidos, sendo o sucesso dessa fase determinado, em grande parte, pela qualidade dos brotos formados durante a multiplicação. O processo do enraizamento pode ser dividido em três etapas: de indução, iniciação e alongamento de raízes, com as duas primeiras fases podendo ser realizadas como uma só. Além disso, no enraizamento de plantas, o melhor método é que todas as fases possam ser conduzidas de uma vez, sem a necessidade de manipulação adicional (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O enraizamento de plantas micropropagadas pode ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*, contudo, usualmente as raízes desenvolvidas *in vitro* não apresentam as mesmas características daquelas produzidas durante a aclimatização, especialmente no que se refere à capacidade de absorção de água e nutrientes. A indução de raízes *in vitro* proporciona maiores chances de sobrevivência da planta durante a aclimatização, possibilitando que novas raízes funcionais sejam formadas (DE KLERK, 2002; PREECE e SUTTER, 1991). O tipo de sistema radicular formado no processo de enraizamento *in vitro* também determina o sucesso do transplante, sendo as raízes curtas mais eficazes do que as longas, pois facilitam a retirada do meio e o transplante ao substrato (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).



### 3.3.5 Aclimatização

A micropropagação de plantas se torna completamente inviável quando a aclimatização não é eficaz (HAZARIKA, 2003). Assim, a maioria das espécies que cresce *in vitro* requer um processo de aclimatização para assegurar a sobrevivência e o vigor de crescimento em ambiente externo (PREECE e SUTTER, 1991), pois, plantas micropropagadas necessitam ter suas características físicas e fisiológicas gradualmente adequadas às condições *ex vitro* (HAZARIKA, 2003).

A aclimatização envolve a transferência dos explantes de uma condição heterotrófica para uma autotrófica (HARTMANN et al., 2002) e, de uma situação de fluxo transpiratório reduzido, para um ambiente no qual a taxa de transpiração é maior, podendo ocasionar estresse hídrico nas plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PREECE e SUTTER, 1991; HAZARIKA, 2003). Assim, dentre os fatores que determinam o sucesso da aclimatização, destaca-se a habilidade da planta de passar da condição heterotrófica para a autotrófica, os fatores abióticos a que a planta estará exposta (como umidade relativa, temperatura, luminosidade, tipo de substrato, entre outros), os fatores bióticos (pragas e doenças), a presença ou a capacidade de produzir novas raízes e a nutrição da planta (PREECE e SUTTER, 1991; HARTMANN et al., 2002; PAIVA e OLIVEIRA, 2006).

A sobrevivência das plantas durante a aclimatização está estreitamente relacionada com a habilidade autotrófica destas, a qual depende da capacidade de captação da radiação para a fixação de carbono, além da absorção de água para a translocação de minerais e fotoassimilados (PAIVA e OLIVEIRA, 2006), necessários para manter o crescimento da planta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A manutenção de alta umidade relativa é crucial para a sobrevivência, por causa do pouco controle da transpiração que a planta apresenta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PREECE e SUTTER, 1991). O controle da luminosidade também é fundamental, pois as plantas *in vitro* estão expostas a níveis de claridade relativamente baixos, além das folhas apresentarem características diferentes daquelas adaptadas à condição de pleno sol (PREECE e SUTTER, 1991).

## 4. CAPÍTULO I – PROPAGAÇÃO POR ESTAQUIA DE ERVA-MATE

### 4.1 Introdução

A dificuldade de obtenção de mudas de erva-mate por meio de sementes, em consequência da dormência do embrião, além da multiplicação sem nenhum tipo de seleção, são apontadas como as principais causas da baixa produtividade dos ervais plantados (HIGA, 1983), cujas mudas provêm quase que 100% da propagação sexuada (MAYOL, 2003). A seleção de plantas de erva-mate para caracteres de interesse e a possibilidade de multiplicação vegetativa permite a obtenção de clones com alta qualidade, aprimorando o produto final. Assim, programas de melhoramento genético utilizam a seleção clonal em povoamentos de alta variabilidade genética na identificação de plantas matrizes para posterior propagação vegetativa (NIKLAS, 1986).

O uso de técnicas de propagação vegetativa é vantajoso quando há restrições na obtenção de mudas por semente ou quando se objetiva propagar árvores que apresentem características desejáveis, a exemplo da resistência a doenças, da tolerância à deficiência hídrica e nutricional, e da adaptação de plantas a solos degradados (XAVIER e SANTOS, 2002). Dentre as diversas técnicas de propagação vegetativa, a estaquia tem sido amplamente utilizada na silvicultura clonal, favorecendo a formação de florestas de alta produtividade (XAVIER e SANTOS, 2002). Além disso, a estaquia é a forma mais rápida para produção de mudas, fornecendo maior uniformidade, se comparada às mudas obtidas por sementes (GRAÇA et al., 1988). As mudas de erva-mate provenientes de estaquia atingem porte adequado para o plantio a partir dos seis meses de idade, enquanto que as provenientes de sementes somente a partir dos 12 meses, podendo chegar até a 24 meses após a semeadura (CARVALHO, 2003).

Apesar da propagação vegetativa da erva-mate ser estudada há bastante tempo, ainda ocorre uma grande dificuldade no enraizamento de material adulto, não existindo protocolos adequados para esta finalidade (GRAÇA et al., 1988). Dessa forma, a fim de facilitar o enraizamento, utilizam-se explantes coletados de regiões

meristemáticas, ou ainda, de brotos induzidos por poda drástica, promovendo o rejuvenescimento dos tecidos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Mesmo em estacas oriundas de tecidos rejuvenescidos, a utilização de fitorreguladores pode aumentar o potencial de enraizamento (IRITANI e SOARES, 1981), especialmente quando associada ao adequado comprimento da estaca. O fitorregulador mais utilizado neste caso é a auxina AIB, em doses que variam de 0 a 13000 mg L<sup>-1</sup> para erva-mate (PICHETH, 1997). Já o comprimento de estaca, pela quantidade de reservas armazenadas, influencia a sobrevivência e o enraizamento (HARTMANN et al., 2002), além da taxa de multiplicação, que pode ser maximizada pela menor quantidade de material requerido para a preparação de estacas curtas ou de gema única (EDEN, 1958).

O objetivo desse estudo foi avaliar a propagação vegetativa de plantas adultas de erva-mate, por meio de estacas de brotos de ano, utilizando diferentes doses de AIB e tamanho de estacas.

## 4.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Viveiro Florestal e no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com instalação realizada no mês de julho de 2006.

Para o preparo das estacas, foram coletados ramos jovens de uma planta com aproximadamente 10 anos de idade, originada da estaquia de ervais nativos. Os brotos foram colocados em água fria e, imediatamente, transportados para o Viveiro Florestal da UFSM. As estacas foram preparadas em dois comprimentos distintos, sendo submetidas à desinfestação por meio da imersão em solução de NaOCl na dose de 0,625% por cinco min., lavadas em água corrente e, posteriormente, imersas por 15 min. em solução de Captan<sup>®</sup> (2 ml L<sup>-1</sup>) + Cercobin<sup>®</sup> (1,5 g L<sup>-1</sup>), conforme adaptado de Graça et al. (1988).

Os tratamentos utilizados no teste de enraizamento consistiram de três doses de AIB (0, 4000 e 8000 mg L<sup>-1</sup>) e os comprimentos de estacas de 3,0 cm ± 1 cm, com meia folha e 10,0 cm ± 1 cm, com um par de meias folhas. O AIB foi diluído em solução alcoólica na proporção de 50%, e aplicado pela imersão da base das estacas por 10 segundos. Após, as estacas foram plantadas em substrato composto por vermiculita de granulometria média, em caixas plásticas que foram dispostas em

estufa, com sistema de irrigação por microaspersão, acionado por dois minutos a cada hora e, durante os horários de maior demanda evaporativa, por dois minutos a cada meia hora. Aos 135 dias as estacas foram avaliadas quanto à sobrevivência, o enraizamento, o número de brotos, de folhas e de raízes e o comprimento de brotos e de raízes.

O experimento foi conduzido em um fatorial 3 x 2 (três doses de AIB e dois comprimentos de estaca), em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco estacas. Os dados foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com o auxílio do programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os dados de porcentagem foram transformados para  $\arcseno\sqrt{x}/100$  e de contagem e comprimento para  $\sqrt{x} + 0,5$ .

### 4.3 Resultados e Discussão

Houve interação significativa entre o tamanho das estacas e tratamento com AIB somente para a porcentagem de sobrevivência e para o número de folhas (Tabela 1). As diferentes doses de AIB afetaram a sobrevivência das estacas de 3 cm, não sendo observada diferença significativa entre as dosagens de AIB utilizadas para estacas de 10 cm. Em estacas de 3 cm foi verificada uma maior sobrevivência no tratamento sem adição do fitorregulador AIB (testemunha), seguido dos tratamentos utilizando as doses de 4000 mg L<sup>-1</sup> e de 8000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Quando comparado o comprimento das estacas, as de 10 cm obtiveram uma sobrevivência inferior às de 3 cm no tratamento testemunha. Além disso, foi observado que tanto estacas de 3 cm quanto estacas de 10 cm não apresentaram diferença na porcentagem de sobrevivência quando utilizadas as doses de 4000 mg L<sup>-1</sup> e de 8000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, contudo, as estacas maiores apresentaram um maior número de folhas quando tratadas com doses mais altas de AIB (8000 mg L<sup>-1</sup>). Os tratamentos com fitorregulador utilizados em estacas menores não ocasionaram diferenças para o número de folhas formadas, somente quando estas foram comparadas às estacas maiores tratadas com 8000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Estacas de 10 cm apresentaram um maior número de folhas, sendo observado também um aumento no número de folhas à medida que se aumentou a dose de AIB (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentagem de sobrevivência e número de folhas para estacas de ano de plantas adultas de erva-mate. Santa Maria, RS, 2007.

