

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

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ERVA-MATE
(*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Kenia Michele de Quadros

**Santa Maria, RS, Brasil,
2009**

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ERVA-MATE
(*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)

por

Kenia Michele de Quadros

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

Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ERVA-MATE
(*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**

elaborada por
Kenia Michele de Quadros

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

Comissão Examinadora

Dilson Antônio Bisognin, Ph.D.
(Presidente/Orientador)

Leonardo Ferreira Dutra, Dr. (Embrapa – CPACT)

Frederico Dimas Fleig, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 05 de março de 2009

A minha mãe Jenny de Quadros, meu grande exemplo

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha mãe, a minha amiga número um, por todo o apoio, incentivo, orgulho e confiança depositada em mim.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de excelente aprendizado.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro, garantindo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador, prof. Dilson Antônio Bisognin, pelo respeito com meu trabalho e pelas oportunidades.

Ao prof. Frederico Dimas Fleig, pela contribuição, críticas e sugestões.

À prof. Maristela pelo incentivo e grandes colaborações.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Engenharia Florestal pela atenção ao meu trabalho.

A todos os funcionários do programa, especialmente à Tita, pela amizade, carinho e agradável convivência.

Aos meus colegas do laboratório, em especial aos amigos Michele Heberle, Ronilda, Maurício, Carlos, Francisco e Glademir.

Aos meus amigos Michéli, Elisabete, Gerson e Charlote pelo convívio, amizade, conselhos e incentivo.

Agradeço a todos que fazem parte da minha vida e que, direta ou indiretamente, contribuíram para o resultado desse trabalho.

RESUMO

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

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)

AUTORA: Kenia Michele de Quadros
ORIENTADOR: Dilson Antônio Bisognin
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 05 de Março de 2009

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) assume uma importância ambiental e socioeconômica para a região sul do Brasil, porém carece de tecnologias de propagação vegetativa necessárias para o aumento da produção e da qualidade. O presente estudo teve por objetivos analisar a propagação via estaquia de material adulto e estabelecer a aclimatização *ex vitro* e o enraizamento de microestacas originadas de cultivo de embriões de erva-mate. Para a estaquia, analisaram-se o efeito do nível de sombreamento da planta matriz, a origem e o tamanho da estaca, avaliando o potencial de propagação vegetativa. As estacas foram coletadas de plantas matrizes de dois níveis de sombreamento (crescimento a pleno sol e sombreado), de duas origens (seminal e propagada vegetativamente) e de dois tipos (estaca convencional e de gema única). Os parâmetros utilizados para avaliar as estacas foram a porcentagem de estacas vivas e mortas, de estacas inalteradas, emissão e comprimento de brotos, formação de calos, enraizamento, permanência das folhas primárias, número e comprimento de raízes e número e comprimento de folhas dos brotos. Na aclimatização e enraizamento *ex vitro* de erva-mate foram testadas cinco concentrações de ácido indol butírico (AIB) (0, 250, 500, 1.000 e 2.000 ppm), e cinco tipos de substratos (vermiculita, areia, casca de arroz carbonizada, substrato comercial a base de casca de pinus e casca de coco), visando o enraizamento de microestacas. As microestacas foram avaliadas quanto a porcentagem de estacas inalteradas, de formação de calos, de enraizamento e de mortalidade, número de raízes, comprimento de raízes, tamanho total da microestaca, biomassa radicular e número de folhas dos brotos. Estaca coletada de planta matriz em pleno sol apresentou maiores porcentagens de estacas inalteradas. A presença de calo, das folhas primárias e a emissão de brotos afetaram o enraizamento. Estacas coletadas de matrizes propagadas vegetativamente apresentam maior taxa de enraizamento e comprimento de raízes. Na microestaquia, a concentração de 1.000 ppm de AIB foi eficiente para o enraizamento e crescimento de microestacas na aclimatização. Microestacas de erva-mate podem ser aclimatizadas e enraizadas *ex vitro* em substrato de casca de arroz carbonizada e em substrato comercial a base de casca de pinus.

Palavras-chave: estaquia, microestaquia, aclimatização, enraizamento *ex vitro*, espécie nativa.

ABSTRACT

Master's Thesis
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

VEGETATIVE PROPAGATION OF ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)

AUTHOR: Kenia Michele de Quadros
ADVISER: Dilson Antônio Bisognin
Place and Date of Defense: Santa Maria, March 5th, 2009

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) has an economical and environmental importance to the southern area of Brazil. However, there is no enough technologies of vegetative propagation, which are important to improve yield and quality. This study had as objectives to evaluate the propagation of erva-mate trees trough cuttings and to establish an *ex vitro* acclimatization and micro-cutting rooting protocols from embryo cultures. Vegetative propagation potential was evaluated considering shading intensity of the stock plant and origin and size of the cuttings. Cuttings were grabbed from stock plants growing under light or shade conditions and prepared in two types (one-bud and regular types). The evaluations were the percentage of lived and died cuttings, cuttings unchanged, shoot and callus growth, shoot length, rooting, leaf survival, number and length of roots and number and length of leaves in new shoots. For acclimatization and *ex vitro* rooting were evaluated five concentrations of indol butyric acid (IBA) (0; 250; 500; 1,000 and 2,000 ppm) and five substrates (vermiculite, sand, carbonized rice hull, commercial substrate of pinus bark, and coconut bark). The evaluations were the percentage of cuttings unchanged, callus formation, rooting and mortality, number and length of roots, micro-cutting length, fresh weight of roots, and number of leaves in new shoots. The highest cutting unchanged was gotten with cuttings from plants growing in light. Callus formation, presence of leaves and new shoot growth affected rooting. Cuttings collected from vegetative propagated plants showed higher percentage of rooting and root length. The highest rooting percentage and micro-cutting growth were found with 1,000 ppm of IBA during acclimatization period. Acclimatization and *ex vitro* rooting of erva-mate micro-cuttings can be done in the substrate of carbonized rice hull and commercial substrate of pinus bark.

Key words: cuttings, micro-cuttings, acclimatization, *ex vitro* rooting, native species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Aspecto das árvores matrizes selecionadas: árvores matrizes em ambiente com algum nível de sombreamento (A e B), árvore podada a 1,80 m em ambiente pleno sol (C), ramos levados para o laboratório após a coleta (D). Santa Maria,RS,2008.....	29
FIGURA 2 - Aspecto das estacas: Estacas plantadas em vermiculita e em bandeja preta drenada (A), detalhe das estacas (B) no dia da instalação, estaca enraizada e brotada (C), estaca enraizada (D) após 120 dias. Santa Maria, RS, 2008.....	35
FIGURA 3 - Parâmetros observados no enraizamento de microestacas de erva-mate com diferentes doses de AIB (0, 250, 1.000, 1.500 e 2.000 mg L ⁻¹) em avaliação aos 30 dias. Porcentagem de calo (A), de sobrevivência (A), de enraizamento (B), número de raízes (C) e tamanho médio de raízes (D). Santa Maria, RS, 2008.....	47
FIGURA 4 - Parâmetros observados no enraizamento de microestacas de erva-mate com diferentes concentrações de AIB (0, 250, 1.000, 1.500 e 2.000 ppm) em avaliação aos 120 dias. Comprimento da maior raiz (A), tamanho total da microestaca (B), porcentagem de mortalidade (C) e número de folhas dos brotos (D). Santa Maria, RS, 2008.....	49
FIGURA 5 - Aspecto das microestacas aos 120 dias: microestacas plantadas em copos plásticos drenados (A), microestacas mortas (B) e vivas (C), microestacas enraizadas (D, E, F, H, I) e formação de calo em microestaca (G). Santa Maria, RS, 2008.....	51

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 – Comprimento de brotos e de folhas de estacas de plantas adultas de erva-mate de origem seminal de dois sexos e em dois ambientes aos 120 dias após o plantio. Santa Maria, RS, 2008.....	32
TABELA 2 – Porcentagem de mortalidade, calo, enraizamento, sobrevivência, permanência das folhas primárias e brotos, número de raízes, comprimento de raízes, número de brotos e número de folhas em estacas de matrizes de erva-mate a campo. Santa Maria, RS, 2008.....	33
TABELA 3 – Porcentagem de formação de calos e de raízes com ou sem permanência (perman.folhas) das folhas primárias, brotos, raiz e calo em estacas de plantas adultas de erva-mate a partir de plantas matrizes de origem seminal de dois sexos e em dois ambientes. Santa Maria, RS, 2008.....	34
TABELA 4 – Parâmetros observados no enraizamento de microestacas de erva-mate com diferentes doses de AIB (0, 250, 1.000, 1.500 e 2.000 mg L ⁻¹) em avaliação aos 120 dias. Comprimento da maior raiz (A), tamanho total da microestaca (B), porcentagem de mortalidade (C) e número de folhas dos brotos (D). Santa Maria, RS, 2008.....	38
TABELA 5 – Porcentagem de emissão de calos e de raízes com ou sem permanência (perman.folhas) das folhas primárias, brotos, raiz e calo em estacas de plantas adultas de erva-mate a partir de plantas matrizes de duas origens diferentes. Santa Maria, RS, 2008.....	40
TABELA 6 – Porcentagens médias de calo, de mortalidade, de brotação, de sobrevivência e de permanência de folhas primárias de estacas de dois tipos diferentes de material adulto de erva-mate, avaliado aos 35 dias após instalação da estaquia. Santa Maria, RS, 2009.....	41
TABELA 7 – Porcentagem de enraizamento e comprimento médio de raiz de microestacas de erva-mate utilizando diferentes substratos, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.....	53
TABELA 8 – Porcentagem de enraizamento, calo, mortalidade e comprimento da maior raiz de microestacas de erva-mate utilizando diferentes substratos, aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.....	54

QUADRO 1 – Seleção de 10 plantas matrizes em povoamento de erva-mate de origem seminal de dois sexos e em dois níveis de sombreamento e em duas alturas de poda. Santa Maria, RS, 2008.....	27
QUADRO 2 – Descrição de plantas matrizes femininas quanto ao número de folhas, quantidade de frutos verdes e maduros e total de frutos (verdes mais maduros) de plantas adultas de erva-mate de origem seminal no dia do plantio. Santa Maria, RS, 2008.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Descrição da espécie	15
3.2 Propagação por semente	16
3.3 Propagação vegetativa	16
3.3.1 Estaquia.....	17
3.3.2 Enxertia.....	20
3.3.3 Micropropagação.....	21
3.3.4 Microestaquia.....	22
4 CAPÍTULO I	24
4.1 Introdução	24
4.2 Material e métodos	26
4.2.1 Sexo da planta matriz e nível de sombreamento.....	27
4.2.2 Origem da planta matriz.....	29
4.2.3 Tipo de estaca.....	30
4.3 Resultados e discussão	30
4.3.1 Sexo da planta matriz e nível de sombreamento.....	31
4.3.2 Origem da planta matriz.....	37
4.3.3 Tipo de estaca.....	41
4.4 Conclusões	42
5 CAPÍTULO II	43
5.1 Introdução	43
5.2 Material e métodos	45
5.2.1 AIB no enraizamento de microestacas de erva-mate.....	45
5.2.2 Substrato no enraizamento de microestacas de erva-mate.....	46
5.3 Resultados e discussão	46
5.3.1 AIB no enraizamento de microestacas de erva-mate.....	47
5.3.2 Substrato no enraizamento de microestacas de erva-mate.....	52
5.4 Conclusões	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) é uma espécie arbórea nativa do sul do Brasil e se caracteriza por ser uma importante fonte de renda em vários países da América do Sul, como no Paraguai, Argentina e Brasil (SANSBERRO et al., 2000). Tradicionalmente, compõe um dos sistemas agroflorestais, assumindo importância ambiental e socioeconômica, além de ter sido, por um longo período, um dos primeiros produtos das exportações brasileiras (PASINATO, 2004). Em 2006, a produção de erva-mate nativa destacou-se em função da magnitude (233.360 toneladas) e do valor de produção (R\$ 86,9 milhões), sendo que a região sul concentrou 99,8% desta produção (IBGE, 2006).

Nas últimas décadas, têm-se observado um crescimento e uma diversificação na linha de produtos derivados de erva-mate; contudo, os avanços no desenvolvimento tecnológico e no controle de qualidade não têm sido suficientes para atender às atuais exigências do consumidor (DONADUZZI et al., 2003). A exploração da erva-mate baseia-se no extrativismo, sendo que a maior parte do mate produzido provém de ervais nativos ou de plantas cultivadas originadas de sementes, acarretando uma alta heterogeneidade dos plantios que dificulta o estabelecimento de padrões de manejo da cultura e de processamento do produto (WENDLING, 2004).

Este cenário tem gerado maior procura, por parte dos produtores, de tecnologias para o aumento da produtividade dos ervais nativos e, especialmente, para o estabelecimento de novos ervais, pelo aumento da área cultivada e/ou pelo adensamento de ervais nativos (TAVARES et al., 1992). O plantio de novos ervais tem sido feito com mudas originadas de sementes, sendo que essa propagação apresenta uma série de entraves, como a baixa qualidade genética e fisiológica das sementes; dormência por imaturidade embrionária, sendo o período excessivamente longo destinado à estratificação e produção das mudas; baixo poder germinativo, desuniforme e em baixo percentual, o que resulta em uma alta heterogeneidade dos plantios. Todos esses fatores contribuem para elevar o custo de produção e limitar o melhoramento genético da espécie (WENDLING, 2004).

A propagação vegetativa apresenta-se como uma excelente alternativa na busca de avanços para a produção de mudas (GRAÇA et al., 1990), destacando-se como uma importante ferramenta para a multiplicação de plantas selecionadas e para o resgate de material adulto. Dentre os métodos de propagação vegetativa mais pesquisados, destacam-se a estaquia, a enxertia e a cultura de tecidos. Entretanto, a propagação vegetativa de espécies florestais, muitas vezes, apresenta alguns problemas, como a dificuldade de enraizamento de materiais adultos e o baixo vigor das mudas produzidas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Diante da baixa qualidade genética e da alta heterogeneidade dos plantios estabelecidos por mudas produzidas a partir de sementes e das dificuldades de propagar assexuadamente plantas adultas, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias para a propagação clonal e massal de plantas selecionadas de erva-mate.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral foi desenvolver tecnologias para a propagação vegetativa de erva-mate, utilizando diferentes métodos de clonagem.

2.2 Específicos

- i) Propagar via estaquia, plantas matrizes adultas de erva-mate de diferentes níveis de sombreamento (sombreado e a pleno sol) diferentes origens (seminal e propagada vegetativamente) e diferentes tipos (estaca convencional e de gema única).