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> de AIB)	Percentagem de sobrevivência		Número de folhas	
	Estacas de 3 cm	Estacas de 10 cm	Estacas de 3 cm	Estacas de 10 cm
0	90,0 aA*	60,0 aB	4,9 aB	3,5 bB
4000	60,0 abA	55,0 aA	3,8 aB	4,5 aB
8000	40,0 bA	55,0 aA	4,1 aB	7,8 aA
<b>Média</b>	<b>63,3</b>	<b>56,7</b>	<b>4,3</b>	<b>5,3</b>
<b>CV (%)</b>	<b>17,2</b>	<b>17,2</b>	<b>12,8</b>	<b>12,8</b>

\*Valores seguidos de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A capacidade de sobrevivência das estacas está intimamente relacionada com uma maior chance de ocorrer o enraizamento. Assim, a sobrevivência geralmente é afetada pela dose de AIB aplicada, que pode apresentar efeito negativo quando em altas concentrações, e pelo tamanho da estaca, que pode influenciar na reserva de nutrientes necessários a sobrevivência e ao início do enraizamento (HARTMMAN et al., 2002). Nesse trabalho, a adição de fitorregulador influenciou a sobrevivência somente em estacas de menor comprimento, não demonstrando efeitos significativos para as estacas maiores. Outros autores também encontraram diferenças de sobrevivência em estacas de plantas adultas de erva-mate quanto à aplicação de AIB e ao comprimento de estaca utilizado. Picheth (1997) verificou que as melhores percentagens de sobrevivência para estacas de erva-mate foram obtidas na testemunha, sem aplicação de AIB. Iritani e Soares (1981) observaram que doses menores de AIA (3000 mg L<sup>-1</sup>) influenciam positivamente na sobrevivência das estacas. Além disso, a utilização de um substrato adequado, como a vermiculita, além de um ambiente controlado e com nebulização, aumentaram as chances de sobrevivência das mudas obtidas por estaquia (GRAÇA et al., 1988). Por outro lado, Molina e Mayol (2003), em trabalho de estaquia de erva-mate, demonstraram que não há associação entre o comprimento das estacas e o índice de mortalidade encontrado nas mesmas, somente encontrando correspondência entre o diâmetro das estacas e a sobrevivência.

A aplicação de AIB aumentou a quantidade de estacas enraizadas e o comprimento das raízes formadas, com os melhores resultados obtidos nas doses de 4000 e 8000 mg L<sup>-1</sup> de AIB respectivamente (Tabelas 2) e, as maiores percentagens de enraizamento, em estacas de menor comprimento (Tabela 3 e Figuras 1A e 1B). Dessa forma, o enraizamento foi afetado tanto pela dose de AIB utilizada na solução quanto pelo comprimento das estacas. As estacas de 10 cm apresentaram o maior número de brotos, contudo, a aplicação de AIB não influenciou na indução de brotação em ambos os tipos de estacas. A ocorrência de um maior número de brotos e folhas nas estacas maiores era esperada, por causa do seu maior número de gemas e, pela maior quantidade de reservas. Tanto a aplicação de AIB quanto o tamanho das estacas não afetaram o número e o comprimento de raízes formadas. Houve formação de calo na base de todas as estacas (dados não apresentados).

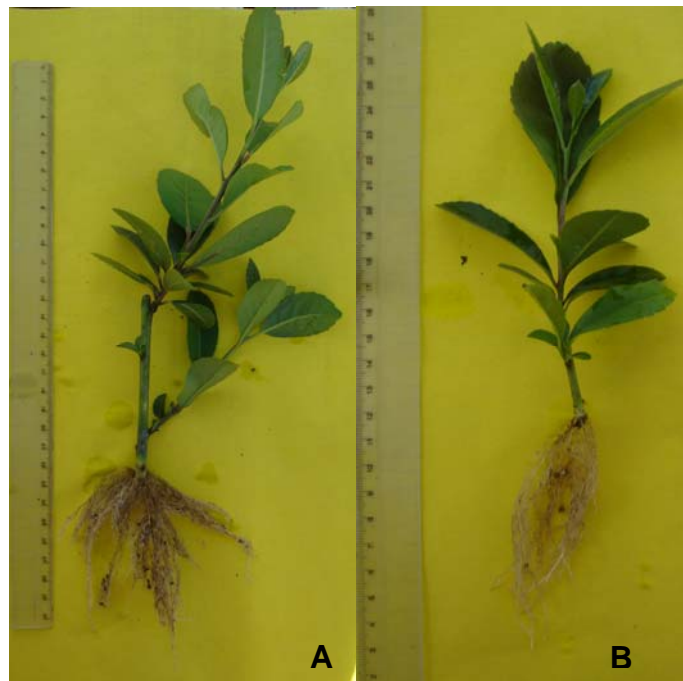


Figura 1 – Enraizamento de estacas de erva-mate em 4000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, aos 180 dias da instalação do experimento: estacas de 10 cm (A); estacas de 3 cm (B). Santa Maria, RS, 2007.

Tabela 2 – Percentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes e brotos formados em estacas de ano de plantas adultas de erva-mate tratadas com diferentes doses de AIB, aos 135 dias. Santa Maria, RS, 2007.

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> de AIB)	Enraizamento (%)	Número		Comprimento (cm)	
		Raízes	Brotos	Raízes	Brotos
0	17,5 b*	3,1 a	1,4 a	0,25 b	0,43 a
4000	37,5 a	3,1 a	1,0 a	0,91 a	0,84 a
8000	25,0 ab	2,7 a	1,2 a	1,00 a	0,57 a
<b>Média</b>	<b>26,7</b>	<b>2,9</b>	<b>1,2</b>	<b>0,72</b>	<b>0,61</b>
<b>CV (%)</b>	<b>21,8</b>	<b>16,9</b>	<b>10,5</b>	<b>15,7</b>	<b>19,9</b>

\*Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3 – Percentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes e brotos formados em estacas de ano de plantas adultas de erva-mate, em diferentes comprimento de estacas, aos 135 dias da instalação do experimento. Santa Maria, RS, 2007.

Comprimento de estacas	Enraizamento (%)	Número		Comprimento (cm)	
		Raízes	Brotos	Raízes	Brotos
3 cm	31,7 a	3,0 a	1,00 b	0,82 a	0,48 a
10 cm	21,7 b	2,9 a	1,40 a	0,66 a	0,75 a
<b>Média</b>	<b>26,7</b>	<b>2,9</b>	<b>1,2</b>	<b>0,74</b>	<b>0,61</b>
<b>CV (%)</b>	<b>21,8</b>	<b>16,9</b>	<b>10,5</b>	<b>15,7</b>	<b>19,9</b>

\*Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tarragó et al. (2005), em estudo de enraizamento de erva-mate, verificou uma alta correlação ( $r^2=0,72$ ) entre a retenção de folhas e a formação de raízes nas estacas, com formação de raízes somente no quadrante da folha. Em estacas obtidas de brotos de plantas adultas de vassourão branco (*Piptocarpha angustifolia*), a manutenção de pelo menos uma folha foi fundamental para a sobrevivência e emissão de brotos, mas nem todas foram capazes de enraizar (FERRIANI, 2006). O mesmo foi observado nesse trabalho, considerando que as estacas que perderam suas folhas não sobreviveram por muito tempo, sendo assim, parece que a manutenção da folha é fundamental para a sobrevivência da estaca. A mortalidade das estacas, muitas vezes, também está associada à oxidação na base das

mesmas. Já a diferença para o número de folhas e brotos encontrados nas estacas maiores pode ser um efeito do próprio enraizamento das mesmas, pois com o aumento da dose do fitorregulador houve um aumento do número de folhas e brotos nas estacas de 10 cm, além disso, a maior quantidade de reservas nas estacas maiores pode ter favorecido a formação de folhas.

O tratamento com fitorreguladores estimula a emissão de raízes em estacas de plantas adultas. Alguns estudos indicam que doses de AIB de até 13000 mg L<sup>-1</sup> podem ser utilizadas para promover o enraizamento de estacas de erva-mate (PICHETH, 1997), entretanto, doses superiores a 8000 mg L<sup>-1</sup> reduzem a percentagem de enraizamento, possivelmente ocasionado pelo efeito tóxico nas mesmas (GRAÇA et al., 1988). Além disso, o aumento da dose de fitorreguladores aumenta a formação de calo na base das estacas, o que pode dificultar o enraizamento em algumas espécies (HARTMANN et al., 2002).

Nesse trabalho, das estacas que sobreviveram até os 135 dias, mais da metade não enraizaram. Kricun (1995) menciona que estacas oriundas de plantas adultas de erva-mate apresentam dificuldades de enraizamento e, associado às diferenças genéticas entre clones e tipos de explantes, tem-se uma grande divergência do potencial de enraizamento entre plantas. Tavares et al. (1992) observou em materiais de diferentes procedências de erva-mate uma variação na capacidade de enraizamento de 0 a 100 %. Em explantes de plantas com mais de 60 anos resultaram em um enraizamento médio de apenas 7% (SAND, 1989). Já quando foram utilizadas plantas jovens, o enraizamento foi de até 80% (KRICUN e BELINGHERI, 2002) ou de 90% (SAND, 1989).

O menor comprimento disponibiliza uma maior quantidade de material vegetal para propagação, aumentando a taxa de multiplicação. No caso de brotos de cepa e de matrizes de erva-mate com pouca disponibilidade de material rejuvenescido, estacas de gema única maximizam o número de mudas produzidas, tendo em vista também que estacas menores apresentaram maiores percentagens de enraizamento. Mudas de *Camelia sinensis* são produzidas a partir de estacas de gema única com eficiência (EDEN, 1958), técnica que pode ser aplicada a outras espécies, incluindo a erva-mate. Já para o ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), o tamanho da estaca não afetou a taxa de enraizamento e o número de raízes formadas (NICOLOSO et al., 2001).



No enraizamento é fundamental que uma lâmina de água fina seja mantida sobre as folhas (ALFENAS et al., 2004), além disso, se faz necessário considerar a época de preparação das estacas, pois a atividade metabólica de estacas herbáceas ou semi-lenhosas é maior durante a primavera e o verão, o que facilita o enraizamento (TAVARES et al., 1992). Entretanto, para algumas espécies, como é o caso do plátano (*Platanus x acerifolia*), a melhor época para o enraizamento das estacas é durante os meses de inverno, quando a temperatura é mais amena (NICOLOSO et al., 1999).