- ii) Estabelecer a aclimatização e o enraizamento *ex vitro* de microestacas de erva-mate originadas de cultivos de embriões, avaliando concentrações de AIB e tipos de substratos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Descrição da espécie

A erva-mate é característica da Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária), sempre em associações evoluídas com o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.)Kuntze) e também na Floresta Estacional Semidecidual no noroeste do Paraná e no sul do Mato Grosso do Sul (CARVALHO, 2003). A região de distribuição natural da erva-mate está situada entre os paralelos 18° e 26° de latitude, e a área de difusão natural se encontra entre os paralelos 12° e 32° de latitude sul (ARANDA, 1986).

A espécie ocorre naturalmente em solos de baixa fertilidade e devem ser evitados plantios dessa espécie em solos úmidos e não permeáveis. É recomendada para a arborização e para a jardinagem devido ao seu porte, para a recuperação de ecossistemas degradados e para a restauração de mata ciliar em locais de inundação (CARVALHO, 2003).

Os principais produtos da erva-mate consumidos são produtos com pouco processamento e produtos que utilizam extratos, como mate solúvel e refrigerante (CARVALHO, 2003). Assim, a espécie oferece grande potencial para muitas aplicações industriais, como corante, conservante de alimentos, produtos de higiene e cosméticos (MACCARI JUNIOR; MAZUCHOWSKI, 2000). Portanto, é uma espécie que apresenta grande importância econômica, social e ecológica em toda a região sul do Brasil (DONADUZZI et al., 2003).

A erva-mate é uma planta dióica, pertencente à família Aquifoliaceae, variando de arvoreta a árvore perenifólia, podendo atingir até 30 m de altura na idade adulta. A floração ocorre de setembro a dezembro, dependendo da região, e os frutos amadurecem de dezembro a março. As flores são diclinas, sendo que um dos sexos é abortado, o que faz com que haja indivíduos com flores pistiladas e outros com flores estaminadas. Portanto, a erva-mate é uma espécie de fecundação cruzada. A reprodução sexual inicia normalmente aos cinco anos de idade, em árvores provenientes de sementes, e aos dois anos de idade em plantios de mudas oriundas propagadas vegetativamente (CARVALHO, 2003).

As sementes apresentam dormência pela dureza do tegumento. Além disso, o embrião é rudimentar e permanece em estágio de coração, mesmo quando os frutos estão maduros (HU, 1975). A germinação só é possível após a estratificação, que consiste em armazenar as sementes em camadas de areia úmida por um período de aproximadamente 120 dias (BACKES; IRGANG, 2002). Para melhor aproveitamento das sementes, estas devem ser estratificadas ou semeadas diretamente, no menor prazo possível após a coleta, sem a necessidade de outros tratamentos (MEDRADO, 2000).

3.2 Propagação por semente

A baixa germinação das sementes de erva-mate, que pode variar de 5% a 20% (STURION, 1988), aliada à baixa qualidade genética e fisiológica (STURION, 1988; FOWLER; STURION, 2000; CARVALHO, 2003) e à dormência, dificultam a produção de mudas por sementes. Além disso, mudas de sementes resultam em plantios heterogêneos, tendo como consequência baixa qualidade da produção (FOWLER; STURION, 2000). A variabilidade genética da erva-mate é muito importante, pois facilita a adaptação da espécie a diferentes condições ambientais, mas dificulta o manejo do cultivo (SAND, 1989). Esses problemas podem ser minimizados pela obtenção de mudas por propagação vegetativa de indivíduos geneticamente superiores (WENDLING, 2004).

3.3 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa apresenta como principal vantagem a possibilidade de ganhos genéticos maiores do que na reprodução via semente (GRAÇA et al., 1990). Os plantios de mudas produzidas via propagação vegetativa apresentam grande uniformidade, quando as condições de solo e clima são semelhantes às da origem do material genético selecionado, possibilitando maiores produtividades e uniformidade de crescimento, além de uma série de características desejáveis, como

resistência a pragas e doenças, melhor aproveitamento de recursos hídricos e nutricionais do solo, entre outros (ELDRIGE et al., 1994).

Um programa de melhoramento que utilize a propagação vegetativa permite a produção de mudas durante o ano todo, a partir de plantas matrizes mantidas em viveiro, e a utilização das variâncias aditiva e não aditiva para maximizar o ganho de seleção (ASSIS, 1986; ELDRIGE et al., 1994). Essa técnica tem sido foco de inúmeras pesquisas realizadas em várias áreas do conhecimento. Entretanto, até o presente momento, não existem protocolos desenvolvidos que possam ser aplicados comercialmente para a propagação assexuada da erva-mate (WENDLING et al., 2005).

A propagação vegetativa ou clonagem consiste em multiplicar assexuadamente partes das plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), de modo a gerar indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz (FERRARI et al., 2004b). Baseia-se na capacidade que certas estruturas vegetativas possuem de formar um novo indivíduo completo (WENDLING et al., 2005). Um clone se define como um material geneticamente uniforme derivado de apenas um indivíduo e propagado exclusivamente por meios vegetativos (HARTMANN et al., 2002). Todas as características da planta-matriz são transferidas para a nova planta, no entanto, fatores ambientais, tipo de solo e ataque de enfermidades podem modificar a morfologia da planta, flores e frutos produzidos.

Existem vários métodos para a clonagem de plantas, dentre os quais se destacam a estaquia, a miniestaquia, a microestaquia, a mergulhia, a enxertia e a micropropagação. A escolha do método varia de acordo com o objetivo, a espécie envolvida, a época do ano, a habilidade do executor, o tipo e a quantidade de material disponível, as condições ambientais, a disponibilidade de recursos físicos, financeiros e humanos, dentre outros (WENDLING et al., 2005).

3.3.1 Estaquia

A grande vantagem da estaquia é o ganho genético obtido em um curto período, com a implantação de povoamentos a partir de indivíduos selecionados.

Para a erva-mate, essa técnica poderá melhorar a qualidade dos povoamentos e, principalmente, reduzir o tempo para a produção de mudas (HIGA, 1983).

A estaquia apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos, como a rapidez, a simplicidade (não necessita técnicas especiais), o baixo custo, não ocasiona incompatibilidade, proporciona maior uniformidade e possibilita maior número de plantas por matriz (HIGA, 1983). Como a técnica de estaquia proporciona homogeneidade dos genótipos, o manejo é facilitado por meio do entendimento da competição, além de permitir a definição de parâmetros genéticos e estudos nutricionais e fenológicos da espécie (FERRARI et al., 2004b).

Os protocolos de estaquia desenvolvidos para a propagação de erva-mate têm apresentado uma série de limitações para o uso em escala comercial. Dentre os principais problemas, destacam-se os métodos de rejuvenescimento de material adulto (WENDLING, 2004) e a obtenção de brotos viáveis e com boa capacidade de enraizamento e crescimento da nova planta no campo (FERRARI et al., 2004b).

O rejuvenescimento pode ser considerado uma forma de reverter as plantas do estágio maduro para o juvenil (HACKETT; MURRAY, 1993) e essa característica reflete na capacidade de enraizamento da estaca, a qual aumenta do ápice para a base da planta matriz (ALFENAS et al., 2004). Devido à sua posição na árvore, os brotos epicórmicos são mais propensos ao enraizamento que os brotos basais de cepas, que se encontram fisiologicamente maduros e conservam menor juvenilidade (ALFENAS et al., 2004). Quanto mais adulta for a planta matriz, menor é a capacidade de enraizamento e menor é o crescimento da muda no campo (FERRARI et al., 2004b).

O conhecimento dos fatores que afetam a regeneração e, conseqüentemente, a formação de raízes são importantes para a explicação da dificuldade ou facilidade de enraizamento de estacas de uma espécie. O adequado manejo desses fatores pode proporcionar maiores chances de sucesso na produção de mudas por estaquia (PICHETH, 1997).

A seleção de material para estacas, levando-se em conta a nutrição e a idade da planta matriz, o tipo de material e a época do ano de produção das estacas, a manutenção de gemas e folhas e as condições ambientais durante o enraizamento, como umidade, temperatura, luz, meio para o enraizamento e o uso de fitoreguladores, implica a regeneração dessas estacas e a formação de raízes (HARTMANN et al., 2002).

A disponibilidade hídrica exerce grande influência no enraizamento devido à alta sensibilidade das estacas à desidratação, até que ocorra a iniciação de raízes para a absorção de água e nutrientes (CASO; DOTTA, 1997; SCHMIDT, 1993). O substrato também pode influir no enraizamento e na qualidade do sistema radicular em estacas de espécies de plantas que apresentam dificuldades de propagação (PAIVA; GOMES, 1995).

A formação de raízes em estacas é um processo anatômico e fisiológico complexo, associado à desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais totipotentes para a formação de meristemas, que darão origem a raízes adventícias (ALFENAS et al., 2004). As raízes formadas numa estaca são denominadas de adventícias, pois não se originam de embriões (FACHINELO et al., 1994). Sendo assim, a origem da maioria das raízes em estacas caulinares está num grupo de células que podem se tornar meristemáticas e se encontram localizadas entre os feixes vasculares. Esses pequenos grupos de células, os iniciadores radiculares, continuam dividindo-se, formando grupos de muitas células pequenas, as quais se convertem em novos primórdios radiculares, dando origem às raízes adventícias. Em caules jovens, os iniciadores de raízes se originam no lado exterior do sistema radicular, mas em caules mais velhos sua origem é mais profunda, perto do cambium vascular.

Mesmo em condições propícias para o enraizamento, é comum a formação de calo na base da estaca, que é uma massa irregular de células de parênquima em vários estados de lignificação. O calo se origina a partir de células da região do câmbio vascular e, com frequência, as primeiras raízes aparecem através deste calo, levando a crer que a formação deste é essencial para o enraizamento. No entanto, a formação do calo e a formação da raiz são processos independentes entre si, embora ocorram simultaneamente, pois o crescimento de ambos depende de condições internas e ambientais similares. A produção de calo pode ser benéfica em plantas que enraízam lentamente, pois proporciona uma capa protetora que retarda o aparecimento de podridão, embora o crescimento de calo às vezes possa interferir na absorção de água pela estaca (HARTMANN et al., 2002).

A iniciação de raízes em estacas é afetada por vários tipos de fitohormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, e inibidores, como o ácido abscísico e compostos fenólicos. As auxinas possuem maior efeito na rizogênese de estacas, pois são essenciais para a iniciação de raízes adventícias e desempenham um

importante papel no estímulo à divisão celular. Uma alta relação auxina/citocinina geralmente favorece a formação de raízes, enquanto o contrário facilita a formação de ramos (HARTMANN et al., 1997). Para o enraizamento de estacas de erva-mate, o tratamento basal com AIB tem sido necessário. Utilizando concentrações de 5.000 e 8.000 mg L⁻¹ de AIB, foram obtidos 62% e 47% de enraizamento em estacas de brotações do ano de árvores adultas e de mudas, respectivamente, enquanto que estacas sem o tratamento de AIB não enraizaram (GRAÇA et al., 1988).

A relação de carboidratos e nitrogênio na planta matriz tem grande influência na diferenciação de raízes adventícias. Em geral, alto teor de carboidratos favorece o enraizamento (HIGA, 1983). A importância dos carboidratos deve-se ao fato de a auxina requerer uma fonte de carbono para a biossíntese dos ácidos nucléicos e proteínas, precisando de energia e carbono para a formação de raízes (FACHINELO et al., 1994). Além disso, a presença de folhas nas estacas é um estímulo ao enraizamento, pela produção de assimilados (HIGA, 1983).

3.3.2 Enxertia

O enxerto é sempre representado por uma parte da planta que se pretende multiplicar, ao passo que o porta-enxerto é que recebe o enxerto e, geralmente, é uma planta jovem, com boa taxa de crescimento, proveniente de sementes ou de estacas, bastante rústica e resistente a pragas e doenças. Esse conjunto, através da regeneração de tecidos, passa a formar uma única e nova planta (WENDLING et al., 2005). Esta técnica é utilizada principalmente em espécies de difícil enraizamento (KALIL FILHO et al., 2001).

A enxertia não induz ao rejuvenescimento e, dessa maneira, mantém as mudas produzidas com a mesma idade fisiológica da planta matriz, inclusive com o estímulo para o florescimento (ALFENAS et al., 2004). O rejuvenescimento somente é obtido através de enxertia seriada, cujo grau depende do número de vezes que essa operação é repetida e da espécie envolvida (HUANG et al., 1990). As desvantagens são o alto risco de rejeição, a dificuldade de pegamento de algumas espécies, a possibilidade de transmissão de doenças e a diminuição do tempo de vida das plantas (WENDLING et al., 2005).

3.3.3 Micropropagação

A micropropagação é uma técnica que oferece excelentes possibilidades para a propagação comercial de plantas, como também pode auxiliar em programas de melhoramento. A técnica de clonagem comercial possibilita a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (PAIVA; GOMES, 1995).

A introdução dos propágulos *in vitro* é sempre uma etapa complexa da micropropagação, devido aos altos níveis de contaminação por patógenos endógenos, difíceis de serem eliminados. Tanto bactericidas quanto fungicidas podem ser utilizados na preparação dos propágulos para a introdução *in vitro*. Também é necessário fornecer níveis adequados de nutrientes para melhorar a reatividade dos explantes e otimizar o crescimento (ALFENAS et al., 2004).

A micropropagação pode ser dividida em cinco etapas (WENDLING et al., 2005): Etapa 0 - condicionamento das plantas matrizes - relaciona aspectos ligados à condição fisiológica, ao ambiente onde se encontra e a condições de sanidade. De maneira geral, as matrizes vigorosas, sadias, isentas de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento são aquelas que fornecem os melhores explantes, sendo a nutrição das plantas matrizes um fator chave para o sucesso no estabelecimento das culturas *in vitro*. Etapa I - estabelecimento *in vitro* dos explantes - neste estágio, visa-se à obtenção de explante no tubo de ensaio totalmente livre de contaminação, condição imprescindível ao estabelecimento do mesmo, visto que o desenvolvimento de microorganismos no meio de cultura pode resultar na morte do explante. Nessa fase, todas as operações devem ser realizadas em condições de assepsia e em câmaras de fluxo laminar. Etapa II - multiplicação - multiplicação rápida dos explantes obtidos sem contaminação na fase anterior. Nela, objetiva-se a produção do maior número possível de plantas, no menor espaço de tempo, com a máxima uniformidade das partes aéreas produzidas. Etapa III - alongamento das brotações - é uma fase necessária para a maioria das culturas, visando a prepará-las para o enraizamento. Isto é importante, pois a multiplicação dos explantes induz à formação de muitas brotações pequenas, sendo necessário criar condições para a formação de brotações mais alongadas, para facilitar o uso e o manejo *in vitro*. Etapa IV - enraizamento das brotações - quando o enraizamento não ocorrer nas condições de

multiplicação *in vitro*, os explantes são colocados em meio de cultura apropriada para enraizamento, contendo maior relação auxina/citocinina. Já no enraizamento *ex vitro*, os explantes formados *in vitro* são enraizados em substrato diretamente em condições de alta umidade (casa de vegetação), para que formem as raízes e dêem origem a uma nova planta.

Para o estabelecimento de uma cultura *in vitro*, é preciso utilizar meios de cultura que propiciem condições necessárias para o crescimento das plantas e para o fornecimento de nutrientes, energia e vitaminas suplementares (HARTMANN et al., 2002). Além disso, o efeito de clone pode apresentar consideráveis diferenças no comportamento *in vitro* das culturas, pois há clones que se adaptam bem a diversos tipos de meios e outros que necessitam de meios de cultura específicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os propágulos obtidos de árvores adultas de espécies lenhosas somente podem ser estabelecidos *in vitro* caso os explantes provenham de plantas obtidas por estaquia, as quais são mantidas em condições de casa de vegetação, sem o emprego de fitoreguladores (MROGINSKI et al., 1997). A regeneração de plantas jovens e adultas de erva-mate *in vitro* a partir de segmentos nodais demonstrou ser viável usando meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) diluído quatro vezes com 0,04M de sacarose. (SANSBERRO et al., 2000).

3.3.4 Microestaquia

A microestaquia é uma técnica de propagação vegetativa na qual são utilizados propágulos rejuvenescidos na micropropagação para serem posteriormente enraizados, visando à obtenção de mudas. É baseada no máximo aproveitamento da juvenilidade dos propágulos vegetativos (FERRARI et al., 2004b). Na microestaquia, os propágulos vegetativos, denominados microestacas, são obtidos mediante o rejuvenescimento a partir de micropropagação *in vitro*, o que usualmente elimina o uso de fitoreguladores (ALFENAS et al., 2004).

A produção de mudas por microestaquia pode ser feita como segue: as partes aéreas alongadas *in vitro* são enraizadas em casa de vegetação, aclimatizadas em casa de sombra e, posteriormente, a pleno sol, se faz a coleta das primeiras

microestacas. Estas são enraizadas em casa de vegetação seguindo o processo normal de formação de mudas micropropagadas, sendo que a parte basal da muda podada emite novas brotações que serão novamente coletadas, formando assim um jardim microclonal para o fornecimento de microestacas (XAVIER; COMÉRIO, 1996; COMÉRIO et al., 1996).

4 CAPÍTULO I - ESTAQUIA DE MATERIAL ADULTO DE ERVA-MATE

4.1 Introdução

O avanço tecnológico para a produção e a qualidade da erva-mate não têm atendido as exigências do mercado nem as necessidades do consumidor, apesar de ter havido um crescimento e uma diversificação na linha de produtos nas últimas décadas (DONADUZZI et al., 2003). Isto deve-se ao fato de que a exploração baseia-se no extrativismo, tendo a maior parte do mate produzido vindo de ervais nativos ou de plantas originadas de sementes. Em consequência, os plantios são heterogêneos e de qualidade genética inferior, prejudicando o manejo da cultura e o processamento do produto final (WENDLING, 2004).

A propagação vegetativa apresenta-se como uma excelente alternativa, oferecendo várias vantagens, como a possibilidade de ganhos genéticos maiores do que na reprodução via semente e a alta qualidade e uniformidade dos povoamentos (GRAÇA et al., 1990). Apesar disso, a erva-mate carece de protocolos que possam ser aplicados em nível comercial (GRAÇA et al., 1988).

A estaquia é um dos processos mais importantes de propagação vegetativa, principalmente por ser uma técnica cujos custos são menores (XAVIER; COMÉRIO, 1996). Apesar da facilidade da técnica, a estaquia em espécies florestais é dificultada e, em alguns casos, impraticável, pois o enraizamento diminui rapidamente com o aumento da idade da planta matriz (WILKINS et al., 1985). A formação de raízes adventícias é o pré-requisito para o sucesso da estaquia. Contudo, muitas plantas lenhosas economicamente importantes, como a erva-mate, possuem uma baixa capacidade genética e fisiológica de formação de raízes adventícias, apresentando taxa de enraizamento extremamente variável (TAVARES et al., 1992).

Para obter-se sucesso na indução de raízes em estacas, alguns aspectos devem ser levados em consideração. O controle da umidade, o uso de ramos jovens e não tenros e a permanência de um par de folhas cortadas pela metade para a produção de estacas de erva-mate favorecem o enraizamento (HIGA, 1983). Outro

aspecto a ser levado em consideração é o uso de doses adequadas de auxinas, que devem ser utilizadas em baixas concentrações para estacas herbáceas. Já para estacas lenhosas e de difícil enraizamento, como é o caso das estacas de erva-mate, a concentração deve ser alta e próxima à fitotóxica (IRITANI, 1981), sendo recomendado o uso de ácido indol-butírico (AIB) na dose de 8.000 mg L⁻¹ (TAVARES et al., 1992).

Outros fatores importantes para o enraizamento de estacas são o controle de podridões (GRAÇA et al., 1988), a estação do ano (PRAT KRICUN, 1995) e o substrato (PAIVA; GOMES, 1995). O período do ano mais favorável para realizar a estaquia de erva-mate compreende os meses de novembro a maio (PRAT KRICUN, 1995). O substrato a ser utilizado é muito importante, pois pode influir na capacidade de enraizamento e na qualidade do sistema radicular (PAIVA; GOMES, 1995). Enraizamento de 56 % das estacas de erva-mate foi alcançado com o uso de vermiculita média (TAVARES et al., 1992).

O potencial de enraizamento pode ser afetado pelo sombreamento do material a ser propagado (HANSEM; ERIKSEN, 1974; HARTMANN; KESTER, 1990) devido ao aumento no teor de carboidratos e a diminuição de compostos fenólicos nas estacas (HESS, 1969). As variações qualitativas e quantitativas da luz também geram forte impacto na diminuição de produção e morfogênese das plantas (STUEFER; HUBER, 1998). Assim, o período de coleta das estacas pode interferir no enraizamento (HARTMANN et al., 2002), embora a intensidade luminosa ideal para a sobrevivência e o enraizamento de estacas variem de acordo com a espécie (IRITANI; SOARES, 1982; MOE; ANDERSON, 1988).

A rizogênese das estacas pode ser influenciada pelo tamanho da estaca e pela sua capacidade de sobrevivência (PICHETH, 1997). Além disso, é possível a obtenção de maiores porcentagens de enraizamento utilizando-se estacas de gema única. A vantagem da estaquia em relação ao tamanho da estaca está na maior disponibilidade de material para propagação, elevando a taxa de multiplicação quando comparada com estacas de tamanho convencional. Por isso, estacas de menores comprimentos maximizam o número de mudas produzidas de erva-mate (EDEN, 1958).

Considerando que o sexo da planta, o nível de sombreamento, a origem da planta matriz e o tipo da estaca podem afetar o enraizamento e a qualidade do

sistema radicular, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de propagação vegetativa de erva-mate através da estaquia de plantas adultas.

4.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas, em casa de sombra e em câmara úmida do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Em todos os experimentos, os ramos que foram coletados das plantas adultas de erva-mate foram imersos em água fria até a preparação das estacas, com aproximadamente 6 cm de comprimento e um par de folhas cortadas pela metade, descartando-se os ápices dos ramos. Estas tiveram suas bases imersas em solução alcoólica (50%) de 8.000 mg L⁻¹ de AIB por 10 s.

Após, as estacas foram plantadas em caixas de plástico drenadas, contendo como substrato vermiculita expandida de granulometria média e acondicionadas em câmara úmida com irrigação por nebulização durante 1 min a cada 30 min no período mais quente do dia, e por 1 min a cada hora, no período de temperatura mais amena, com auxílio de programador horário.

As estacas foram avaliadas quanto à porcentagem de estacas vivas (avaliação somente da parte aérea das estacas), de estacas mortas, de estacas inalteradas (parâmetro escolhido para estimar as estacas que não enraizaram, não formaram calos nem brotos, mas permaneceram vivas), de emissão de brotos (número de brotos emitidos pela estaca), de formação de calos, de enraizamento e de permanência das folhas primárias (par de folhas cortadas pela metade), número total de raízes, somatório de comprimento de raízes, comprimento de brotos (medida até a inserção das folhas dos brotos), número total de folhas dos brotos, somatório de comprimento de folhas dos brotos e iniciação radicular e/ou formação de calos (quando ainda não se tinha o enraizamento e/ou formação de calos bem definidos visualmente).

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias e, quando necessário, transformados antes da análise estatística, realizada com o

auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences 7.5 para Windows (SPSS Inc. Chicago II).

4.2.1 Sexo da planta matriz e nível de sombreamento

Foram utilizadas 10 árvores matrizes de origem seminal em povoamento com 10 anos de idade, localizado na Área Experimental do Departamento de Ciências Florestais da UFSM. As plantas matrizes foram selecionadas pela sanidade, arquitetura, formato de fuste e de copa, sexo e localização no povoamento, sendo então numeradas e etiquetadas. Dentre as plantas selecionadas inicialmente, quatro árvores matrizes recebiam algum sombreamento de um povoamento vizinho, sendo duas plantas femininas e duas masculinas, e seis árvores matrizes possuíam desenvolvimento a pleno sol, ou seja, não recebiam sombra diretamente, sendo três plantas femininas e três plantas masculinas (Quadro 1).

Em 30 de janeiro de 2008, estacas de material adulto de crescimento do ano foram colhidas de todas as árvores matrizes por meio de poda da parte aérea até cerca de 1,80 m de altura, com exceção de duas plantas, que foram podadas a uma altura de 20 cm do solo. Após a poda, todo o material retirado foi levado ao Laboratório e feito descrição apenas das plantas femininas (contagem de folhas e frutos por ramo) (Quadro 2).

Árvore-matriz	Sexo	Nível de sombreamento	Altura da poda (m)
1	M	Recebe sombreamento	1,80
2	F	Recebe sombreamento	0,20
3	F	Recebe sombreamento	1,80
4	M	Recebe sombreamento	1,80
5	F	Pleno sol	0,20
6	F	Pleno sol	1,80
7	M	Pleno sol	1,80
8	M	Pleno sol	1,80
9	M	Pleno sol	1,80
10	F	Pleno sol	1,80

Quadro 1 - Seleção de 10 plantas matrizes em povoamento de erva-mate de origem seminal de dois sexos e em dois níveis de sombreamento e em duas alturas de poda. Santa Maria, RS, 2008.

Planta matriz	Folhas	Frutos verdes	Frutos maduros	Total de frutos
2	3.457	3.280	932	4.212
3	2.282	4.445	739	5.184
5	3.214	8.843	1.052	9.895
6	4.003	3.886	564	4.450
10	11.050	8.835	464	9.299

Quadro 2 - Descrição de plantas matrizes femininas quanto ao número de folhas, quantidade de frutos verdes e maduros e total de frutos (verdes mais maduros) de plantas adultas de erva-mate de origem seminal no dia do plantio. Santa Maria, RS, 2008.

Após a coleta dos ramos semi-lenhosos de todas as plantas matrizes, as estacas foram preparadas seguindo como descrito anteriormente e então plantadas.

Aos 30 dias, foi avaliada a porcentagem de estacas vivas e mortas, já que nem a brotação nem o enraizamento e/ou calo haviam ainda iniciado. Aos 90 dias, foram avaliadas a emissão de brotos e a porcentagem de estacas vivas e mortas. A avaliação final ocorreu aos 120 dias, para a porcentagem de estacas inalteradas, a mortalidade, a formação de calos, o enraizamento, o número de raízes, o somatório de comprimento de raízes, a permanência das folhas primárias, a emissão de brotos, o número de brotos, o comprimento de brotos, o número total de folhas dos brotos e o somatório do comprimento de folhas dos brotos.

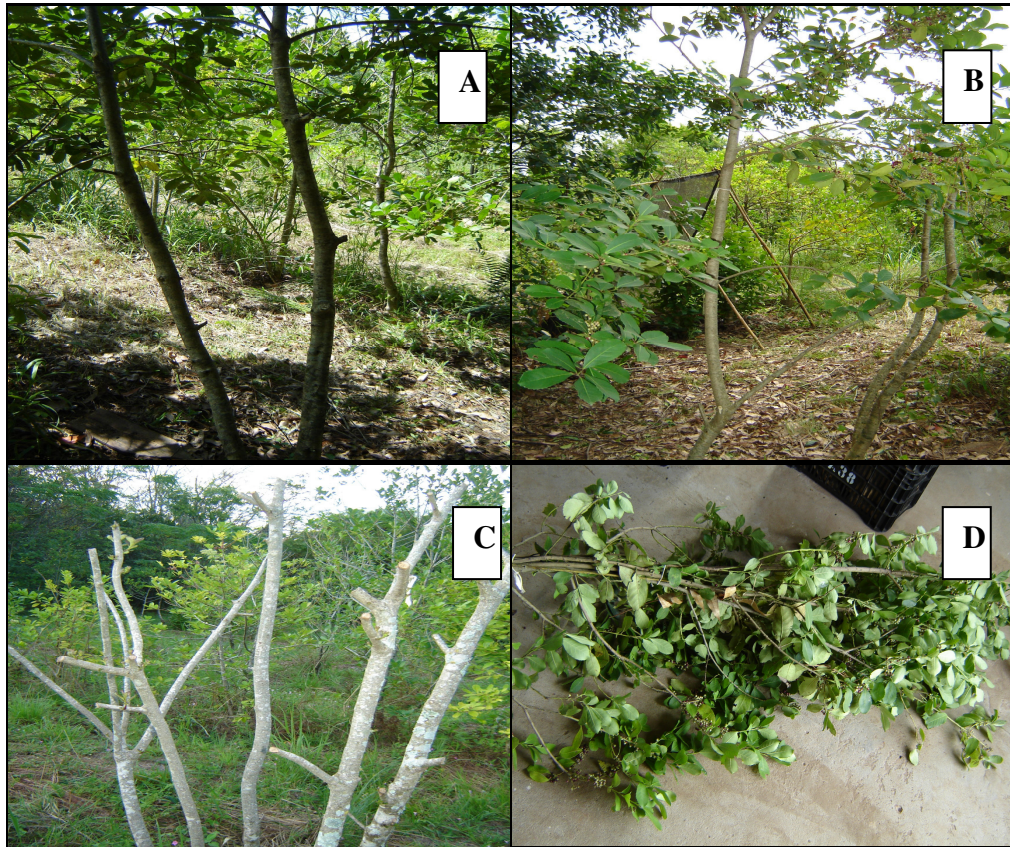


Figura 1 – Aspecto das árvores matrizes selecionadas: árvores matrizes em ambiente com algum nível de sombreamento (A e B), árvore podada a 1,80 m em ambiente pleno sol (C), ramos levados para o laboratório após a coleta (D). Santa Maria, RS, 2008.