A percentagem de enraizamento médio foi relativamente baixa nesse experimento. Esse resultado pode estar associado a idade da planta matriz, ao tipo de material utilizado para a estaquia, além das condições ambientais presentes. Entretanto, essas mudas produzidas por estaquia podem ser novamente utilizadas como fonte para coleta de brotos, promovendo o rejuvenescimento e, conseqüentemente, um maior enraizamento do material. Além disso, foi possível observar a possibilidade de utilização de estacas de menor comprimento para produção de mudas de erva-mate. A obtenção de um maior número de estacas por ramo pode ser vantajosa quando se tem pouca disponibilidade de material vegetal, aumentando a propagação e, no caso de utilização de minijardins clonais, pode ocasionar a diminuição dos custos, em conseqüência da maior produção de mudas em um menor espaço.

#### **4.4 Conclusões**

- A imersão das estacas de erva-mate em solução de 4000 mg L<sup>-1</sup> de AIB por 10 s, aumenta a percentagem de enraizamento das estacas de erva-mate.
- Estacas de erva-mate de 3 cm apresentam maior percentagem de enraizamento.

## 5. CAPÍTULO II – MICROPROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE

### 5.1 Introdução

A erva-mate pertence à família Aquifoliaceae, que compreende mais de 500 espécies do gênero *Ilex* distribuídas em regiões temperadas e tropicais de ambos hemisférios (HU, 1989). A maioria dessas espécies apresenta dormência nas sementes, causada pelo embrião rudimentar e, requerem de um período de estratificação antes de poder germinar (HU, 1975; NIKLAS, 1987; SANSBERRO et al., 1998; CARVALHO, 2003), dificultando a produção de mudas por meio de sementes.

O cultivo de embriões zigóticos de espécies de *Ilex in vitro*, pode ser utilizado para superar a dormência das sementes e reduzir o ciclo de reprodução da espécie (HU, 1989), além de ser uma forma mais rápida de propagação, em consequência da eliminação do endosperma (HU et al., 1979; HU, 1989). Os embriões são também ótimas fontes de explantes para a micropropagação, por causa da natureza juvenil dos propágulos e, conseqüentemente, pelo alto poder regenerativo que apresentam (HU e FERREIRA, 1990).

Por ser uma planta alógama, o estudo e o desenvolvimento de protocolos de propagação vegetativa *in vitro* são relevantes para o melhoramento da erva-mate (SANSBERRO et al., 2000). O cultivo *in vitro* de plantas adultas pode ser realizado por meio de segmentos nodais e ápices caulinares, podendo otimizar a propagação vegetativa de plantas matrizes selecionadas, além de possibilitar altas taxas de multiplicação e a produção de mudas livres de patógenos (XAVIER et al., 2007). Entretanto, o estabelecimento *in vitro* de explantes adultos é dificultado pela recalcitrância dos tecidos (THORPE et al., 1991), pela presença de patógenos de difícil eliminação e pela oxidação. Assim, métodos eficientes de desinfestação devem ser desenvolvidos para o estabelecimento e produção de propágulos assépticos de erva-mate.

Os objetivos desse trabalho foram desenvolver um protocolo de desinfestação para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de plantas adultas de erva-mate e realizar a micropropagação de plantas originadas a partir de embriões zigóticos desta espécie.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biotecnologia e Melhoramento de Plantas do Departamento de Fitotecnia da UFSM, Santa Maria, RS. A sala de cultivo foi mantida a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de aproximadamente  $14,3 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ .

### 5.2.2 Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais

Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais foram utilizadas oito plantas de erva-mate, com aproximadamente 10 anos de idade, provenientes de estaquia. As cepas foram retiradas do campo, preservando-se entre 10 e 15 cm da parte aérea e do sistema radicular, transplantadas em vasos com substrato plantmax® + vermiculita (1:1), permanecendo em estufa para a emissão de brotos. Dois meses após o corte, as cepas já apresentavam brotos aptos à coleta para o estabelecimento *in vitro* (Figura 2).



Figura 2 – Cepas de erva-mate em vaso, com brotos aptos à coleta para o estabelecimento *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.

Anterior ao estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais, os brotos foram submetidos à aplicação diária dos fungicidas Captan® (2 ml L<sup>-1</sup>) e Cercobin® (1,5 g L<sup>-1</sup>), durante 5 dias. Após esse período, os brotos fornecedores de explantes foram coletados e, em laboratório, as folhas retiradas. Os explantes foram lavados em água corrente e divididos em segmentos de 1,0 a 1,5 cm, com a presença de uma gema. A desinfestação foi realizada com a imersão dos segmentos nodais em álcool 70% por 2 ou 4 min., seguido da imersão em solução contendo 2% de NaOCl e duas gotas de tween 20, durante 15, 25 ou 35 min. Após, foram submetidos a cinco enxágües em água destilada e autoclavada. As porções terminais dos explantes foram retiradas antes da inoculação.

O meio de cultura foi composto por ¼ da concentração dos sais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,01% de mio-inositol e 0,65% de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7. O experimento foi conduzido em frascos de 10 mL contendo 3 mL de meio de cultura por frasco.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com oito repetições de cinco frascos, contendo um explante por vidro. Aos 15 dias foram avaliadas as percentagens de contaminação por fungos e bactérias, de oxidação e sobrevivência dos segmentos.

### 5.2.3 Estabelecimento *in vitro* de embriões zigóticos

As sementes de erva-mate foram obtidas no Viveiro Florestal da UFSM. Para o estabelecimento *in vitro*, as sementes foram imersas em água destilada por 24 h e, posteriormente, submetidas a desinfestação por meio da imersão em álcool 70% por 5 min., seguido da imersão em solução de NaOCl na concentração de 2%, acrescido de duas gotas de tween 20, durante 30 minutos. Após, as sementes foram submetidas a cinco enxágües com água destilada e autoclavada e, com o auxílio de microscópio estereoscópico, foi realizada a excisão dos embriões, conforme descrito por Hu (1989). Os embriões foram inoculados em meio de cultura MS com ¼ da concentração dos sais (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 3% de sacarose, 0,01% de mio-inositol, 0,65% de ágar e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de BAP (SANSBERRO et al. 1998), com pH ajustado para 5,7. Os embriões permaneceram em frascos de 10 mL contendo 3 mL de meio de cultura, com um embrião por frasco.

Os frascos foram mantidos em sala de cultivo no escuro por 14 dias e, posteriormente, transferidos para condição de fotoperíodo de 16 horas.

#### 5.2.4 Teste de meio de cultura

As plântulas de erva-mate, obtidas de embriões zigóticos, com 60 dias de cultivo, foram transferidas para diferentes meios de cultura. Os meios utilizados no experimento foram o MS completo (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS com  $\frac{1}{4}$  da concentração de sais e o WPM completo (LLOYD e McCOWN, 1981), suplementados com 3% de sacarose, 0,01% de mio-inositol, 0,65% de ágar, e pH ajustado para 5,7. O experimento foi conduzido em frascos de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura. As plantas foram mantidas em sala de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, cada repetição composta por seis frascos e um explante por frasco. Para verificar o incremento da altura das plântulas e do número de folhas, realizou-se uma avaliação anterior à aplicação dos tratamentos, e outra após 50 dias de cultivo.

#### 5.2.5 Multiplicação *in vitro*

Para o experimento de multiplicação foram utilizadas plântulas obtidas de embriões zigóticos que sofreram três subcultivos em meio com  $\frac{1}{4}$  de MS. Os tratamentos consistiram em diferentes doses de BAP (0; 0,01; 0,1; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) no meio de cultura com  $\frac{1}{4}$  de MS, acrescido de 3% de sacarose, 0,01% de mio-inositol, 0,65% de ágar, com pH ajustado para 5,7. O experimento foi conduzido em frascos de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições e cinco frascos por repetição, com um explante por frasco. Para verificar o incremento da altura das plantas, do comprimento dos brotos, do número de brotos, entrenós e folhas, realizou-se uma avaliação anterior à aplicação dos tratamentos, e outra após 50 dias de cultivo. Após as avaliações, as plantas foram cultivadas no meio de cultura que apresentou o melhor resultado, com subcultivos sucessivos no mesmo, sendo mantidas como microcepas para coleta de brotos.

### 5.2.6 Enraizamento *in vitro*

Para os experimentos de enraizamento, foram utilizados brotos de plantas de erva-mate advindas do meio de multiplicação com  $\frac{1}{4}$  do MS acrescido de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos de enraizamento foi o  $\frac{1}{4}$  do MS com 3% de sacarose, 0,01% de mio-inositol, 0,65% de ágar e pH ajustado para 5,7. Os experimentos foram conduzidos em frascos de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura. Os brotos tinham de 0,8 a 1,0 cm de comprimento, com no mínimo um par de folhas cortadas a um terço.

No primeiro experimento foram testados o enraizamento em uma fase, com a presença de auxina durante todo o tempo ou, em duas fases, a primeira com auxina e a segunda sem a presença de fitorregulador no meio. Assim, parte dos brotos permaneceu em meio com o AIB até os 30 dias de cultivo (uma fase), outra parte foi retirada do meio contendo AIB, aos 15 dias, e transferida para meio de cultura sem auxina, permanecendo neste por mais 15 dias (duas fases). As doses de AIB utilizadas em ambos os tratamentos foram de 0, 1,0 e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Em um segundo experimento, foram testadas diferentes doses de AIB (0, 0,5, 1,0 e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e, no terceiro experimento, as doses 0, 1,5, 3,0 e  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de quatro explantes por frasco. Aos 30 dias foram realizadas as avaliações quanto à ocorrência de enraizamento, o número e o comprimento das raízes formadas, a presença de calo, o número de folhas e a altura das plantas.

### 5.2.7 Aclimatização

A aclimatização foi realizada apenas em plantas que apresentavam no mínimo três pares de folhas. As plantas tiveram suas raízes lavadas para a retirada do meio de cultura, sendo transplantadas em copos plásticos, com dois furos de drenagem, preenchidos com diferentes tipos de substrato.

Os substratos testados foram areia, casca de coco (*Cocus nucifera*) em pó e vermiculita média, sendo autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 45 min. antes do transplante. Posteriormente, os copos foram cobertos com filme plástico de polivinilcloro (PVC),

para evitar uma perda excessiva de água, permanecendo em sala de cultivo com temperatura e luminosidade controlada. As plantas foram irrigadas de dois em dois dias com água destilada e, uma vez por semana, com meio de cultura  $\frac{1}{4}$  do MS líquido, sem adição de sacarose. Após 30 dias, o filme plástico foi retirado, com transferência das plantas para estufa.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições e, cada repetição composta por cinco plantas. A percentagem de sobrevivência foi avaliada aos 30 dias de cultivo.

### 5.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados pelo teste de Tukey ou análise de regressão, em nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com o auxílio do programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os dados de percentagem foram transformados para  $\arcseno\sqrt{x/100}$  e de contagem e comprimento para  $\sqrt{x} + 0,5$ .

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1 Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais

Os diferentes tratamentos de desinfestação de segmentos nodais de erva-mate, com álcool 70% e NaOCl 2%, afetaram as percentagens de oxidação e sobrevivência dos explantes (Tabela 4). A maior taxa de sobrevivência foi obtida no tratamento 5, ou seja, com imersão dos explantes em álcool 70% por 4 min. e em NaOCl por 25 min., sendo observado que nos demais tratamentos ocorreram maiores combinações de oxidação e contaminação dos segmentos nodais. Os tratamentos 5 e 6 apresentaram as maiores percentagens de oxidação, o que pode ter ocorrido pelo maior tempo de exposição dos segmentos ao etanol. Já a menor percentagem de oxidação foi obtida com a imersão dos explantes em solução de álcool 70% por 2 min. e em 2% de NaOCl por 15 min., não diferindo estatisticamente dos tratamentos 2, 3 e 4. Além da oxidação, uma alta percentagem de explantes também apresentava a presença de bactérias e fungos ou a combinação dos mesmos. A contaminação por fungos e bactérias não diferiu entre os tratamentos

realizados, entretanto, no estágio inicial de cultivo, houve uma maior contaminação por fungos do que por bactérias.

Tabela 4 – Percentagens de contaminação por fungos e/ou bactérias, de oxidação e de sobrevivência, em segmentos nodais de erva-mate, aos 15 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.

Álcool 70% + NaOCl (Tempo)	Fungos (%)	Bactérias (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
T1: 2 min. + 15 min.	40,0 a*	30,0 a	15,0 a	35,0 ab
T2: 2 min. + 25 min.	47,5 a	27,5 a	22,5 a	30,0 b
T3: 2 min. + 35 min.	45,0 a	22,5 a	25,0 a	30,0 b
T4: 4 min. + 15 min.	40,0 a	27,5 a	27,5 a	30,0 b
T5: 4 min. + 25 min.	40,0 a	27,5 a	30,0 b	42,5 a
T6: 4 min. + 35 min.	42,5 a	27,5 a	52,5 b	37,5 ab
<b>Média</b>	<b>42,5</b>	<b>27,1</b>	<b>28,7</b>	<b>34,2</b>
<b>CV (%)</b>	<b>12,7</b>	<b>16,8</b>	<b>18,5</b>	<b>15,3</b>

\* Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Há uma grande diferença entre a contaminação de materiais provenientes de plantas jovens e de plantas adultas (PANICK, 1995). Alguns autores, trabalhando com segmentos nodais de plantas adultas de erva-mate em campo, não conseguiram realizar o estabelecimento *in vitro*, enquanto que plantas advindas de estacas e mantidas em condições de viveiro apresentaram menor contaminação e maior sobrevivência (REY e MROGINSKI, 1988; MROGINSKI et al., 1996). Zaniolo e Zanette (2001), no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de plantas de dois anos de idade, obtiveram uma sobrevivência de 72,9%, utilizando 0,72% de NaOCl por 10 min. Santos e Wendling (2003), no estabelecimento *in vitro* de explantes de erva-mate procedentes de enxertias, encontraram os melhores resultados com NaOCl a 1,5% por 30 min. e álcool 70% por 2 min. Enquanto que Hörner et al. (2002) verificaram que a utilização de pré-tratamentos, com fungicidas e bactericidas, para o estabelecimento de segmentos nodais de erva-mate provenientes de plantas jovens, foi benéfica na redução de contaminação *in vitro*, sem necessidade de adicioná-los no meio de cultura.



Outros estudos indicaram que as menores taxas de oxidação de segmentos nodais de erva-mate foram encontradas nos tratamentos com menores doses ou períodos de exposição aos agentes desinfetantes (PAULA, 1992), e que a transferência dos explantes para um novo meio de cultura não reduziu a percentagem de oxidação em erva-mate (MROGINSKI et al., 1996). Já o meio de cultura com ¼ de MS pode reduzir a oxidação dos explantes pela baixa quantidade de sais presentes (REY et al., 1991; MROGINSKI et al., 1999). A época do ano também afeta a presença de patógenos nos explantes, com menores taxas de contaminação nos meses de primavera, quando as plantas apresentam um maior crescimento (PAULA, 1992). Por outro lado, quando utilizados explantes de plantas que cresceram em condições de baixa intensidade luminosa, a oxidação prematura dos explantes pode ser reduzida (REY e MROGINSKI, 1988). Entretanto, o cultivo sob diferentes intensidades luminosas não influenciou o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate (MROGINSKI et al., 1999). Outro fator que pode ser considerado é o tamanho do explante, de maneira que a presença de contaminantes tem sido diretamente proporcional, e a oxidação inversamente proporcional a esta variável (BERNASCONI et al., 1996). Assim, o cultivo de segmentos nodais maiores, pode minimizar a oxidação, porém com aumento da ocorrência de contaminação no meio (BERNASCONI et al., 1996).

No estabelecimento da cultura de tecidos, dependendo do explante usado, microorganismos superficiais e endofíticos podem ser levados para o cultivo (CASSELLS, 1991), o que pode representar um problema, especialmente em culturas anteriormente limpas, em estágios avançados de multiplicação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Nesse trabalho, observou-se que nos segmentos nodais de erva-mate que se estabeleceram, após algum tempo, apareceram bactérias na porção do explante em contato com o meio de cultura. Esse problema já foi relatado por outros autores, notando-se a presença de bactéria endógena em segmentos nodais de erva-mate depois de alguns subcultivos sucessivos (SANTOS e WENDLING, 2003). Em geral, essas bactérias não são patogênicas, mas, competindo com o meio de cultura, comprometem a multiplicação, o crescimento e o enraizamento do explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Assim, uma opção é o descarte desse material contaminado ou a utilização de tratamento curativo, com a adição de antibióticos ao meio de cultura, ou ainda, a aplicação de medidas preventivas durante a multiplicação, evitando-se a

manipulação de materiais contaminados e não contaminados ao mesmo tempo, por exemplo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Entretanto, para algumas bactérias, a utilização de antibióticos nos meios de cultura não promovem bons resultados para espécies florestais. Assim, uma outra linha de trabalhos futuros seria a utilização de meristemas ou ápices caulinares como fonte de explantes iniciais (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Nesse trabalho, o cultivo de segmentos nodais de plantas de erva-mate, com aproximadamente 10 anos de idade, apresentaram grande contaminação por fungos e bactérias, além da oxidação de parte dos explantes. Assim, para se obter explantes com boa condição sanitária, devem ser realizados alguns procedimentos antes da sua introdução *in vitro*, para diminuir o tempo de exposição aos agentes de desinfestação nos explantes e, conseqüentemente, reduzir a oxidação. Além disso, se faz necessária a realização de testes com outros agentes desinfestantes na assepsia de segmentos nodais de erva-mate, bem como a utilização de outros métodos, a exemplo do cultivo de meristemas e ápices caulinares.

### 5.3.2 Teste de meio de cultura

O cultivo das plântulas nos diferentes meios de cultura, não apresentaram diferenças significativas quanto ao incremento do número de folhas e da altura das plântulas cultivadas *in vitro* (Tabela 5). Entretanto, Rey et al. (1991) menciona que altas concentrações de sais do meio MS podem afetar o crescimento *in vitro* de espécies florestais. Em outros trabalhos, o meio MS com  $\frac{1}{4}$  de sais foi o mais eficaz para o estabelecimento de segmentos nodais de erva-mate *in vitro* (REY et al., 1991; MROGINSKI et al., 1999). Zaniolo e Zanette (1999) encontraram que o meio WPM foi equivalente ao meio MS completo na multiplicação de segmentos nodais dessa espécie.

Tabela 5 – Incremento do número de folhas e da altura de plântulas de erva-mate inoculadas em diferentes meios de cultura, após 50 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.

Meio de Cultura	Incremento	
	Altura (cm)	Número de folhas
MS	0,41 a*	3,4 a
¼ MS	0,44 a	5,1 a
WPM	0,50 a	3,5 a
<b>Média</b>	<b>0,45</b>	<b>4,0</b>
<b>CV (%)</b>	<b>17,6</b>	<b>19,2</b>

\*Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Nesse estudo, foi verificado que as plântulas de erva-mate podem ser mantidas tanto em meio MS completo, como no meio MS com ¼ da concentração dos sais e em meio WPM completo (Figura 3). Assim, selecionou-se o meio de cultura ¼ de MS, pela menor concentrações de sais presentes e, conseqüentemente, maior viabilidade econômica, além da utilização por outros estudos com diferentes explantes para erva-mate (REY et al., 1991; MROGINSKI et al., 1999). Esse meio pode, então, ser empregado tanto para a germinação quanto para o crescimento de plântulas de erva-mate produzidas a partir de embriões zigóticos, sendo também utilizado para os demais experimentos desse trabalho.