As médias foram comparadas pelo teste F e o experimento foi conduzido em um fatorial 2×2 (sexo e nível de sombreamento da planta) no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições e número de estacas por repetições não-padronizadas, num total de 636 estacas.

4.2.2 Origem da planta matriz

O experimento foi instalado em janeiro e fevereiro de 2008, ocasião em que foram selecionadas quatro árvores matrizes localizadas em povoamento propagado sexuadamente com 10 anos de idade, e sete matrizes localizadas em povoamento originado via estaquia de gema única, com 11 anos de idade, sendo que ambos estavam em condições ambientais semelhantes.

Após a coleta dos ramos semi-lenhosos, as estacas foram preparadas e então plantadas como descrito anteriormente

Aos 120 dias, as estacas foram avaliadas quanto à porcentagem de estacas inalteradas, a mortalidade, a presença de calo, o enraizamento, a permanência das folhas primárias, a emissão de brotos, o número de raízes, o comprimento de raízes, o número de brotos, o comprimento de brotos, o número de folhas e o comprimento de folhas dos brotos.

As médias foram comparadas pelo teste F e o experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições e 532 estacas de origem assexuada e quatro repetições e 209 estacas de origem seminal.

4.2.3 Tipo de estaca

Foram utilizados ramos de árvores matrizes com 11 anos de idade propagadas via estaquia de gema única e que já haviam sofrido podas anteriores, localizadas na casa de sombra do Departamento de Fitotecnia da UFSM. No dia 3 de dezembro de 2008, as estacas foram coletadas e preparadas em dois tipos diferentes: estacas de gema única, com cerca de 3 cm, e estacas de tamanho convencional, com cerca de 6 cm de comprimento. Todas as estacas foram tratadas com AIB e plantadas conforme descrito anteriormente.

Aos 35 dias, as estacas foram avaliadas quanto à iniciação radicular e/ou formação de calos, a mortalidade, a brotação e a permanência das folhas primárias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições e um total de 76 estacas de gema única e 57 estacas de tamanho convencional. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Sexo da planta matriz e nível de sombreamento

Na contagem realizada aos 30 dias, o sexo da planta matriz não afetou significativamente o número de estacas vivas, sendo 83,4% de plantas masculinas e 73,6% de plantas femininas. A porcentagem de estacas vivas também não foi afetada de maneira significativa pelo nível de sombreamento das plantas matrizes, com um total de 91,5% estacas vivas de matrizes sombreadas, e de 73,6% estacas vivas de matrizes em pleno sol. O sexo das plantas e o nível de sombreamento também não afetaram a porcentagem de mortalidade, com média de 26,4% estacas mortas de matrizes em pleno sol, 8,5% em estacas de matrizes sombreadas, 16,6% em plantas masculinas e 26,4 % em plantas femininas.

Na avaliação realizada aos 90 dias, a porcentagem de estacas vivas não foi afetada significativamente pelo nível de sombreamento e pelo sexo da planta matriz (93,6% estacas vivas de matrizes sombreadas e 93,2% em pleno sol, 91,0% de plantas masculinas e 93,2% de plantas femininas). A porcentagem de mortalidade novamente não foi afetada pelo nível de sombreamento e pelo sexo das plantas matrizes, apresentando a maior taxa de mortalidade entre as matrizes de pleno sol (6,8%) e entre as matrizes do sexo masculino (9,0%). A porcentagem de brotação foi afetada significativamente pelo nível de sombreamento, com 37,5% de estacas brotadas de plantas matrizes sombreadas e 7,3% de estacas brotadas de plantas matrizes em pleno sol, mas não foi afetada pelo sexo da planta matriz.

Na avaliação aos 120 dias, houve interação significativa entre o nível de sombreamento e entre o sexo das plantas matrizes para o comprimento de brotos e o comprimento de folhas dos brotos (Tabela 1). O nível de sombreamento das plantas matrizes afetou significativamente o comprimento de brotos das estacas de plantas femininas, não sendo observada diferença significativa do nível de sombreamento em estacas masculinas. Em estacas de plantas femininas, os maiores comprimentos de brotos foram verificados em estacas coletadas de plantas matrizes de pleno sol. Quando comparado o sexo da planta, estacas de plantas femininas e masculinas não diferiram entre os níveis de sombreamento. Além disso, foi observado que o sexo da planta não afetou significativamente o comprimento de brotos entre as estacas coletadas de plantas matrizes sombreada nem entre plantas matrizes em pleno sol. Contudo, estacas femininas apresentaram maiores

comprimentos de folhas dos brotos quando coletados de plantas matrizes com nível de sombreamento, enquanto o comprimento de folhas dos brotos de estacas masculinas não foi afetado pelo nível de sombreamento. O sexo das plantas não apresentou diferenças de comprimento de folhas dos brotos em plantas independente do nível de sombreamento da planta matriz.

O nível de sombreamento afetou significativamente a porcentagem de estacas inalteradas, embora o sexo das plantas matrizes não tenha afetado (Tabela 2). Da mesma maneira, a porcentagem de brotos foi afetada pelo nível de sombreamento, mas não pelo sexo das plantas matrizes. Estacas coletadas de matrizes a pleno sol apresentaram a maior porcentagem de estacas inalteradas que matrizes sombreadas; entretanto, a taxa de emissão de brotos neste nível de sombreamento foi significativamente menor, independente do sexo da planta matriz.

Tabela 1 - Comprimento de brotos e de folhas de estacas de plantas adultas de erva-mate de origem seminal de dois sexos e em dois níveis de sombreamento aos 120 dias após o plantio. Santa Maria, RS, 2008.

Nível de sombreamento	Comprimento de brotos		Comprimento de folhas	
	Estacas de plantas masculinas	Estacas de plantas femininas	Estacas de plantas masculinas	Estacas de plantas femininas
Sombreado	1,0 bA*	0,8 bA	4,4 bA	8,1 aA
Pleno sol	1,1 bA	1,4 aA	5,5 bA	2,7 bA

*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 2 - Porcentagem de mortalidade, calo, enraizamento, estacas inalteradas, permanência das folhas primárias e brotos, número de raízes, comprimento de raízes, número de brotos e número de folhas em estacas de matrizes de erva-mate em campo. Santa Maria, RS, 2008.

Parâmetros avaliados	Sexo		Nível de sombreamento	
	Machos	Fêmeas	Sombreado	Pleno sol
Mortalidade (%)	23,0 a*	7,8 a	0,8 a	7,8 a
Calo (%)	19,5 a	24,5 a	44,2 a	24,5 a
Enraizamento (%)	28,6 a	13,3 a	26,4 a	13,3 a
Estacas inalteradas (%)	57,2 a	73,2 a	42,5 b	73,2 a
Permanência (%)	72,4 a	68,2 a	77,5 a	68,2 a
Brotos (%)	12,2 a	4,1 a	51,8 a	4,1 b
Número de raízes	3,2 a	2,0 a	2,6 a	2,0 a
Comprimento de raízes (cm)	1,7 a	1,4 a	0,8 a	1,4 a
Número de brotos	1,1 a	0,8 a	1,0 a	0,8 a
Número de folhas	1,9 a	1,8 a	3,9 a	1,8 a

*Médias de sexo das plantas ou de ambiente de plantas matrizes seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro.

Para analisar a influência da formação de calo no enraizamento, na permanência das folhas primárias e na emissão de brotos, estacas com calo foram separadas e avaliadas (Tabela 3). A porcentagem de estacas com calo que não brotaram e não enraizaram, porém que permaneceram com as folhas primárias foi maior do que a porcentagem de estacas com calo, porém que perderam as folhas primárias, que brotaram e enraizaram. Analisando a influência do enraizamento na formação de calo, na permanência das folhas primárias e na emissão de brotos, pode-se observar que as estacas que emitiram raízes, permaneceram com as folhas primárias, não emitiram brotos e não formaram calo foi superior à porcentagem de estacas que enraizaram e perderam as folhas primárias, brotaram e formaram calos. Como a formação de calos foi afetada pela permanência de folhas, pela emissão de brotos e raízes, e o enraizamento foi afetado pela permanência de folhas, emissão de brotos e formação de calos, estes resultados mostram que a capacidade de enraizamento pode estar relacionada com a permanência das folhas primárias, além de que a emissão de brotos e de calo é prejudicial à rizogênese das estacas semi-lenhosas de plantas adultas de erva-mate.

Tabela 3 - Porcentagem de formação de calos e de raízes com ou sem permanência (perman.folhas) das folhas primárias, brotos, raiz e calo em estacas de plantas adultas de erva-mate a partir de plantas matrizes de origem seminal de dois sexos e em dois ambientes. Santa Maria, RS, 2008.

	Calos (%)	
	Sim	Não
Perman. folhas	7,1 a*	5,0 b
Brotos	7,1 b	19,9 a
Enraizamento	7,1 b	17,1 a
	Raízes (%)	
	Sim	Não
Perman. folhas	6,2 a	5,8 b
Brotos	6,2 b	19,0 a
Calo	6,2 b	18,0 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F, a 5 % de probabilidade de erro.

Um fator importante para a obtenção de raízes de qualidade é que o enraizamento da estaca seja anterior ao desenvolvimento da parte aérea (HARTMANN; KESTER, 1990). Em estacas, as condições de temperatura e umidade relativa interferem na fisiologia, influenciando na sobrevivência da planta (IRITANI, 1981). Quando a estaca permanece viva por um período de tempo maior, há chances para que tanto o indutor de enraizamento como seus fatores internos atuem favoravelmente ao enraizamento (PICHETH, 1997). Para algumas espécies como o eucalipto, a presença de folhas nas estacas é tão marcante que as estacas sem folhas não enraízam (CAMPINHOS; IKEMORI, 1980), pois as folhas garantem um bom suprimento de energia e são fontes produtoras de auxinas (IRITANI; SOARES, 1981). Para o enraizamento de estacas de erva-mate, a presença de folhas foi indispensável, sendo que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se um par de folhas reduzidas com taxa de 50% e, na ausência de folhas, o enraizamento foi nulo (TAVARES et al., 1992). Já para estacas de goiabeira (*Psidium guajava*), a presença de folhas primárias não teve qualquer influência sobre o enraizamento (VALE et al., 2008). Em estacas herbáceas e semi-lenhosas obtidas de árvores adultas de corticeira-da-serra (*Erythrina falcata*), a porcentagem de sobrevivência foi de 26% e de 34%, respectivamente (NEVES et al., 2006),

enquanto que, neste estudo, a porcentagem de estacas vivas de estacas semilenhosas de erva-mate alcançou 52,94%.

Em estudos sobre estaquia de espécies nativas, observam-se grandes variações na capacidade de enraizamento. Estacas de corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli*) apresentaram variações sobre o enraizamento de zero a 100 % aos 60 dias em função do tipo de estaca usada (CHAVES et al., 2003). Em estacas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), as melhores médias de enraizamento foram de 15% com uso AIB e 16% com ácido naftalenoacético (ANA) aos 120 dias (MARROQUIM et al., 2005). Em estudo com estaquia de material adulto de erva-mate, foi realizada apenas uma avaliação aos 34 dias devido à alta mortalidade inicial que ocasionou taxa de enraizamento nula (HIGA, 1982), além de propágulos com mais de 60 anos resultarem numa taxa de 7% de enraizamento. Neste presente experimento, o enraizamento de estacas de erva-mate a partir de material adulto alcançou até 28,6%.

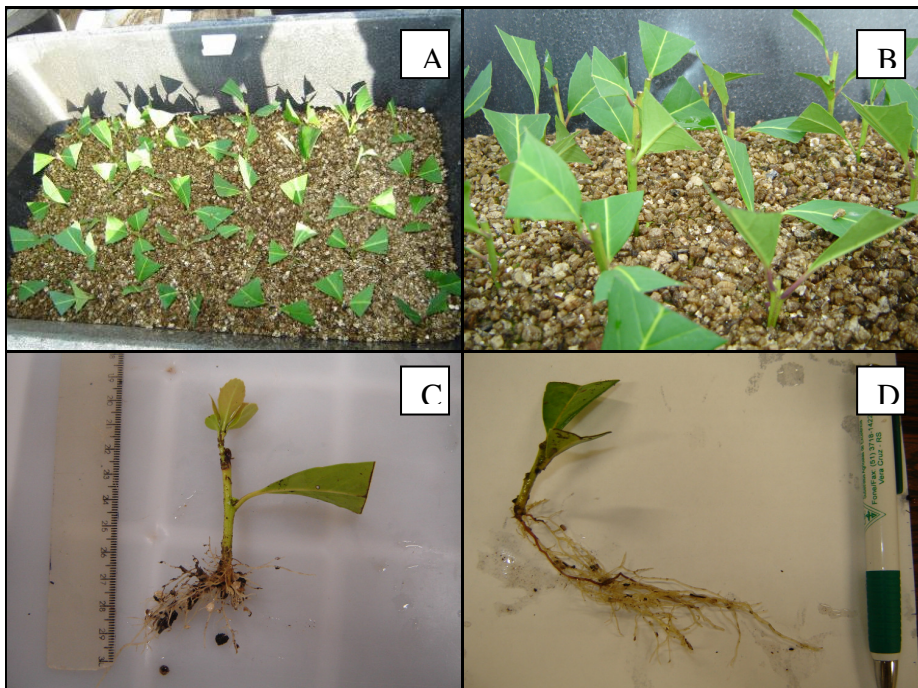


Figura 2 - Aspecto das estacas: Estacas plantadas em vermiculita e em bandeja preta drenada (A), detalhe das estacas (B) no dia da instalação, estaca enraizada e brotada (C), estaca enraizada (D) após 120 dias. Santa Maria, RS, 2008.