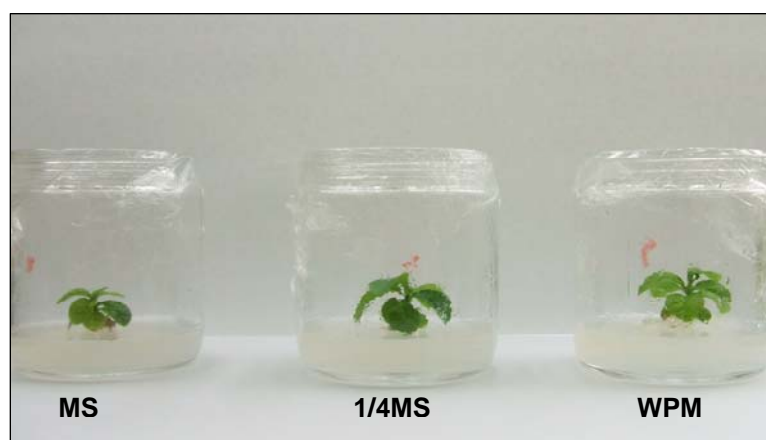


Figura 3 – Plântulas de erva-mate após 50 dias de cultivo em diferentes meios de cultura. Santa Maria, RS, 2007.

### 5.3.3 Multiplicação *in vitro*

A adição de BAP ao meio de cultura promoveu o aumento do número de brotos, de entrenós e de folhas em plantas de erva-mate, além de um aumento no comprimento dos brotos na dose de 2 mg L<sup>-1</sup>. Na ausência de BAP, o número de brotos/explante foi de 1,1, enquanto que na dose de 2 mg L<sup>-1</sup> foram observados 7,0 brotos/explante (Figura 4A). Quanto ao comprimento dos brotos, houve influência da aplicação de BAP, com aumento no comprimento à medida que se aumentou a dose deste fitorregulador, chegando a 3,3 cm na dose de 2 mg L<sup>-1</sup> (Figura 4B). Os brotos formados alongaram no meio contendo BAP (Figura 5), não sendo necessária a transferência para outro meio de cultura, o que elimina uma etapa do cultivo *in vitro*, com conseqüente diminuição dos custos. Estes resultados corroboraram com os obtidos por Majada et al. (2000), em estudo com *Ilex aquifolium*. O número de entrenós também foi maior na dose de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, praticamente o dobro da testemunha, com 2,1 e 4,1 entrenós/broto respectivamente (Figura 4C) e, o número de folhas/explante foi maior em meio com fitorregulador, alcançando cerca de 14,5 folhas/explante na dose de 2 mg L<sup>-1</sup> (Figura 4D).

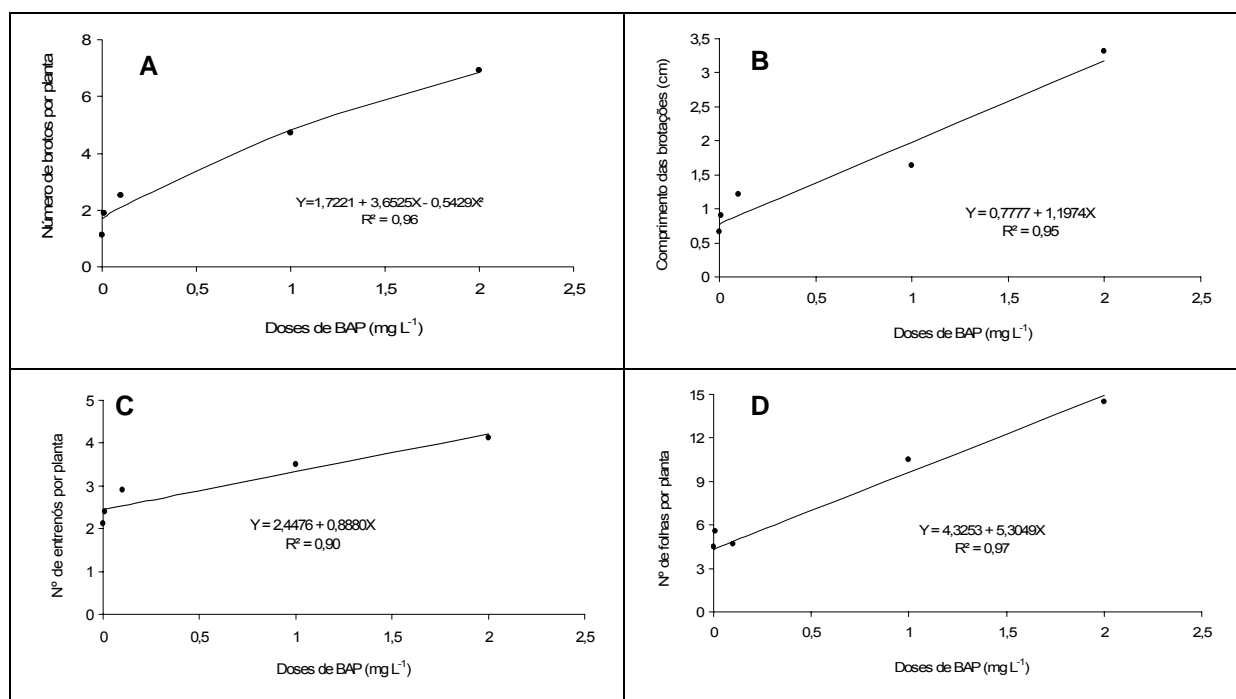


Figura 4 – Parâmetros observados por plântula de erva-mate cultivada em meio com ¼ de MS e diferentes doses de BAP, aos 50 dias de cultivo: número de brotos (A); comprimento de brotos (B); número de entrenós (C) e número de folhas (D). Santa Maria, RS, 2007.



Figura 5 – Aspecto da multiplicação *in vitro* de erva-mate após sucessivos subcultivos em meio nutritivo com  $\frac{1}{4}$  do MS, acrescido de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Santa Maria, RS, 2007.

Outros estudos apontaram que a utilização de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP otimizou a indução de brotos múltiplos em segmentos nodais de erva-mate (PAULA, 1992; ZANILOLO e ZANETTE, 1999). Sansberro et al. (1999) observou que segmentos nodais de erva-mate, cultivados *in vitro*, produziram brotos mesmo quando inoculados em meio sem fitorreguladores, sendo que o meio contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP estimulou a formação de brotos múltiplos, assim como de brotos com maior comprimento. Já Zaniolo e Zanette (2001) verificaram que com a adição de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, durante três subcultivos, foi possível incrementar a taxa de brotos para erva-mate. Na multiplicação de *I. aquifolium* foi observada uma maior indução de brotos em meios contendo BAP nas doses de  $1,0$  e  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  (MAJADA et al., 2000). Meios com carvão ativado e pequenas doses de BAP propiciam baixas taxas de multiplicação de segmentos nodais de erva-mate oriundos de plantas jovens

(PAULA, 1992), porém, a adição de altas doses desta citocinina no meio, diminuiu o comprimento de brotos em *I. aquifolium* (MAJADA et al., 2000).

Nesse experimento, após alguns subcultivos em meio  $\frac{1}{4}$  de MS, acrescido de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, observou-se a formação de tufo de brotos nos explantes (Figura 5), demonstrando a grande capacidade de rebrota dessa espécie. Dessa forma, a multiplicação *in vitro* de erva-mate pode ser realizada em meio de cultura com  $\frac{1}{4}$  do meio MS adicionado de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Essa mesma composição do meio de cultura pode ser usada para a produção de tufo e alongação de brotos em explantes de erva-mate. Além disso, a parte basal das plântulas fornecedoras de explantes podem ser mantidas no mesmo meio de cultura, para novamente fornecerem explantes, aumentando a taxa de multiplicação e, conseqüentemente, a maior produção de mudas de erva-mate, conforme verificado por Fick et al. (2007), com louro-pardo (*Cordia trichotoma*). Contudo, doses mais elevadas de BAP devem ser testadas para a determinação do ponto de máxima eficiência.

#### 5.3.4 Enraizamento *in vitro*

No enraizamento *in vitro*, os explantes de erva-mate que permaneceram em meio de cultura com  $\frac{1}{4}$  do MS, acrescido de 0, 1,0 e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, por 15 dias, não diferiram quanto à percentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes daqueles que permaneceram nas mesmas doses de AIB, por um período de 30 dias (Tabela 6). Os meios de cultura com a dose de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, em ambos os tempos de cultivo, resultaram nas maiores percentagens de enraizamento e número de raízes formadas. Além disso, os tratamentos com AIB promoveram uma maior percentagem de calos, independente do tempo de permanência em meio de cultura com essa auxina.

Tabela 6 – Enraizamento, número de raízes, comprimento de raízes, altura, número de folhas e presença de calos em brotos de erva-mate, submetidas a diferentes doses de AIB e tempos de exposição de 15 e 30 dias em meios com AIB, avaliados aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.

Dose de AIB	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comp. de raízes (cm)
0,0 mg L <sup>-1</sup>	37,5 b**	2,6 b	0,45 c
1,0 mg L <sup>-1</sup>	43,7 b	2,8 b	0,76 bc
1,0 mg L <sup>-1*</sup>	50,0 b	3,2 ab	0,98 bc
1,5 mg L <sup>-1</sup>	87,5 a	5,8 a	1,40 ab
1,5 mg L <sup>-1*</sup>	87,5 a	6,1 a	1,90 a
<b>Média</b>	<b>61,2</b>	<b>4,1</b>	<b>1,00</b>
<b>CV (%)</b>	<b>24,2</b>	<b>14,7</b>	<b>12,0</b>

Dose de AIB	Altura (cm)	Número de folhas	Presença de calo
0,0 mg L <sup>-1</sup>	1,0 ab	5,6 a	31,2 b
1,0 mg L <sup>-1</sup>	0,8 b	3,8 a	75,0 a
1,0 mg L <sup>-1*</sup>	1,1 ab	4,3 a	87,5 a
1,5 mg L <sup>-1</sup>	1,7 a	4,6 a	100,0 a
1,5 mg L <sup>-1*</sup>	1,4 ab	5,7 a	93,7 a
<b>Média</b>	<b>1,2</b>	<b>4,8</b>	<b>77,5</b>
<b>CV (%)</b>	<b>28,8</b>	<b>11,3</b>	<b>24,3</b>

\* Tratamentos que permaneceram em meio ¼ de MS com fitorregulador por 15 dias e mais 15 dias em meio ¼ de MS sem fitorregulador.

\*\* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Alguns estudos sugerem que, para o enraizamento de brotos de erva-mate, duas fases sejam realizadas. A primeira de indução, em que os explantes permaneceram em presença de 1,5 ou 3,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB e, a segunda fase, de crescimento das raízes sem a adição de auxina no meio (PAULA, 1992; SANSEBRO et al., 1999; ZANIOLO e ZANETTE, 2001). O enraizamento em duas fases pode aumentar o número de raízes formadas quando comparado ao enraizamento com uma única fase (PAULA, 1992). Entretanto, nesse trabalho não foram encontradas diferenças entre o cultivo em uma ou duas fases, sendo observada diferença apenas entre as doses de AIB utilizadas. Portanto, os resultados indicam que o enraizamento de explantes de erva-mate originário de plantas jovens, pode ser realizado em apenas uma fase, com presença de AIB.

No segundo experimento foi observado que a adição de AIB no meio de cultura favoreceu o enraizamento de brotos de erva-mate *in vitro*, com maior percentagem de brotos enraizados à medida que se aumentou a dose de fitorregulador no meio (Figura 6A), sendo verificado o mesmo para o número e o comprimento de raízes (Figura 6B e 6C). No tratamento com  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB foi observada uma média de 87% dos brotos enraizados, com 5,8 raízes/broto e comprimento de 1,1 cm, enquanto que na testemunha foram encontrados 37% de brotos com raízes, com o número e o comprimento de raízes de 2,6 raízes/broto e 0,45 cm respectivamente. Os explantes apresentaram uma média de 5,0 folhas/explante e uma altura média de 1,0 cm. A percentagem de calo na base dos explantes foi maior no tratamento com  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (Figura 6D).

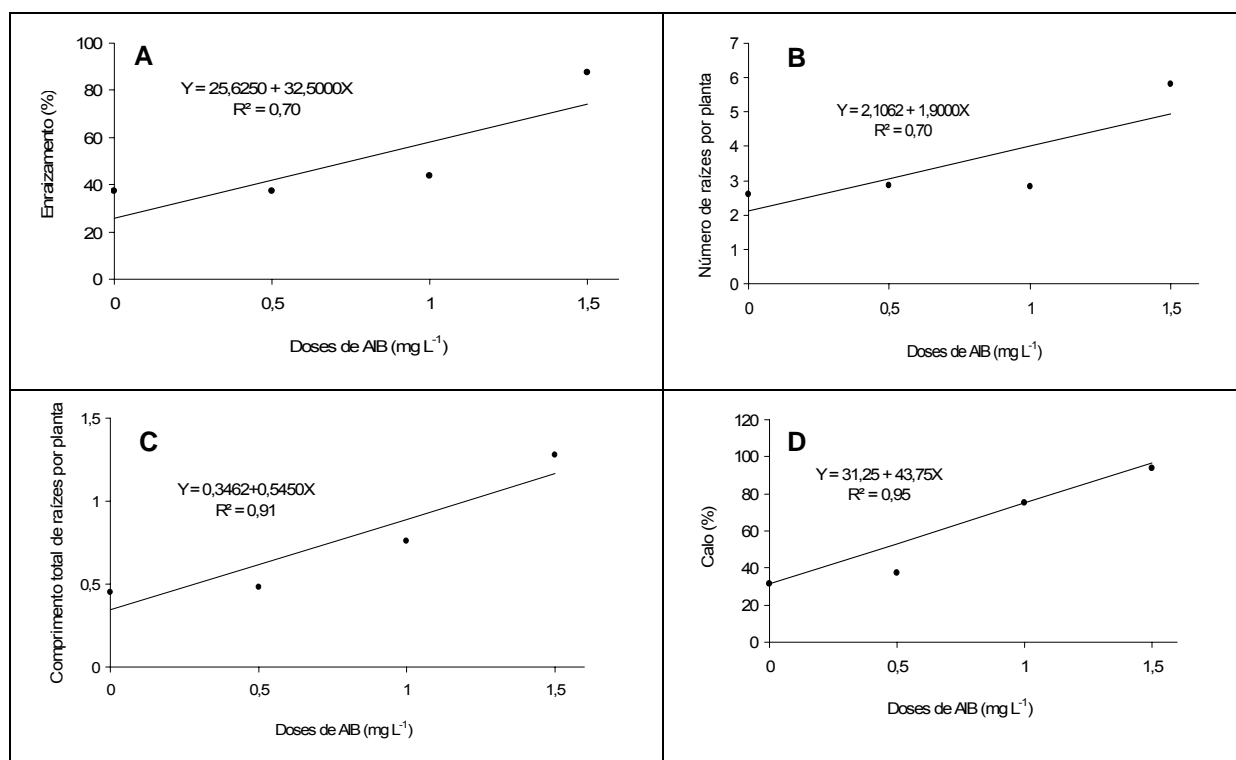


Figura 6 – Parâmetros observados em brotos de erva-mate colocados para enraizar em meio com  $\frac{1}{4}$  de MS, acrescido de diferentes doses de AIB (0; 0,5; 1,0 e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), aos 30 dias de cultivo; percentagem de enraizamento (A); número de raízes (B); comprimento de raízes de raízes (C); percentagem de explantes com calo (D). Santa Maria, RS, 2007.

Tendo em vista não ter ocorrido um ponto de máxima eficiência para as doses de AIB utilizadas no experimento anterior, realizou-se outro estudo com doses mais



elevadas. Foi observado que as doses de AIB de 0; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> afetaram o enraizamento, o número e o comprimento de raízes e a percentagem de calos formados, aos 30 dias de cultivo. Assim, meios com maiores doses de AIB promoveram um aumento da percentagem de enraizamento dos brotos de erva-mate, com 93% dos explantes enraizados no meio com 6 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Figura 7A). Porém, doses muito elevadas desse fitorregulador ocasionaram uma maior percentagem de calos (Figura 7B) e afetaram o vigor vegetativo da planta, diminuindo o número e o comprimento médio das raízes quando utilizada a dose de 6 mg L<sup>-1</sup> de AIB, com 4,8 raízes/explante e 0,8 cm, respectivamente (Figura 7C e 7D). Portanto, o enraizamento de explantes de erva-mate deve ser realizado em meio de cultura com ¼ do MS acrescido de até 3 mg L<sup>-1</sup> de AIB, pois doses mais elevadas desse fitorregulador demonstram ter efeitos negativos nas plantas de erva-mate (Figura 8). Quanto ao número médio de folhas, foram observadas cerca de 5,0 folhas/explante e uma altura média de 1,2 cm/explante, em todos os tratamentos.

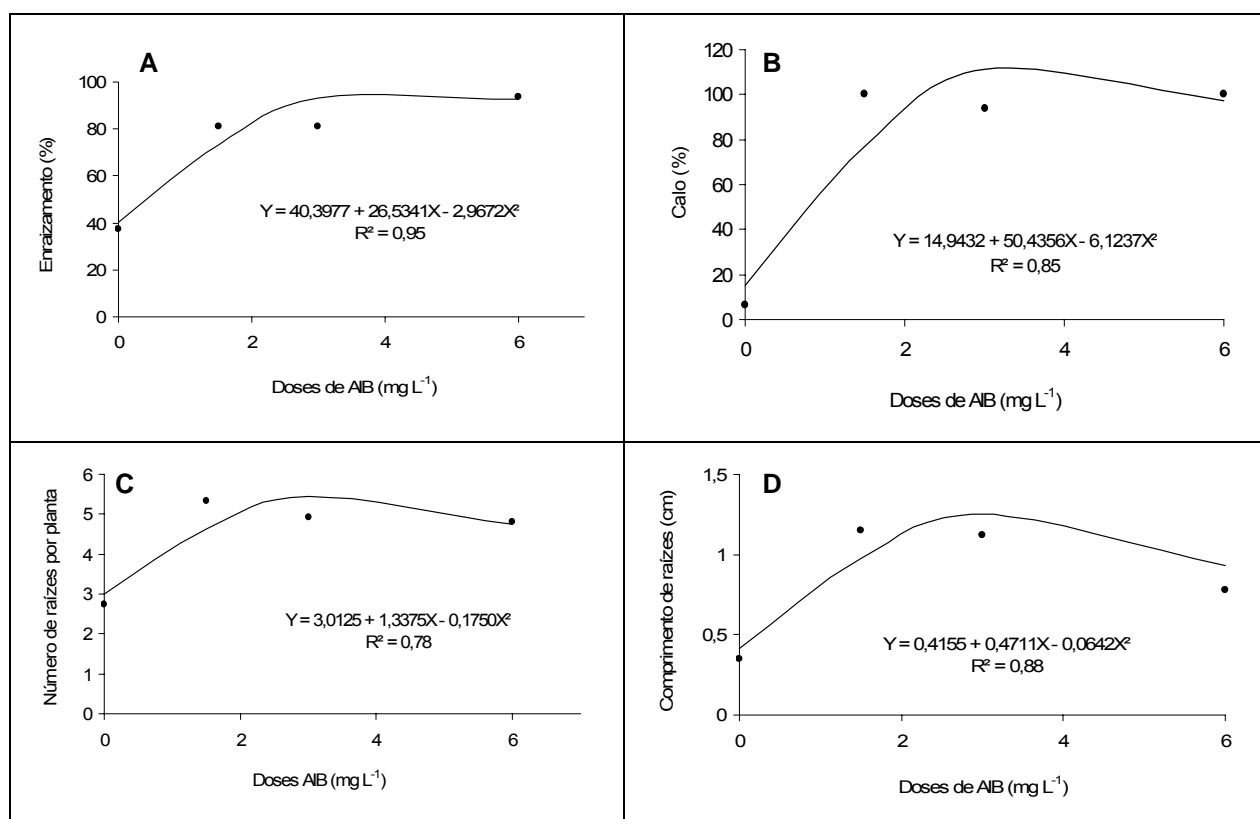


Figura 7 – Parâmetros observados em brotos de erva-mate colocados para enraizar em meio ¼ do MS com diferentes doses de AIB (0; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>), aos 30 dias de cultivo: percentagem de enraizamento (A), número de raízes (B); comprimento de raízes (C); percentagem de explantes com calo (D). Santa Maria, RS, 2007.