Neste estudo, a taxa de enraizamento foi maior quando a formação de calos foi menor além de a formação de calos terem sido menor quando a mortalidade foi

maior. Estes resultados sugerem que a presença de calo pode interferir positivamente na diminuição da taxa de mortalidade; todavia, pode interferir negativamente na taxa de enraizamento. O calo forma-se quando há lesionamento dos tecidos do xilema e do floema (FACHINELLO et al., 1995), e o desenvolvimento pode ser evitado com o aparecimento precoce de raízes (KOMISSAROV, 1968). Estudos indicam que a formação de calo em propágulos é um indicativo do fornecimento de condições ambientais adequadas para o enraizamento, mas, quando se observa a ausência de calo em propágulos juvenis e presença de calo em propágulos adultos, a formação do mesmo é um indicativo de baixa juvenildade dos propágulos (HARTMANN et al., 1997). Na estaquia de nespereira (*Eriobotrya japonica* Lindl.), todas as estacas que desenvolveram raízes apresentavam calos nas proximidades do corte, não havendo a formação direta de raízes na ausência de calo (SCALOPPI JUNIOR et al., 2004). Por outro lado, corroborando este experimento, foi encontrada relação negativa entre a porcentagem de estacas com calos e com raiz, mostrando a inconveniência do aparecimento do calo para o posterior enraizamento (NIKLAS 1986, 1987, 1988). Da mesma forma, em estudo de estaquia com *Pinus spp.*, muitas estacas formaram calos, mas não necessariamente emitiram raízes (CARRERA GARCIA, 1977).

Os tratamentos de plantas masculinas de ambiente sombreado tenderam a maiores médias dentre todos os parâmetros avaliados nesse trabalho para o sucesso da estaquia. Analisando a quantidade de folhas e de frutos de plantas femininas utilizadas para este estudo, pode-se observar que plantas a pleno sol possuíam maior média de folhas e de frutos (verdes e maduros) que plantas matrizes que recebiam algum nível de sombreamento (Quadro 2). Plantas masculinas produzem maior número de galhos por planta, podendo este parâmetro representar uma estratégia importante quando ocorre a frutificação de plantas femininas (RAKOCEVIC et al., 2006).

As plantas cultivadas em pleno sol e na sombra podem desenvolver adaptações fisiológicas e morfológicas, com a finalidade de melhor aproveitar os fatores ambientais disponíveis (VALLADARES; PEARCY, 1998). Dessa maneira, é possível obter maior porcentagem de enraizamento quando as plantas matrizes são mantidas sob baixos níveis de radiação solar, principalmente em espécies de difícil enraizamento (HARTMANN; KESTER, 1990). O sombreamento da planta promove uma alteração do conteúdo de certos inibidores de crescimento naturais e dos

compostos fenólicos, diminuindo assim a oxidação e a necrose dos tecidos e facilitando a rizogênese.

Embora verificando que o sombreamento é benéfico com relação ao preparo do material que será destinado à propagação vegetativa, mais estudos são necessários para avaliar o nível de sombreamento que facilitará o enraizamento das estacas (HANSEM; ERIKSEN, 1974; HARTMANN; KESTER, 1990). Na estaquia de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), o uso de material sombreado foi benéfico, onde estacas apresentaram menor queda das folhas primárias, menor mortalidade além de maior enraizamento e maior número e comprimento de raízes (CASAGRANDE JUNIOR et al., 1999). O sombreamento da planta matriz a ser propagada causa o estiolamento que provoca elevação dos teores de amido nas folhas e tendência à elevação destes no caule, o que pode promover maior enraizamento e maior resistência a condições adversas (VOLTOLINI, 1996).

Neste estudo, a porcentagem média de enraizamento foi relativamente baixa, mas esperada, já que a idade da planta matriz influi diretamente no crescimento das estacas coletadas da mesma. Porém, novas coletas podem ser realizadas nessas plantas matrizes já que, após a poda da parte aérea, novos ramos foram formados, com maior grau de rejuvenescimento, conseqüentemente mais aptos ao enraizamento. Além disso, a presença do calo, das folhas primárias e a emissão de brotos afetaram o enraizamento, mostrando a importância de estacas não formarem calo, permanecerem com suas folhas primárias e não emitirem brotações para o enraizamento de estacas. Plantas femininas de crescimento de pleno sol apresentaram maior média de folhas e frutos que plantas femininas de ambiente sombreado, entretanto, plantas masculinas de crescimento sombreado tenderam a maiores médias dentre os parâmetros avaliados para o sucesso na estaquia.

4.3.2 Origem da planta matriz

Na avaliação realizada aos 120 dias, estacas coletadas de plantas adultas oriundas de propagação vegetativa de 11 anos de idade apresentaram maior porcentagem de enraizamento e maior comprimento de raízes do que plantas de origem seminal com 10 anos de idade (Tabela 4). Entretanto, estacas de origem

seminal apresentaram maior porcentagem de estacas inalteradas. A origem da planta matriz não afetou a porcentagem de brotos, de formação de calos e de mortalidade, o comprimento de brotos, o número de brotos, o número de folhas nem o número de raízes.

Tabela 4 - Porcentagem de brotos, calo, permanência das folhas primárias, de estacas inalteradas, enraizamento e mortalidade, comprimento de brotos, comprimento de folhas dos brotos, comprimento de raízes, número de brotos, número de folhas dos brotos e número de raízes em estacas de origem assexuada e sexuada de erva-mate a campo. Santa Maria, RS, 2008.

Parâmetros avaliados	Origem da planta matriz	
	Propagação vegetativa	Seminal
Brotos (%)	32,8 a*	55,8 a
Calo (%)	66,8 a	41,7 a
Permanência de folhas (%)	90,7 a	79,6 a
Estacas inalteradas (%)	4,3 b	34,6 a
Enraizamento (%)	80,1 a	34,1 b
Mortalidade (%)	5,7 a	6,8 a
Comprimento de brotos	1,0 a	0,8 a
Comprimento de folhas	2,1 b	5,4 a
Comprimento de raízes	2,5 a	1,0 b
Número de brotos	1,1 a	1,1 a
Número de folhas	3,0 a	3,9 a
Número de raízes	6,0 a	3,5 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F, a 5 % de probabilidade de erro.

Ocorreu uma relação inversa entre o comprimento das raízes e o comprimento das folhas dos brotos das estacas, pois, quando o comprimento das raízes foi significativamente maior, o comprimento das folhas dos brotos emitidos na estaca foi menor. As estacas produzidas de matrizes propagadas vegetativamente apresentaram maiores porcentagens de formação de calo, maior valor de comprimento de brotos, maiores número de raízes, além de maior porcentagem de permanência de folhas primárias. Esses resultados mostram que a permanência do par de folhas primárias pode influenciar positivamente no enraizamento da estaca, além de que o desenvolvimento do sistema radicular anterior ao desenvolvimento da

parte aérea pode ser desejável. Da mesma maneira, estacas coletadas de matrizes originadas via propagação vegetativa de erva-mate podem enraizar com maior facilidade que estacas coletadas de matrizes originadas de sementes.

Tem sido recomendada para a estaquia de erva-mate a utilização de um par de folhas cortadas na metade, obtendo-se assim uma menor transpiração e um melhor equilíbrio osmótico e balanço hormonal (KRICUN, 1995). Outra recomendação para a espécie é a utilização de material para estaquia em fase de crescimento juvenil, pois esses propágulos enraízam com maior facilidade do que materiais de plantas mais velhas (HIGA, 1983), embora, em estudos visando à indução da juvenilidade pelo emprego de rebrotes, não tenham mostrado bons resultados (SAND, 1989).

Analisando a influência na formação de calo na permanência das folhas primárias, na emissão de brotos e raízes, observou-se que a permanência de folhas primárias afetou significativamente a formação de calos e de raízes, além de a presença de calo também afetar a formação de raízes (Tabela 5). A formação de calos foi menor quando a estaca não permaneceu com suas folhas primárias, mas não foi afetada pela emissão de brotos nem pelo enraizamento. Do mesmo modo, analisando a influência do enraizamento na permanência das folhas primárias, na emissão de brotos e de calo, observou-se que a formação de raízes foi inferior quando as estacas perderam suas folhas primárias, mas não foi afetada pela produção de brotos; entretanto, foi superior quando a estaca formou calo.

Tabela 5 - Porcentagem de emissão de calos e de raízes com ou sem permanência (perman.folhas) das folhas primárias, brotos, raiz e calo em estacas de plantas adultas de erva-mate a partir de plantas matrizes de duas origens diferentes. Santa Maria, RS, 2008

Calos (%)		
	Sim	Não
Perman. Folhas	20,9 a*	3,9 b
Brotos	20,9 a	24,9 a
Enraizamento	20,9 a	17,2 a
Raízes (%)		
	Sim	Não
Perman. Folhas	21,9 a	3,5 b
Brotos	21,9 a	28,4 a
Calo	21,9 a	15,1 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F, a 5 % de probabilidade de erro.

Para favorecer o enraizamento de estacas de erva-mate, é recomendado um ambiente com umidade controlada e a utilização de ramos jovens, mas não tenros (HIGA, 1983). A rizogênese também pode ser induzida através da aplicação de auxinas, pois estas auxiliam na retenção foliar, no brotamento e na formação de calos (IRITANI; SOARES, 1981), estimulando o enraizamento e as divisões celulares nos tecidos meristemáticos (DEVLIN, 1975).

O sucesso do enraizamento também está ligado às diferenças genéticas, além da produção e disponibilidade de carboidratos (WANG; ANDERSEN, 1989), sendo que as necessidades são diferentes quando se comparam plantas de origem seminal e de origem assexuada. Plantas originadas de propagação assexuada de café (*Coffea canephora*) apresentaram maior comprimento do que plantas originadas de sementes. Por mais que plantas originadas de sementes produzam maior número de brotos, a produtividade das plantas propagadas por estacas foi superior em três colheitas (PARTELLI et al., 2006), corroborando os resultados deste estudo.

Neste contexto, os resultados deste estudo sugerem que o enraizamento de estacas de erva-mate de plantas matrizes de origem de propagação vegetativa pode ser afetado positivamente com a permanência das folhas primárias e com a formação de calo. Embora a proporção de estacas inalteradas de matrizes de origem seminal tenha sido maior, estacas de matrizes de origem vegetativa

apresentaram os melhores resultados dentre os parâmetros avaliados para o sucesso da estaquia de erva-mate.

4.3.3 Tipo de estaca

Aos 35 dias, ainda não havia iniciado a emissão de raízes nas estacas. Em vista disso, avaliou-se a emissão da massa de calo que, posteriormente, poderá formar raízes. Observou-se que não houve efeito dos tratamentos dentre todos os parâmetros avaliados até esse período (Tabela 6). Os valores encontrados podem ser devido à precocidade da avaliação ou apenas resultados casuais. A permanência de folhas primárias não diferiu estatisticamente; entretanto, apresentou altas taxas nos dois tratamentos (média de 88,7%). Também, a porcentagem de mortalidade permaneceu baixa nos dois tratamentos (média de 9%).

Tabela 6 - Porcentagens médias de calo, de mortalidade, de brotação, de estacas inalteradas e de permanência de folhas primárias de estacas de dois tipos diferentes de material adulto de erva-mate, avaliado aos 35 dias após instalação da estaquia. Santa Maria, RS, 2009.

Tipo de estaca	Calo (%)	Mortalidade (%)	Brotação (%)	Estacas inalteradas (%)	Permanência de folhas (%)
Gema única	36,8 a*	7,9 a	27,6 a	42,1 a	90,8 a
Convencional	24,6 a	10,5 a	10,5 a	63,2 a	86,0 a

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

Em 31,6% das estacas, o calo estava presente e a porcentagem de estacas inalteradas alcançou a taxa de 52,7%. Embora a avaliação deste estudo tenha ocorrido precocemente para diferir os tratamentos, valor semelhante de enraizamento foi encontrado numa avaliação aos 34 dias em estaquia convencional de material adulto de erva-mate, situação em que 60% das estacas sobreviveram, mas a emissão de raízes foi nula (HIGA, 1982). Por outro lado, em avaliação aos 135 dias após estaquia de erva-mate adulta, tanto estacas convencionais quanto estacas de gema única não apresentaram diferença na porcentagem de estacas

inalteradas, mas estacas de gema única apresentaram maior enraizamento (HORBACH, 2008). Entretanto, na estaquia de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), o enraizamento e o número de raízes formadas não foram afetados pelo tamanho da estaca (NICOLOSO et al., 2001). A mortalidade variou de zero a 15,8% neste estudo; contudo, em experimento de estaquia de erva-mate, não houve associação entre o comprimento das estacas e a porcentagem de mortalidade (MOLINA e MAYOL, 2003).

Estudos semelhantes a este indicam que estacas normais apresentaram maior número de folhas dos brotos do que estacas de gema única (HORBACH, 2008). No entanto, mudas de chá (*Camelia sinensis*) são produzidas com eficiência a partir de estacas de gema única (EDEN, 1958).

Embora esse experimento não tenha apresentado diferenças entre os tratamentos, foi importante para se observar que a alta taxa de permanência de folhas primárias, juntamente com a alta taxa de estacas inalteradas e a baixa taxa de mortalidade, permite realizar com sucesso a condução deste estudo, realizando novas avaliações dessas estacas.

4.4 Conclusões

- Estaca coletada de planta matriz em pleno apresenta maiores porcentagens de estacas inalteradas;
- A formação de calo, a não permanência de folhas primárias e emissão de brotos afetam negativamente o enraizamento de estacas de material adulto de origem seminal de erva-mate;
- A formação de calo e a permanência de folhas primárias afetam o positivamente o enraizamento de estacas coletadas de matrizes originadas de propagação vegetativa;
- Estacas coletadas de matrizes propagadas vegetativamente apresentam maior enraizamento e maiores comprimentos de raízes.

5 CAPÍTULO II – ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE MICROESTACAS DE ERVA-MATE

5.1 Introdução

A erva-mate foi o primeiro produto das exportações brasileiras, sendo que a produção ainda se constitui em uma das principais fontes de renda para pequenos e médios produtores da região de ocorrência da espécie (LEONTIEV-ORLOV et al., 2003). Na propagação sexuada para plantios comerciais, a produção de mudas de erva-mate apresenta grandes problemas. A germinação só é possível após a estratificação das sementes por até seis meses, devido à dormência por imaturidade embrionária, pois os embriões permanecem em estágio de coração mesmo quando os frutos estão maduros (HEUSER; MARIATH, 2000). Além disso, as sementes possuem germinação desuniforme e em baixa porcentagem (HIGA, 1982).

A dormência das sementes pode ser superada por meio da cultura *in vitro* de embriões zigóticos (HU; FERREIRA, 1990), reduzindo o tempo de germinação e tornando a propagação mais rápida. Os embriões zigóticos são ótimas fontes de explantes, devido ao alto poder regenerativo em função da natureza juvenil dos embriões (HU; FERREIRA, 1990; LITZ, 1991; HARTMANN et al., 2002).

A microestaquia é a utilização de plantas *in vitro* como fonte de propágulos vegetativos (ASSIS, 1997), que serão posteriormente enraizados em ambiente com umidade e temperatura controladas (FERRARI et al., 2004a). A microestaquia diferencia-se da miniestaquia pela origem do material, já que, na microestaquia, as cepas originam-se de mudas micropropagadas e, na miniestaquia, as cepas formam-se pela estaquia convencional ou enxertia (OLIVEIRA et al., 2006).

Algumas vantagens são apresentadas pela microestaquia em relação à estaquia e à miniestaquia, como maior grau de juvenildade dos propágulos, o que aumenta o enraizamento e a qualidade do sistema radicular (ASSIS, 1997), reduz o tempo de formação da muda (IANELLI et al., 1996), aumenta a taxa de crescimento e sobrevivência das mudas no campo (XAVIER et al., 1997) e diminui os gastos durante a implantação (HIGASHI et al., 2000). Esta técnica também apresenta

desvantagens, como maior sensibilidade das microestacas às condições ambientais, além da dependência de laboratório de micropropagação (ASSIS, 1997).

Após a poda das microcepas, o enraizamento das microestacas pode ocorrer *in vitro* ou *ex vitro*, mas a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é altamente desejável sob o aspecto econômico e de qualidade das raízes formada na planta (COMÉRIO; XAVIER, 1997). O sistema radicular formado *in vitro* não é funcional devido à falta de pêlos absorventes (DEBERG; MAENE, 1981) e de conexão vascular, e também por não desenvolverem um câmbio secundário após o período em cultura, sendo necessária a produção de novas raízes após a passagem para as condições *ex vitro* (GEORGE, 1993). Além disso, as raízes *in vitro* são sensíveis à desidratação. Quando o explante é transferido para as condições *ex vitro*, apresentam altas taxas de transpiração e, como os estômatos geralmente se encontram abertos (SCHACKEL et al., 1990), podem levar as mudas à morte (DÍAZ-PÉREZ et al., 1995).

A utilização do enraizamento *ex vitro* tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional. Igualmente, a regeneração de raízes diretamente no substrato produz um sistema radicular com maior número de raízes secundárias sem a formação intermediária de calos (XAVIER et al., 1997). Além disso, o uso de substratos porosos maximiza a produção de raízes secundárias, possibilitando maior suprimento de água e nutrientes para a planta (McCLELLAND et al., 1990).

A formação de raízes adventícias e de gemas em microestacas depende do processo de desdiferenciação de células do propágulo. Essa desdiferenciação é a capacidade que certas células diferenciadas apresentam de iniciar divisões celulares e formar um novo ponto de crescimento meristemático. O conhecimento dessas características das células na planta é importante para a definição das melhores estratégias de regeneração da espécie (HARTMANN et al., 1997).

O enraizamento de microestacas também é influenciado por fatores exógenos e endógenos, como luz, umidade e temperatura, tipo de propágulo e seu estágio fisiológico, (GOMES, 1987; MALAVASI, 1994) e a espécie ou o clone utilizado (CHALFUN, 1989).

Os objetivos deste trabalho foram testar doses de AIB e substratos no enraizamento e aclimatização de microestacas de erva-mate, oriundas do cultivo de embriões visando a formação de jardins miniclonais.

5.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria.

As microcepas foram formadas a partir de sementes excisadas, seguindo protocolo de Horbach (2008). Em câmara de fluxo laminar, os brotos foram coletados das microcepas mantidas *in vitro* e então padronizados para o comprimento de 1 cm, com um segmento nodal por microestaca e um par de folhas cortadas pela metade. Após os tratamentos, as microestacas foram plantadas individualmente em copos plásticos drenados, com substrato utilizado esterilizado em autoclave por uma hora. Os copos plásticos com as microestacas foram mantidos em bandejas fechadas com filme plástico, em sala de incubação com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C. As irrigações aconteceram diariamente com água destilada e, a cada dois dias, com sais de MS.

As microestacas foram avaliadas quanto à porcentagem de microestacas inalteradas (parâmetro escolhido para estimar as microestacas que não enraizaram, não formaram calos nem brotos, mas permaneceram vivas), de formação de calos, de enraizamento e de mortalidade, número de raízes, comprimento de raízes, tamanho total da microestaca, biomassa radicular (comprimento médio de raízes multiplicado pelo número de raízes) e número de folhas dos brotos.

Os experimentos consistiram em cinco repetições e quatro plantas por repetição. Os dados foram submetidos à análise da variância ou análise de regressão com o auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences 7.5 para Windows (SPSS Inc. Chicago Il).

5.2.1 AIB no enraizamento de microestacas de erva-mate

O experimento foi conduzido no período de junho a outubro de 2008. Após preparadas conforme descrito anteriormente, a base das microestacas foi imersa por 10 s em solução de AIB diluído em solução alcoólica na proporção de 50% e então

plantadas em substrato comercial à base de turfa. Foram avaliadas as concentrações de 0, 250, 500, 1.000 e 2.000 mg L⁻¹ de AIB.

As microestacas foram avaliadas aos 30 dias quanto à porcentagem de microestacas inalteradas, mortalidade, formação de calo, enraizamento, número de raízes, comprimento de raízes e permanência das folhas primárias. Aos 120 dias, avaliaram-se a porcentagem de microestacas inalteradas, a mortalidade, o calo, o enraizamento, o tamanho total das estacas, o número de folhas emitidas e o comprimento da maior raiz.

5.2.2 Substrato no enraizamento de microestacas de erva-mate

O experimento foi conduzido no período de outubro a dezembro de 2008. Após preparadas conforme descrito anteriormente, a base das microestacas foi imersa por 10 s em solução de 1.000 mg L⁻¹ de AIB diluído em solução alcoólica na proporção de 50% e então plantadas em cinco substratos (areia de granulometria média, casca de arroz carbonizada, vermiculita de granulometria média, fibra de coco comercial e substrato comercial à base de casca de pinus).

Aos 30 dias, as microestacas foram avaliadas quanto porcentagem de microestacas inalteradas, a mortalidade, presença de calo, enraizamento, número de raízes e comprimento de raízes e biomassa radicular. Aos 60 dias, foram avaliados a porcentagem de estacas inalteradas, a mortalidade, o calo, o enraizamento, o comprimento da maior raiz e o comprimento total da microestaca. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 AIB no enraizamento de microestacas de erva-mate

Na avaliação dos 30 dias, não houve efeito de concentrações de AIB somente para a mortalidade das microestacas. Para os demais parâmetros avaliados, o ponto de máxima eficiência técnica foi aproximadamente a dose de 1.000 mg L⁻¹ de AIB, sendo a maior dose obtida para a porcentagem de enraizamento (1.261 mg L⁻¹), e a menor dose para a média de comprimento de raízes (1.070 mg L⁻¹). O intercepto (constante b₀) não foi significativo para os parâmetros porcentagem de enraizamento e de calo, número de raízes e tamanho médio de raiz, sendo então retirado da análise de regressão (Figura 3). Ocorreu uma relação inversa entre a porcentagem de microestacas inalteradas e os demais parâmetros avaliados, pois, quanto maior era a formação de calos, o enraizamento, o número de raízes e o tamanho médio de raízes menor era a proporção de microestacas inalteradas.

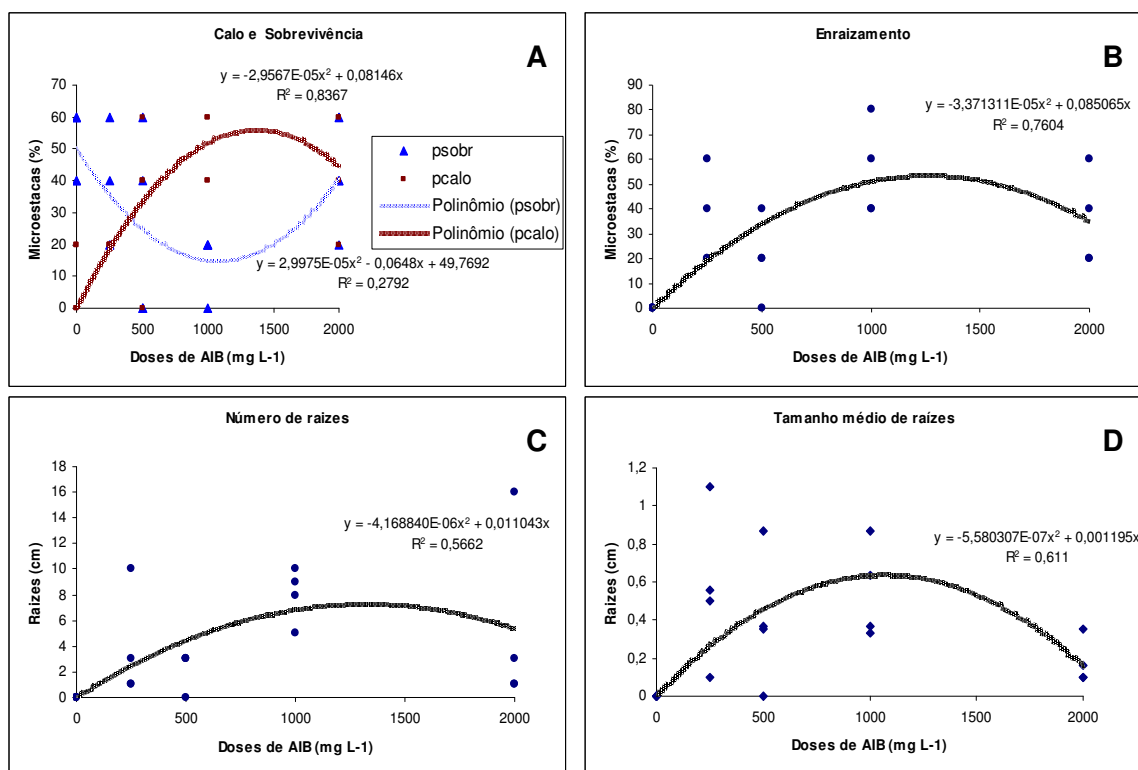


Figura 3 – Parâmetros observados no enraizamento de microestacas de erva-mate com diferentes doses de AIB (0, 250, 1.000, 1.500 e 2.000 mg L⁻¹) em avaliação aos 30 dias. Porcentagem de calo (A), de sobrevivência (A), de enraizamento (B), número de raízes (C) e tamanho médio de raízes (D). Santa Maria, RS, 2008.

As microestacas não enraizaram quando não foram tratadas com AIB, além de ter ocorrido o seu escurecimento (oxidação). Esse mesmo tratamento apresentou a maior taxa de microestacas inalteradas (50%) e mortalidade (40%) e a menor porcentagem de formação de calo (10%). O inverso ocorreu no tratamento com a concentração de 1.000 mg L^{-1} de AIB, apresentando a menor porcentagem de microestacas inalteradas (15%) e de mortalidade (10%), mas a maior taxa de formação de calo (50%).

A dose de 2.000 mg L^{-1} de AIB indicou um possível efeito de fitotoxidez, pelo fato de que algumas plantas deste tratamento apresentaram escurecimento na base das microestacas, interferindo na formação de raízes e na emissão de brotos. Também, algumas microestacas tratadas com 250, 1.000 e 2.000 mg L^{-1} de AIB apresentaram geotropismo positivo, mas sem interferência no enraizamento e emissão de brotos nas microestacas. Nesta primeira avaliação, as microestacas apresentaram média de mortalidade de apenas 20%, média de formação de calo de 32%, média de enraizamento de 29% e 33% de microestacas inalteradas.

Na avaliação realizada aos 120 dias, todos os parâmetros foram explicados pelos efeitos dos tratamentos avaliados. A porcentagem de enraizamento foi de 100% e a porcentagem de microestacas inalteradas foi nula, pois todos os indivíduos vivos avaliados estavam enraizados. O intercepto não foi significativo para o parâmetro comprimento da maior raiz, número de folhas dos brotos e tamanho total da estaca, sendo então retirado da análise de regressão (Figura 4). O ponto de máxima eficiência de concentração de AIB continuou em torno de 1.000 mg L^{-1} , com a maior dose para o parâmetro número de folhas dos brotos (1.108 mg L^{-1}), enquanto a menor dose foi encontrada para o parâmetro porcentagem de mortalidade (1.078 mg L^{-1}). A porcentagem de mortalidade apresentou um comportamento inversamente proporcional aos demais parâmetros avaliados, pois, quanto menor a mortalidade, maior o comprimento de raiz e tamanho total da microestaca, além de maior número de folhas nos brotos por microestacas.

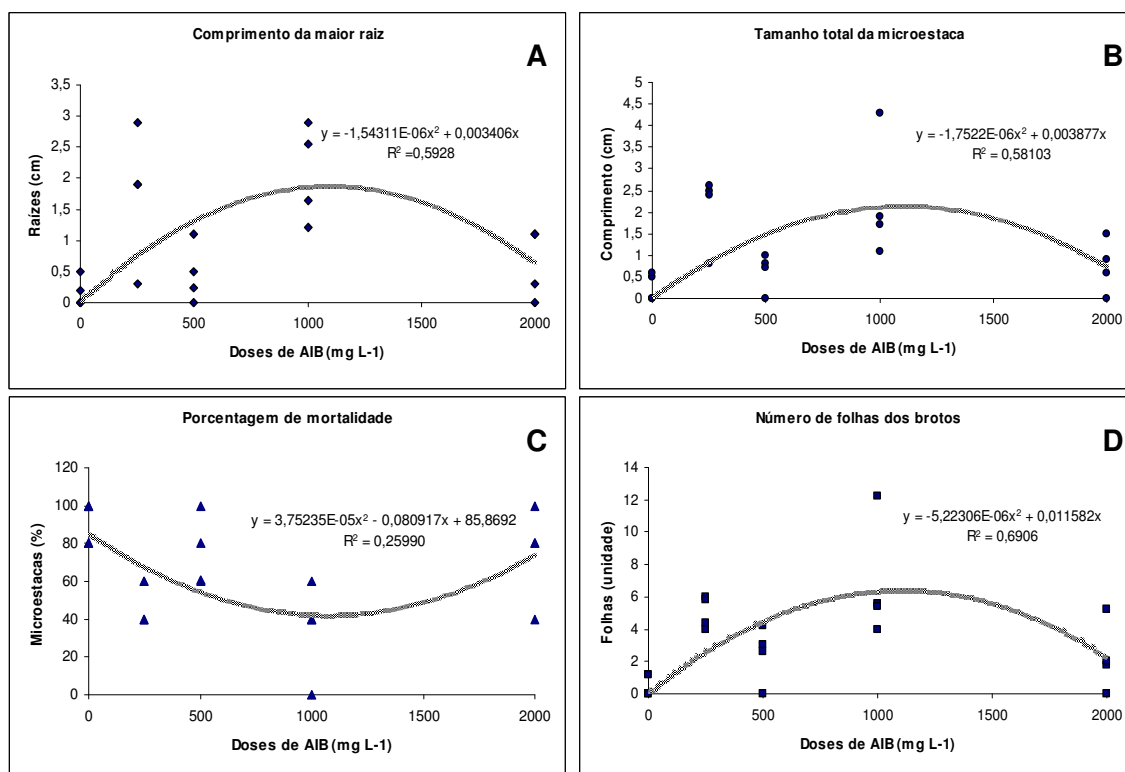


Figura 4 – Parâmetros observados no enraizamento de microestacas de erva-mate com diferentes concentrações de AIB (0, 250, 1.000, 1.500 e 2.000 mg L⁻¹) em avaliação aos 120 dias. Comprimento da maior raiz (A), tamanho total da microestaca (B), porcentagem de mortalidade (C) e número de folhas dos brotos (D). Santa Maria, RS, 2008.