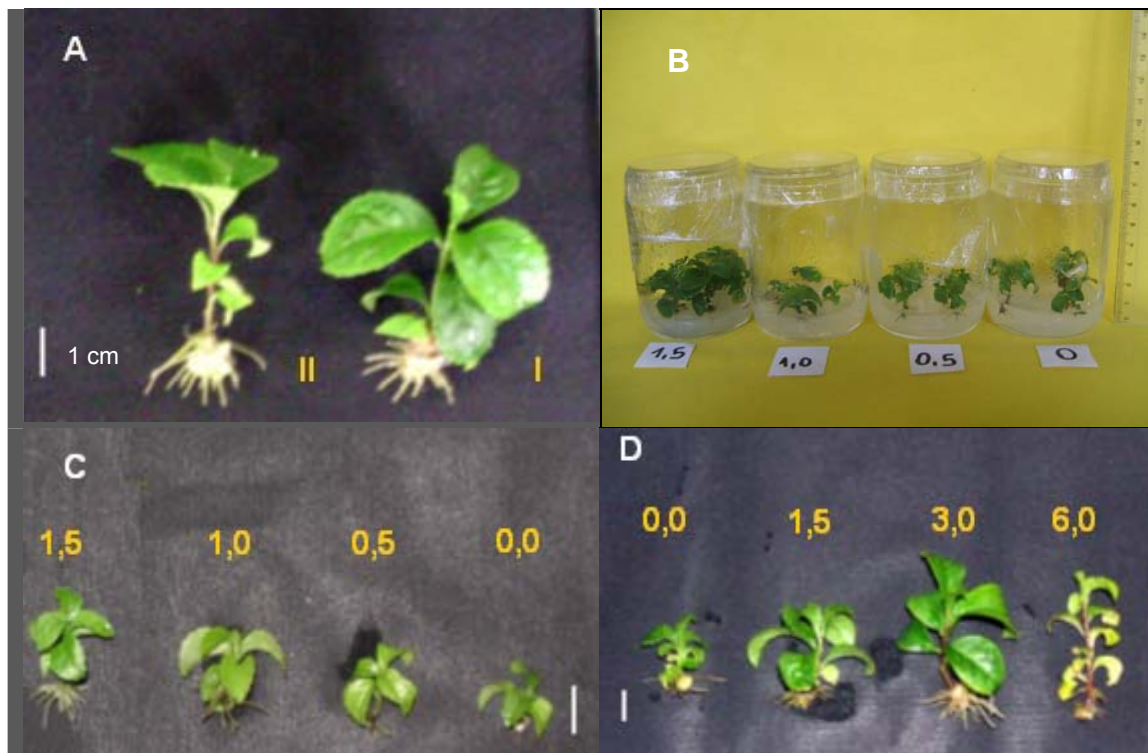


Figura 8 – Enraizamento *in vitro* de brotos de erva-mate: raízes formadas em brotos cultivados 15 dias em meio com  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (A I); raízes formadas em brotos cultivados por 30 dias em meio com  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (A II); aspecto do enraizamento de erva-mate em meio de cultura  $\frac{1}{4}$  do MS, acrescido de diferentes doses de AIB (0, 0,5, 1,0 e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (B), aos 30 dias de cultivo; enraizamento de brotos inoculados em meios com diferentes doses de AIB (0; 0,5, 1,0 e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), aos 45 dias de cultivo (C); enraizamento de brotos inoculados em meio de cultura com  $\frac{1}{4}$  do MS, acrescido de diferentes doses de AIB (0; 1,5; 3,0 e  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), aos 45 dias de cultivo (D). Santa Maria, RS, 2007. Barra = 1 cm.

Para algumas espécies, o enraizamento *in vitro* é favorecido com a diminuição da dose de sais do meio MS (ERIG et al., 2004). Assim, a maioria dos trabalhos com erva-mate, utilizam um meio com concentração mais reduzida de sais. Rey e Mroginski (1998) observaram a formação de raízes em 50% dos brotos inoculados em  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA durante 4 horas. Mroginski et al. (1999) verificaram a indução de raízes em brotos oriundos de segmentos nodais de matrizes adultas de erva-mate em meio com  $\frac{1}{4}$  de MS, quando utilizadas as doses de 0,1 e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, porém, em baixa frequência e com poucas raízes por explante. O enraizamento de brotos obtidos de segmentos nodais de erva-mate foi possível em meio contendo  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (Mroginski et al., 2000). Sansberro et al. (2000), em estudo de enraizamento de brotos de erva-mate utilizando as doses de 1 a  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, observaram a formação de raízes em 50% dos explantes

oriundos de mudas jovens e, em segmentos provenientes de matrizes adultas, em apenas 25%. Muitas vezes, quando se utilizam altas doses de AIB, ocorre um efeito negativo na formação e no desenvolvimento das raízes (MANTOVANI, 1997). Segundo esse autor, em enraizamento de caixeta (*Didymopanax morototoni*), houve a formação de raízes em 45% dos brotos quando utilizado AIB na dose de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, entretanto, com o aumento da dose para 1,5 mg L<sup>-1</sup>, verificou-se a diminuição da percentagem de brotos enraizados. Paula (1999) observou que a dose de 3 mg L<sup>-1</sup> de AIB em meio com ½ do WPM propiciou a formação de raízes em 86,2% dos brotos de erva-mate provenientes de segmentos nodais, verificando também que doses mais elevadas deste fitorregulador reduziram o enraizamento.

Sansberro et al. (1999) observaram que altas doses de auxina podem estimular a formação de calos em explantes de erva-mate, o que também foi observado neste trabalho. Assim, doses elevadas de AIB não são vantajosas para o enraizamento, pois há uma maior formação de calos, podendo provocar um menor comprimento e número de raízes. A formação de calo na base dos explantes geralmente é indesejável, em consequência dos calos prejudicarem a conexão vascular da planta (FACHINELLO et al., 1995). Plantas de *I. aquifolium* enraizadas *in vitro*, com altas percentagens de calo basal, apresentam um decréscimo na sobrevivência e pouca qualidade quando transplantadas para aclimatização (MAJADA et al., 2000).

O enraizamento *in vitro* pode ser vantajoso para aumentar a sobrevivência na aclimatização de algumas espécies. Contudo, para *I. aquifolium* foi possível eliminar a fase de enraizamento *in vitro*, transferindo as plantas alongadas diretamente para condições *ex vitro* (MAJADA et al., 2000). Além disso, plantas enraizadas *ex vitro* apresentam menor crescimento de calo na base, além do número e comprimento de raízes serem maiores quando comparado com plantas *in vitro*. Porém, mesmo raízes originadas *in vitro* e que persistem durante a aclimatização, continuaram a crescer em brotos de *I. aquifolium*, demonstrando que não são totalmente infuncionais e beneficiando o processo de aclimatização desta espécie (MAJADA et al., 2000).

### 5.3.5 Aclimatização

Aos 30 dias de cultivo, as plantas de erva-mate colocadas para aclimatizar apresentaram um bom crescimento em todos os substratos avaliados, com formação

de novos brotos e folhas (Figura 9). Os substratos que apresentaram os melhores resultados de sobrevivência foram a areia e a casca de coco em comparação com a vermiculita (Tabela 7).

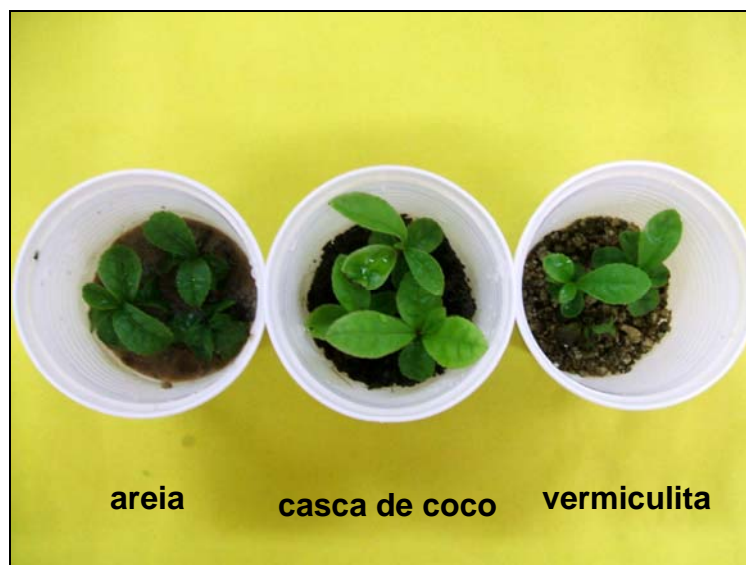


Figura 9 – Aclimatização de plantas de erva-mate em areia, casca de coco e vermiculita, aos 30 dias. Santa Maria, RS, 2007.

Tabela 7 – Sobrevivência de plantas de erva-mate na aclimatização, utilizando diferentes tipos de substratos, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.

<b>Substrato</b>	<b>Sobrevivência (%)</b>
Areia	90,0 a*
Casca de coco	90,0 a
Vermiculita	65,0 b
<b>Média</b>	<b>81,7</b>
<b>CV (%)</b>	<b>13,5</b>

\*Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As condições encontradas *in vitro* são consideravelmente diferentes das encontradas em casa de vegetação e no campo, onde a umidade relativa é menor, os níveis de luminosidade são maiores e o ambiente não é asséptico, o que promove um alto grau de estresse nas plantas micropropagadas (PREECE e

SUTTER, 1991; HAZARIKA, 2003). Devido ao estresse, muitas plantas micropropagadas não sobrevivem quando transferidas para condições *ex vitro* (PREECE e SUTTER, 1991).

Plantas de erva-mate, provenientes da regeneração de segmentos nodais de plantas jovens, foram aclimatizadas com taxas de sobrevivência de 60 a 70% (SANSBERRO et al., 1999; SANSBERRO et al., 2000). Contudo, Mroginski et al. (1999) observou dificuldade no enraizamento *in vitro* para o mesmo tipo de material proveniente de plantas adultas, com mortalidade das plantas quando transferidas para aclimatização. Em *I. aquifolium* foi obtido 80% de sobrevivência na aclimatização (MAJADA et al., 2000). Durante a aclimatização do cafeeiro (*Coffea arabica*), o enraizamento *in vitro* favoreceu o crescimento *ex vitro* (CARVALHO et al., 1999). Nesse experimento foram utilizadas plantas enraizadas *in vitro*, o que pode ter aumentado a taxa de sobrevivência.