As microestacas não apresentaram mais geotropismo positivo nesta avaliação, mostrando que elas não tiveram seu crescimento comprometido.

Devido ao rejuvenescimento dos tecidos produzidos pela micropropagação, a microestaquia possibilita consideráveis ganhos quando comparada com a estaquia convencional e a miniestaquia, como aumento nos índices de enraizamento (TITON et al., 2003), melhor qualidade do sistema radicular (ASSIS, 1997) e maior velocidade de emissão de raízes. Como a porcentagem de microestacas inalteradas avalia os indivíduos que não se desenvolveram (não enraizaram, não emitiram calos nem a parte aérea), pode-se afirmar que a taxa de microestacas inalteradas está relacionada inversamente com a taxa e a velocidade de enraizamento das microestacas. Portanto, conforme ocorreu neste estudo, na microestaquia, a baixa ou nula taxa de microestacas inalteradas é desejável e esperada. Este resultado mostra também que o desenvolvimento radicular anterior à formação da parte aérea das microestacas parece influenciar positivamente na qualidade da microestaca formada.

As microestacas que não foram tratadas com AIB apresentaram a menor média de tamanho total de microestacas (0,28 cm), os menores número de folhas médio por broto (0,6 brotos), os menores comprimentos médios da maior raiz (0,175 cm), mas apresentaram a maior mortalidade (90%). Da mesma forma, o tratamento de 1.000 mg L⁻¹ de AIB proporcionou os maiores valores para o tamanho total das microestacas (2,25 cm), o maior número de folhas dos brotos (6,8 folhas por microestaca), os maiores comprimentos médios da maior raiz (2,8 cm), mas apresentou a menor mortalidade (35%).

Nessa avaliação, o tamanho médio da maior raiz foi de 1,01 cm e os brotos emitiram uma média de 3,4 folhas por microestacas, mas a taxa de mortalidade média subiu para 65%. Esses resultados sugerem que a avaliação aos 120 dias foi importante para estimar o potencial de crescimento das microestacas.

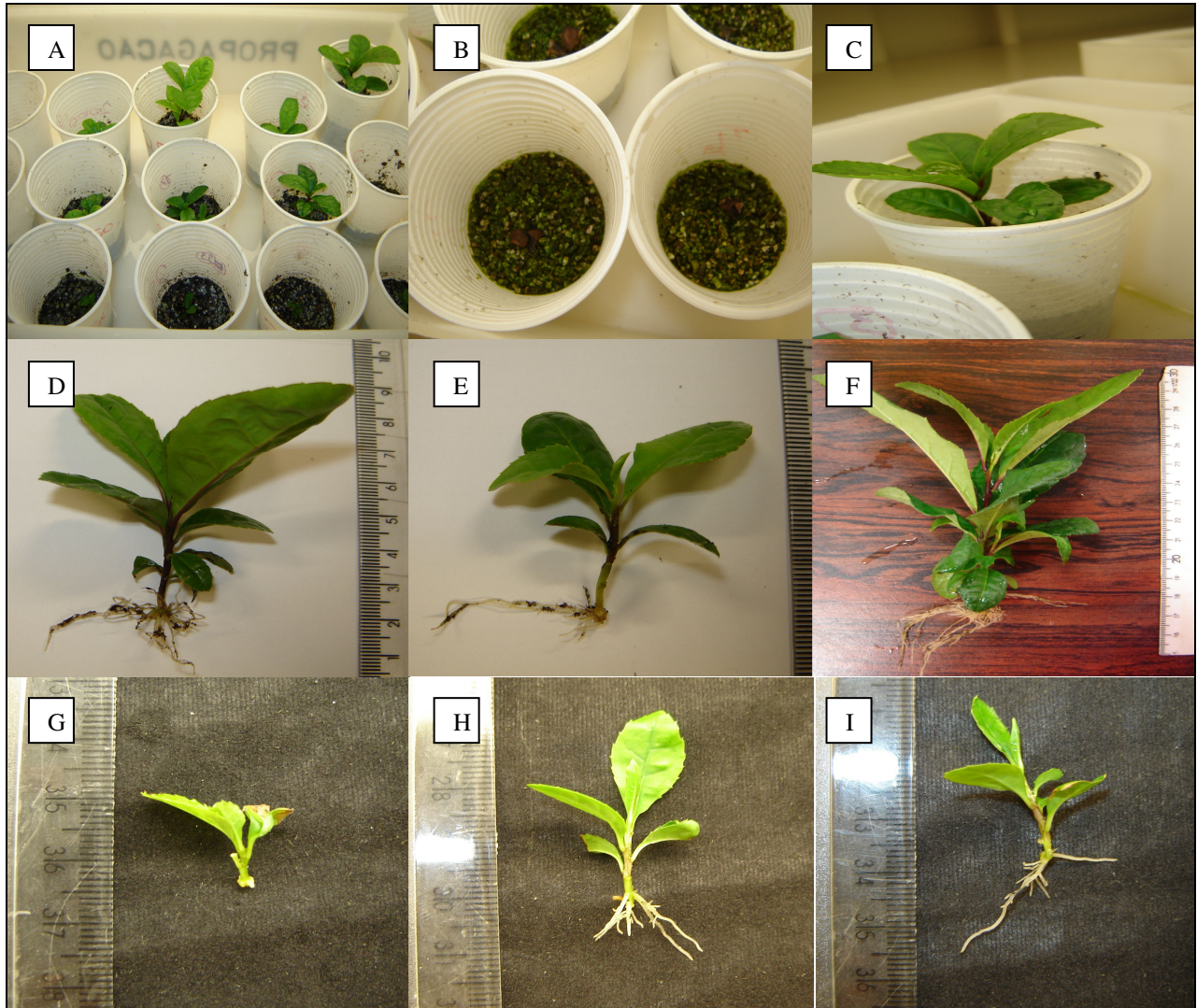


Figura 5 – Aspecto das microestacas aos 120 dias: microestacas plantadas em copos plásticos drenados (A), microestacas mortas (B) e vivas (C), microestacas enraizadas (D, E, F, H, I) e formação de calo em microestaca (G). Santa Maria, RS, 2008.

Para algumas espécies, o uso de fitoreguladores na microestaquia não tem sido indicado (ASSIS et al., 1992; XAVIER; COMÉRIO, 1996; ASSIS, 1997). Fortalecendo essa afirmação, o crescimento de microestacas de *Eucalyptus grandis* não foi influenciado pelo uso de AIB (TITON et al., 2003). Em outro estudo com eucalipto, doses de 0 a 2.000 mg L⁻¹ de AIB não variaram a porcentagem de enraizamento de microestacas (TITON, 2001). Da mesma forma, na aclimatização *ex vitro* de bromélia (*Dyckia distachya* Hassler), a taxa de enraizamento e o tamanho das raízes não foram influenciados pelo AIB (POMPELLI; GUERRA, 2006). Neste experimento, a aplicação de AIB contribuiu para o enraizamento e o crescimento da parte aérea das microestacas. Em microestacas apicais de mirtilo (*Vaccinium ashey*

Reade), a aplicação de 2.000 mg L⁻¹ de AIB foi necessária para o enraizamento (SCHUCH et al., 2007). O uso de 500 mg L⁻¹ de AIB também foi importante para o sucesso no enraizamento *ex vitro* de maçã (*Malus pumila*), podendo utilizar até 1.000 mg L⁻¹ (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001).

Nas duas avaliações, a concentração de 2.000 mg L⁻¹ de AIB parece ter sido tóxica para as microestacas, pois afetou o desenvolvimento da parte radicular e o crescimento da parte aérea das microestacas. Ratificando este resultado, no enraizamento *ex vitro* de maçã, doses superiores a 1.000 mg L⁻¹ de AIB inibiram o enraizamento devido a um período maior de exposição auxina na base das microestacas (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001).

Alguns trabalhos demonstram a viabilidade da técnica de microestaquia em relação à estaquia convencional e à miniestaquia. Clones de eucalipto com dificuldade de enraizamento mostraram resultados superiores na microestaquia do que na miniestaquia (TITON, 2001). Com a microestaquia, evita-se a manipulação de plantas de raiz nua além de reduzir o período de formação da muda (XAVIER; COMÉRIO, 1997). A superioridade de desempenho de microestacas é provavelmente decorrente do rejuvenescimento obtido pela micropropagação (TITON et al., 2003).

Neste estudo, a concentração de máxima eficiência técnica manteve-se ao redor de 1.000 mg L⁻¹ de AIB nas duas avaliações. Além disso, não houve enraizamento das microestacas sem o tratamento com AIB. Já a concentração de 2.000 mg L⁻¹ de AIB apresentou problemas de fitotoxicidade às microestacas.

5.3.2 Substrato no enraizamento de microestacas de erva-mate

Na avaliação aos 30 dias, a vermiculita apresentou 100% de mortalidade e, devido a esse fato, esse tratamento foi retirado das análises estatísticas. Houve diferença significativa entre os tratamentos na porcentagem de enraizamento e no comprimento médio de raízes (Tabela 7). A porcentagem de microestacas inalteradas, de mortalidade e de calo, o número de raízes por microestaca e a biomassa não foram explicados pelos tratamentos. A taxa de enraizamento e o comprimento de raízes foram superiores quando microestacas foram plantadas no

substrato casca de arroz carbonizada, embora não diferiu estatisticamente do substrato comercial e da fibra de coco. No sentido oposto, microestacas plantadas em substrato areia apresentaram as menores taxas de enraizamento e juntamente com a fibra de coco apresentou o menor comprimento médio de raízes dentre os substratos avaliados.

Tabela 7 - Porcentagem de enraizamento e comprimento médio de raiz de microestacas de erva-mate utilizando diferentes substratos, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

Substrato	Enraizamento (%)	Comprimento médio de raiz (cm)
Areia	5 b*	0,05 b
Casca de arroz	45 a	0,67 a
Substrato comercial	20 ab	0,36 ab
Fibra de coco	10 ab	0,06 b

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

O substrato areia apresentou o menor número médio de raiz por microestaca (0,5 cm), a maior taxa de mortalidade e a menor biomassa radicular, mas a presença de calo foi nula, além de apresentar a maior porcentagem de microestacas inalteradas entre os substratos avaliados (30%) (dados não apresentados). Além de o substrato casca de arroz carbonizada ter apresentado o maior enraizamento e o maior comprimento médio de raiz, apresentou também o maior número de raízes e a maior biomassa radicular. O tratamento também apresentou a menor porcentagem de mortalidade de microestacas (5%), e a formação de calo foi a maior dentre os tratamentos (55%). No substrato fibra de coco, a taxa de microestacas inalteradas foi nula, e a taxa de mortalidade foi a maior apresentada no estudo (45%); entretanto, juntamente com a casca de arroz, apresentou a maior formação de calo do experimento (55%).

Portanto, a casca de arroz carbonizada apresentou resultados significativos de enraizamento e de comprimento médio de raiz e os maiores resultados nos parâmetros avaliados para o crescimento de microestacas de erva-mate. Como o enraizamento apresentou uma relação direta com a presença de calos, a sua formação parece ter contribuído no enraizamento das microestacas, nesta primeira avaliação.

Na avaliação aos 60 dias, houve diferença significativa entre os tratamentos em todos os parâmetros avaliados, com exceção da porcentagem de estacas inalteradas (Tabela 8). A casca de arroz carbonizada atingiu a maior porcentagem de enraizamento entre os substratos avaliados, embora não tenha diferido estatisticamente do substrato comercial. As microestacas plantadas em casca de arroz carbonizada apresentaram o maior comprimento da maior raiz, a menor porcentagem de mortalidade e, juntamente com o substrato comercial, apresentaram a maior taxa de emissão de calos entre os tratamentos avaliados. O substrato areia novamente apresentou a menor taxa de enraizamento dentre os substratos avaliados.

Tabela 8 - Porcentagem de enraizamento, calo, mortalidade e comprimento da maior raiz de microestacas de erva-mate utilizando diferentes substratos, aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

Substrato	Enraizamento (%)	Calo (%)
Areia	5 b*	0 b
Casca de arroz	60 a	50 a
Substrato comercial	25 ab	50 a
Fibra de coco	15 b	35 ab
	Mortalidade (%)	Comp. maior raiz (cm)
Areia	75 a	0,08 b
Casca de arroz	25 c	3,23 a
Substrato comercial	30 bc	1,0 ab
Fibra de coco	65 ab	0,37 b

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

Esses resultados confirmam a avaliação aos 30 dias porque, embora estes só tenham explicado significativamente na segunda avaliação, o substrato casca de arroz apresentou, em ambas, a menor taxa de mortalidade e o maior valor de porcentagem de calo. Em analogia, o substrato areia também apresentou, em ambas as avaliações, a maior mortalidade e presença nula de calo nas microestacas. Embora o substrato comercial tenha apresentado a mesma porcentagem de presença de calo que o substrato casca de arroz, este não

apresentou boas taxas de enraizamento, além de inferiores comprimentos de raízes e alta taxa de mortalidade.

Para o enraizamento *ex vitro* de macieira (*Malus prunifolia*), a casca de arroz carbonizada mostrou-se eficiente (MACIEL et al., 2002). Na aclimatização *in vitro* de erva-mate, a vermiculita foi o substrato de menor eficiência para a planta, confirmando os resultados encontrados neste estudo para a aclimatização *ex vitro* da espécie. Entretanto, experimento de aclimatização *in vitro* apontou a fibra de coco ou areia como substratos eficientes (HORBACH, 2008). Testando outros substratos na aclimatização de mudas de marmeleiro (*Cydonia oblonga*), como o substrato solo, ocorreu a morte total das mudas pela podridão no colo (ERIG et al., 2004). Na microestaquia de mirtilo, o substrato comercial à base de casca de pinus apresentou taxa de sobrevivência estatisticamente superior em relação à areia, relacionando esses resultados com a temperatura do ar e a umidade do substrato (SCHUCH et al., 2007).

Para o sucesso da microestaquia, tão importante e necessário quanto o enraizamento, é o crescimento de várias raízes na planta. Mesmo com taxa de 85% de enraizamento, a microestaquia de bromélia foi considerada ineficiente devido ao baixo número de raízes formadas, já que não houve sobrevivência nas microestacas quando não possuíam raízes (POMPELLI; GUERRA, 2006). Para a aclimatização *ex vitro* de microestacas, o uso de substratos porosos auxilia na produção de um maior número de raízes secundárias novas. Isto porque esses substratos fornecem condições físicas e nutricionais adequadas, além do controle da transpiração (DÍAZ-PÉREZ et al., 1995) e da perda de água pelas células (SUTTER, 1988), possibilitando maior exploração pelas raízes de água e nutrientes (DÍAZ-PÉREZ et al., 1995). A porosidade, a capacidade de retenção de água e o fornecimento de nutrientes, além da aeração, determinam a arquitetura do sistema radicular e o posterior crescimento da planta (WRAIGHT; WRAIGHT, 1998). Como o substrato areia possui baixa porosidade (SCHUCH et al., 2007), os resultados deste experimento confirmam a importância dessas características no enraizamento *ex vitro* de erva-mate.

O aporte de nutrientes dos substratos utilizados é outro aspecto importante a ser verificado. Substratos com menores teores de nutrientes proporcionaram maiores comprimentos das raízes em microestacas (LÊ; COLLET, 1991). Essa condição obriga a planta a deslocar maiores quantidades de carboidratos para o

crescimento das raízes, a fim de garantir um maior suprimento de água e nutrientes (DÍAZ-PEREZ et al., 1995). Além dessas características dos substratos, a condição fisiológica do genótipo utilizado terá influência no tempo necessário para a indução de raízes em microestacas (LÊ; COLLET, 1991). Um dos entraves da micropropagação é o crescimento das plantas capazes de sobreviver fora dos frascos de cultura, pois a maioria dessas plantas sofre desidratação durante os primeiros dias de aclimatização, devido à falta de adaptação ao novo ambiente (MALDA et al., 1999). Por esse motivo, muitas plantas micropropagadas não sobrevivem quando transferidas para condições *ex vitro* (PREECE; SUTTER, 1991). Confirmando esse problema da aclimatização *in vitro*, foi observado que o sistema radicular de morangueiro formado *in vitro* possuía somente raízes principais, que eram finas e frágeis e quebravam facilmente durante a retirada do meio nutritivo de cultivo para o plantio no substrato (BORKOWSKA, 2001).

Também é importante a utilização de substratos que permitam o controle de incidência de patógenos nas microestacas. A areia, a vermiculita, a fibra de coco, a casca de arroz carbonizada e o substrato comercial podem ser autoclavados e esterilizados, auxiliando no controle da contaminação de microestacas. Portanto, todos os substratos testados são adequados para a aclimatização das microestacas.

Em síntese, a utilização da técnica de microestaquia representa uma considerável redução de custos de mão-de-obra e infra-estrutura, tanto em laboratório quanto em viveiro. Além disso, a utilização de explantes de menor tamanho, além de eliminar a etapa de enraizamento *in vitro*, representa uma economia de espaço durante o enraizamento das microestacas. Da mesma maneira, a manutenção de microcepas de louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.) possibilitou a obtenção de até sete explantes em duas coletas de microestacas (FICK, 2007), aumentando o número de microestacas formadas em cada coleta.

Neste experimento, o uso da vermiculita como substrato para a climatização de microestacas não foi eficiente. O substrato areia também não apresentou bons resultados para o crescimento de microestacas. Já a casca de arroz carbonizada apresentou boas condições para o enraizamento e crescimento de microestacas de erva-mate na aclimatização e enraizamento *ex vitro*.

5.4 Conclusões

- A concentração de 1.000 mg L^{-1} de AIB é eficiente para o enraizamento *ex vitro* e o crescimento de microestacas aclimatizadas.
- Microestacas de erva-mate podem ser aclimatizadas e enraizadas *ex vitro* em substrato casca de arroz carbonizada ou substrato comercial a base de casca de pinus.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A propagação de plantas adultas de erva-mate é viável, embora o enraizamento diminua de acordo com o aumento de idade da planta matriz. O enraizamento da estaca é afetado positiva ou negativamente pela presença de calo, das folhas primárias e pela emissão de brotos, dependendo da origem do material e do grau de rejuvenescimento da estaca. Plantas matrizes em pleno sol tiveram o desenvolvimento de suas folhas e frutos influenciados positivamente, mas estacas de plantas matrizes masculinas sombreadas tenderam a melhores resultados de crescimento de estaca. A origem da planta matriz também afetou o enraizamento, sendo que matrizes de origem de propagação vegetativa apresentaram crescimento de estacas superior às estacas retiradas de matrizes propagadas via semente.

Durante a aclimatização de erva-mate, o uso de AIB é necessário e a dose de 1.000 mg L^{-1} é eficiente para o enraizamento de microestacas. O tipo de substrato utilizado na microestaquia também tem importância, sendo que o substrato vermiculita não é indicado para essa técnica, e o substrato casca de arroz carbonizada e substrato comercial a base de casca de pinus são eficientes para o enraizamento de microestacas juntamente com a aclimatização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 141, p. 36-46, 1986.

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

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

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

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

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or ex vitro. **Scientia Horticulturae**, Skierniewice, v. 89, p. 195-206, julho, 2001.

CAMPINHOS JR. E., IKEMORI, Y. K. Mass production of *Eucalyptus* spp. by rooting cuttings. In: SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON GENETIC IMPROVEMENT AND PRODUCTIVITY OF FAST-GROWING TREE SPECIES, 1980, **Anais...** Águas de São Pedro : IUFRO, (1980). p. 2-17.

CARRERA GARCIA, M. V. S. La propagation vegetativa en el género Pinus. **Ciência Florestal**, v. 2, n. 7, p. 3-29, 1977.

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

CASAGRANDE JUNIOR, J. G. et al., Influência do sombreamento sobre os teores de carboidratos e fenóis em estacas semilenhosas de araçazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 2219-2223, dez. 1999.

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.

CHALFUN, N. N. J. **Fatores bioquímicos e fisiológicos no enraizamento de estacas de *Hibiscus rosa-sinensis* L.** 1989. 85 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CHAVES, C. R. M. et al. Enraizamento de 5 tipos de estacas caulinares de corticeira-do-banhado. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 15. p. 135, 2003. Edição dos Resumos do 9º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2003, Atibaia.

COMÉRIO, J., XAVIER, A., IANELLI, C. M. Microestaquia: um novo sistema de produção de mudas de *Eucalyptus* na Champion. In: ENCONTRO TÉCNICO FLORESTAL, 7., 1996, Belo Horizonte. **Anais...** Piracicaba: ABRACAVE, 1996. 6 p.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 35-345, 1981.

DEVLIN, R. M. **Fisiologia vegetal**. 2. ed., Barcelona, Omega, 1975, 468 p.

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

DONADUZZI, C. M. et al. Avaliação da presença de contaminantes microbiológicos em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) comercializadas em embalagens de papel e laminados. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., Feira do Agronegócio da Erva-Mate, 1., 2003, **Anais...** Chapecó.

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

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

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

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2 ed. Pelotas: UFPEL, 1995.178 p.

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

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

FICK, T. A. **Estabelecimento in vitro e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (Louro-pardo)**. 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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

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

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

GRAÇA, M. E. C. et al. **Produção de mudas de erva-mate por estaquia**. Curitiba: Embrapa Florestas – EMATER, 1990. 20 p.

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

GOMES, A. L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p.

HACKETT, W. P.; MURRAY, J. R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M. R. **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 93 - 105.

HANSEN, J.; ERIKSEN, E.N. Root formation of pea cuttings in relation to the irradiance of the stock plants. **Physiologia Plantarum**, v. 32, p. 170-173, 1974.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed, New Jersey: Prentice- Hall, 1997, 770 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagación de plantas: principios y prácticas**. Ciudad del México: Compañía Editorial Continental, 1990, 760p.

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

HESS, C. E. Internal and external factors regulating root initiation. In: Whittington, W.J. (Ed.). **Root growth**. London: Butterworth, 1969. p. 42-53.

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

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

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

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

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

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

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 trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990, p. 252 – 264.

IANNELLI, C., XAVIER, A., COMÉRIO, J. Micropropagação de *Eucalyptus* na Champion. **Silvicultura**, n. 66, p. 33-35, 1996.

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

IRITANI, C. **Ação de reguladores de crescimento na propagação vegetativa por estaquia de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire e Araucária angustifolia (Bert.) O. Ktze**. 1981. 163 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* através da aplicação de reguladores de crescimento. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBS, 1983. p. 313-317.

KOMISSAROV, D. A. **Biological basics for the propagation of wood plants by cuttings.** Jerusalem: IPST Press, 1968. 250 p.

KALIL FILHO, A. N.; HOFFMANN, H. A.; TAVARES, F. R. **Mini-garfagem:** um novo método para a enxertia do mogno sul-americano (*Swietenia macrophylla* King.). Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2001. 4 p, 2001. (Comunicado Técnico, n.62).

LÊ, C. L.; COLLET, G. F. Micropropagation de porte greffe de pommier. **Revue Suisse de Viticulture**, Arboriculture et Horticulture, v. 23, n. 3, p. 201-204, 1991.

LEONTIEV-ORLOV, O. et al. Estudos de multiplicação *in vitro* com a matriz de erva-mate cambona-4. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3.; FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVA-MATE, 1., **Anais...** disponível em CD-ROM. 2003.

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

MACCARI, JUNIOR. A.; MAZUCHOWSKI, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate.** Curitiba: Câmara Setorial Produtiva da Erva-Mate do Paraná, 2000. 160 p.

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

MALAVASI, U. C. Macropropagação vegetativa de coníferas – perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e Ambiente** , v. 1, n. 1, p. 131-35, 1994.

MALDA, G.; SUZÁN, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* culture as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. **Scientia Horticulturae**, Tempe, v. 81, p. 71-87, 1999.

McCLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L.; CAROTHERS, Z. B. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody

plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 23, n. 2, p. 115-123, 1990.

MARROQUIM, P. M. G. et al. Propagação vegetativa de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) com o uso de auxinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 10.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2005, Recife. [**Anais...**]. [Campinas]: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2005. disponível em CD-ROM

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

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

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

MROGINSKI, L. et al. Micropropagacion de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): estado actual y perspectivas. In. CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1997. p. 141-151. (Documentos, 33).

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

NEVES, T. S. et al. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 12, Brasília, 2006.

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

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

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

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

OLIVEIRA, M. L. et al. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones híbridos de *eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 4, p. 503-512, 2006.

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

PARTELLI, F.L. et al. Produção e desenvolvimento radicular de plantas de café Conilon propagadas por sementes e por estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 949-954, 2006.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, sócioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil**. 2003. 112 p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira m.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, Jaboticabal, 2001.

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

POMPELLI, F. M.; GUERRA, M. P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. **Floresta e Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 42 – 49, 2006.

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

PRECCE, 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, p. 71-92, 1991.

RAKOCEVIC, M. et al. Caracterização do microclima luminoso em dois sistemas de cultivo de erva-mate e o seu impacto na produtividade de plantas. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 4., 2006. Pousadas. **Anais...**, 2006, p. 263-268.

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

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. et al. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by *in vitro* culture of nodal segments. **Biocell**. v. 24, n. 1, p. 53-63. 2000.

SCALOPPI JUNIOR, E. J.; JESUS, N.; MARTINS, A. B. G. Capacidade de enraizamento de variedades de nespereira submetidas à poda de renovação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 61-64, 2004.

SCHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomatal function and cuticular conductance *in* whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 3, p. 468-472, 1990.

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

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

STUEFFER, J. F.; HUBER, H. Differential effects of light quantity and spectral light quality on growth, morphology and development of two stoloniferous *Potentilla* species. **Oecologia**, v. 117, 1998.

STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas – CNPF, 1988.10 p. (Circular Técnica, n.17).

SUTTER E. Stomatal and Cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234–238, 1988.

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: Florestas: Desenvolvimento e Conservação, 1992. p. 626-639.

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

TITON, M. et al. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

VALE, M. R. et al. Ácido indolbutírico e sacarose no enraizamento de estacas de goiabeira cultivar paluma. **Revista Caatinga**. Universidade Federal Rural do Semi-árido. v. 21, n. 3, p. 69-74, 2008.

VALLADARES, F.; PEARCY, R. W. The functional ecology of shoot architecture in sun and shade plants of *Heteromeles arbutifolia* M. Roem., a Californian chaparral shrub. In: **Oecologia** 114: 1-10, 1998.

VOLTOLINI, J. A. **Influência do sombreamento em plantas matrizes de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) para a produção de mudas por estacas**. 1996. 59 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - UFPEL, Pelotas.

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

XAVIER, A.; COMÉRIO, J.; IANNELLI, C. M. Eficiência da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v. 4, p. 40-45.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento “*ex vitro*” de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas “*in vitro*”. **Scientia Forestalis**, n. 51, p. 29-36, 1997.

WANG, Q.; ANDERSEN, A.S. Propagation of *Hibiscus rosa-sinensis*: relations between stock plant cultivar, age, environment and growth regulator treatments. **Acta Horticulturae**, v. 251, p. 289-309, 1989.

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

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

WILKINS, C. P.; CABRERA, J. L.; DODDS, J. H. Tissue propagation of trees. **Outlook on Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 2-13, 1985.

WRAIGHT, J.M.; WRAIGHT, K.C. Soil water and root growth. **HortScience**, Alexandria, v. 33, n.6, p. 951-959, 1998.