Quanto ao substrato utilizado na aclimatização de plantas, esse deve ser livre de patógenos. Quando a desinfestação não é possível, é importante a utilização de substratos comerciais, os quais apresentam um melhor controle da contaminação. Em mudas de marmeleiro (*Cydonia oblonga*), quando utilizado solo na aclimatização, ocorreu a morte total das mudas pela podridão no colo (ERIG et al., 2004). Assim, a utilização de vermiculita, que é um substrato mineral praticamente inerte (ALFENAS et al., 2004), casca de coco e areia, permite um maior controle sobre a incidência de patógenos. A casca de coco aumenta a capacidade de retenção de água do substrato (ALFENAS et al., 2004), além de ser um material reutilizado (CARRIJO et al., 2002).

Nesse trabalho, a sobrevivência das plantas de erva-mate durante a aclimatização foi maior nos substratos casca de coco e areia. A vermiculita foi o substrato menor eficiência para a aclimatização das plantas de erva-mate, sendo o mesmo verificado por Hoffmann et al. (2001), estudando a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'marubakaido'. Diante disso, trabalhos futuros podem abordar outras combinações de substratos, além da necessidade da fase de enraizamento *in vitro* para a sobrevivência de plantas de erva-mate micropropagadas.

#### 5.4 Conclusões

- Segmentos nodais de brotações de ano de erva-mate apresentam a maior sobrevivência quando desinfestadas com álcool 70% por 4 min. e em NaOCl 2% por 25 min.
- O meio com  $\frac{1}{4}$  dos sais do MS pode ser utilizado como o meio de cultura base para o cultivo *in vitro* de plantas de erva-mate.
- A adição de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP ao meio de cultura aumenta o número de brotos adventícios.
- O enraizamento *in vitro* de erva-mate pode ser realizado em apenas uma fase, por 30 dias, desde seja realizada a adição de até  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB ao meio com  $\frac{1}{4}$  dos sais do MS.
- Plantas de erva-mate produzidas *in vitro* podem ser aclimatizadas nos substratos casca de coco ou areia, em ambiente com temperatura e luminosidade controlada.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O enraizamento de estacas de erva-mate é uma alternativa viável para a produção de mudas de qualidade comprovada. No enraizamento de estacas de plantas adultas de erva-mate é possível trabalhar com estacas de menores comprimentos, sem que ocorra a redução da capacidade de enraizamento, com otimização da formação de raízes quando as estacas são tratadas com AIB. Dessa forma, outros estudos devem ser conduzidos para verificar a capacidade de enraizamento dessa espécie com o rejuvenescimento, por meio de estaquias sucessivas e/ou enxertias, e a necessidade de usar fitorreguladores após estes processos.

Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate o NaOCl e o álcool 70% não eliminaram completamente a contaminação, especialmente por bactérias endógenas. Dessa forma, é conveniente testar outras substâncias e práticas para a desinfestação de material adulto de erva-mate, além da utilização de pré-tratamentos e de tecidos rejuvenescidos.

A micropropagação de plantas juvenis de erva-mate utilizando BAP foi eficiente, com a obtenção de tufo de brotos. Os explantes obtidos enraizaram em meio de cultura com a presença de AIB e foram transplantados com sucesso. Os bons resultados obtidos na micropropagação demonstram a possibilidade de utilização desta técnica para a produção de mudas de erva-mate em larga escala, em qualquer época do ano, sem a necessidade de tratamentos para quebra de dormência das sementes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

ASSIS, T. F. DE; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Org.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, cap. 5, 2007. p. 93-121.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. 1. ed., [S.l.]: Instituto Souza Cruz, 2002. 326 p.

BAJAJ, Y. P. S. Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. In: BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in agriculture and forestry 1: Trees I**. Springer-Verlag, vol. 1, cap. 1, 1986. p. 1-23.

BARRUETO CID, L. P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L. P. (Org.) **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.

BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMANN, M. J. A. Contaminação *in vitro* de plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 20 p., 2006.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v. 1, 2003. 1039 p.

CARVALHO, G. R. et al. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, v. 23, n. 3, p. 483-490, 1999.

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

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.



CASSELS, O. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. (Org.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 31-44.

DE KLERK, G. J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 38, p. 415–422, 2002.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. (Org.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 1-14.

EDEN, T. Tea. **Tropical Agriculture Serie**. London: Longmans, Green and Ltda., 1958. 201 p.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1/2, p. 61-68, 2004.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178 p.

FERRARI, M.; GROSSI, F.; WENDLING, I. Influência da utilização de antioxidantes na enxertia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire). Colombo - PR: Embrapa Florestas, **Comunicado Técnico**, n. 109, 3p, 2004.

FERREIRA, A. G. et al. *In vitro* germination of immature embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**, v. 52, n. 1, p. 27-32, 1991.

FERRIANI, A. P. **Estaquia de vassourão-branco** (*Piptocarpha angustifolia* Dusén) **com uso de ácido indol butírico**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FICK, T. A. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

GRAÇA, M. E. et al. Curitiba: Embrapa-CNPQ, **Circular Técnica**, n. 18, 6 p., 1988.

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

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

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2002. 847p.

HAZARICA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-171, 2003.

HIGA, R. C. V. Propagação vegetativa da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por estaquia. In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Documento 15**, Embrapa-CNPq, 1983. p.119-123.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L. P. (Org.) **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 15-53.

HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'marubakaido'. **Ciênc. agrotec.**, v. 25, n. 2, p. 462-467, 2001.

HÖRNER, L. DE A. et al. Efeito dos pré-tratamentos e uso de diferentes combinações de fungicida e antibiótico no meio de cultura em explantes de erva-mate. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 2., REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO, 2002.

HU, C. Y. *In vitro* culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v. 100, n. 3, p. 221-225, 1975.

HU, C. Y. Light-mediated inhibition of *in vitro* development of rudimentary embryos of *Ilex opaca*. **Amer. J. Bot.**, v. 63, n. 5, p. 651-656. 1976.

HU, C. Y.; ROGALSKI, F.; WARD, C. Factors maintaining *Ilex* rudimentary embryos in the quiescent state and the ultra structural changes during *in vitro* activation. **Botanical Gazette**, v. 140, n. 3, p. 272-279. 1979.

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

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.

HUANG, L. C. et al. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*: model for phase reversal trees. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 166-173, 1992.

IBGE. Produção da extração vegetal e silvicultura. In: **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. v. 21, 45p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2006/default.shtm/>. Acesso em: 20 dez. 2007.

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.

KRICUN, S. D. P. 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, S. D. P.; BELINGHERI, L. D. Propagación vegetativa de plantas juveniles del genero *Ilex*, provenientes de la cuenta del plata. Misiones: INTA. **Informe técnico**, n. 81, 2002, 7p.

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, Colômbia: CIAT, 1991, p. 295-312.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-427. 1981.

MAJADA, J. P. et al. Micropropagation of *Ilex aquifolium* L. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 36, p. 521-526, 2000.

MAYOL, R.M. Experiencias de 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.

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. 1 CD-ROM.

MANTOVANI, N. C. **Estudo da regeneração *in vitro* de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. Et Planch. 1997. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.**

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497. 1962.

MROGINSKI, L. A. et al. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. **Phyton**, v. 59, n. 1/2, p. 161-170, 1996.

MROGINSKI, L. A. et al. Effect of medium composition and light supply on *in vitro* shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Journal of plant nutrition**, v. 22, n.2, p. 359-368,1999.

MROGINSKI, L. et al. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) estado actual y perspectivas. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2, 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, p.141-151, 2000. CD-ROM 1.

MUTINELLI, A. Caracteres biométricos de las semillas de la yerba-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *Genuina* Loes.). Córdoba: UNC-FCA, **Cultivos Industriales: anatomia e fisiología**, n. 46, 1981. 28 p.

NÉMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in agriculture and forestry 1: Trees I**. Springer-Verlag, vol. 1, cap. 4, p. 49-64, 1986.

NICOLOSO, F. T.; LAZARI, M.; FORTUNATO, R. P. Propagação vegetativa de *Platanus acerifolia* Ait.: (I) efeito de tipos fisiológicos das estacas e épocas de coleta no enraizamento de estacas. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 479-485, 1999.

NICOLOSO, F. T.; CASSOL, L. F.; FORTUNATO, R. P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, v.31, n.1, p. 57-60, 2001.

NIKLAS, C. O. Perspectivas de micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Citrusmisiones**, n. 12, p. 11-14, 1986.

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

PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. DE. **Fisiologia e produção vegetal**. Lavras: UFLA, 2006. 104p.

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

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

PICHETH, 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.). **Revista Floresta**, v. 27, n. 1/2, p. 137-138, 1997.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-92.

REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Regeneración de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo *in vitro* de ápices caulinares y de segmentos nodales. **Phyton**, v. 48, n. 1/2, p. 139-145, 1988.

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

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

SANSBERRO, P. A. et al. *In vitro* culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **J. Plant Growth Regul.**, v. 17, p. 101-105, 1998.

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

SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; BOTTINI, R. A. Giberelinas y brotación de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Universidad Nacional del Nordeste: **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, 2000. 3 p.

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

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

SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Org.) **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, Imprensa Nacional, 1990, p. 227-249.

TAVARES, F. R.; PICHETH, J. A.; MASCHIO, L. M. de 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.

TARRAGÓ, J. et al. Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings. **Scientia Horticulturae**, v.103, p. 479–488, 2005.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005, 182 p.

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.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 665-673, 2002

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

XAVIER, A.; SANTOS, G. A. DOS. Clonagem em espécies florestais nativas. In: ROCHA, M. DA G. DE B. (Org.). **Melhoramento de espécies arbóreas nativas**. Belo Horizonte: Série Técnica, 2002. p. 125-159.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Org.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, cap. 3, 2007, p. 55-74.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. J. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, cap. 8, 2004, p. 135-148.

ZANIOLO, S. R.; ZANETTE, F. Obtenção de brotações múltiplas de erva-mate através da micropropagação. **Agrárias**, Curitiba, v. 18, n. 1/2, p.17-22, 1999.

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