

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

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE MARCADORES  
RAPD E DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS E  
MINIESTACAS DE CLONES DE ERVA-MATE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ronilda T. Silveira**

**Santa Maria, RS, Brasil,**

**2012**

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE MARCADORES RAPD E  
DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS E MINIESTACAS DE  
CLONES DE ERVA-MATE**

**Ronilda T. Silveira**

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, PhD.**

**Santa Maria, RS, Brasil,**

**2012**

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

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

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE MARCADORES RAPD E DE  
ENRAIZAMENTO DE ESTACAS E MINIESTACAS DE CLONES  
ERVA-MATE**

elaborada por  
**Ronilda T. Silveira**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Dílson Antônio Bisognin, PhD.**  
(Orientador/Orientador)

**Frederico Dimas Fleig, Dr. (UFSM)**

**Alexandra Augusti Boligon, Dr. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 03de agosto de 2012.

*A ciência está longe de ser um instrumento perfeito de conhecimento. É apenas o melhor que temos.*

*Carl Sagan*

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Maria por ser Pública, gratuita e de qualidade. Sabendo que são os colaboradores que nela atuam os promotores deste sucesso.

Ao meu orientador, Professor Dílson A. Bisognin, pelos aconselhamentos, críticas e sugestões sempre relevantes.

Ao meu co-orientador, professor Frederico D. Fleig, pela troca de ideias.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À professora Carla A. Delatorre, do Departamento de Plantas e Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por oportunizar os trabalhos com marcadores moleculares.

Ao Laboratorista Fabio Berndt pelo intensivo em marcadores moleculares.

À secretária do PPGF, Tita, pelo apoio, amizade e auxílio.

Ao colega engenheiro florestal, Marcio C. Navroski, pela ajuda com a estatística.

Aos amigos Neiva, Jardel, Ander e Petró pela amizade e companheirismo.

Às minhas irmãs Roze e Liliam, por estarem sempre presentes em minha vida, apesar da distância física.

Aos meu sobrinhos Stéfane, Karoline, Gabriel e William por existirem o tornarem minha vida mais divertida.

Aos meus pais, Caetano Silveira e Maria A. Silveira pela vida, ensinamentos e valores.

## RESUMO

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

### **POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE MARCADORES RAPD E DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS E MINIESTACAS DE CLONES DE ERVA-MATE**

AUTORA: RONILDA T. SILVEIRA

ORIENTADOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 03 de agosto de 2012.

O resgate de plantas adultas selecionadas e o rejuvenescimento dos propágulos se constituem no maior desafio para viabilizar a clonagem massal da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Os objetivos deste trabalho foram identificar e separar clones que compõem o jardim clonal por meio de marcadores RAPD e avaliar o efeito de diferentes doses de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento de estacas e miniestacas de diferentes clones de erva-mate. Para tanto foram realizados três experimentos. No primeiro, folhas jovens de dez clones tiveram o DNA extraído para testar marcadores RAPD. No segundo, brotações de cepas de quatro clones foram utilizadas para preparar estacas de gema única, com folha cortada pela metade. No terceiro experimento, estacas enraizadas de árvores com 20 anos de idade foram utilizadas para a formação de um minijardim clonal e produção de miniestacas com gema única e uma folha cortada pela metade. Para o enraizamento, tanto as estacas quanto as miniestacas foram tratadas com diferentes doses de AIB. A técnica RAPD é eficaz para a separação de clones de erva-mate, sendo que os iniciadores OPP-03, OPP-06, OPP-15 e OPP-16 foram os mais polimórficos. Estacas de gema única de brotações oriundas da decepa de alguns clones de erva-mate são competentes para o enraizamento, o que dispensa o uso de ácido indol butírico. Os clones FO10 e FO52 diferem quanto a competência ao enraizamento das miniestacas. O enraizamento de miniestacas do clone FO10 ocorre sem a aplicação de ácido indol butírico.

**Palavras-chave:** Seleção, Produção de Mudanças, Estaquia, Miniestaquia, Ácido Indol Butírico, Marcadores Moleculares.

## ABSTRACT

Master Thesis

Graduate Program of Forest Engineering

Federal University of Santa Maria

### **APPLICATION POTENTIAL OF RAPD MARKERS AND ROOTING OF CUTTINGS AND MINICUTTINGS OF MATE CLONES**

AUTHOR: RONILDA T. SILVEIRA

ADVISOR: DÍLSON ANTÔNIO BISOGNIN

Local and Place of Defense: Santa Maria, August 3<sup>rd</sup>, 2012.

The rescue of selected adult plants and the renewing of explants constitute the greatest challenge to enable the clonal propagation of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). The objectives of this study were to identify and separate clones of the clonal garden by RAPD markers and to evaluate the effect of different doses of indol butyric acid (IBA) on rooting of cuttings and minicuttings of different clones of mate. Three experiments were carried out. The first, young leaves of ten clones had the DNA extracted for testing RAPD markers. The second, new shoots of stump of four clones were used to set up one bud cuttings with one half leaf. The third experiment, rooted cuttings of 20 year-old-trees were used to set up a clonal minigarden to collect minicuttings of one bud and one half leaf. All cuttings and minicuttings were treated with different doses of IBA. The RAPD technique is successful for clone separation and identification, being the primers OPP-03, OPP-06, OPP-15 and OPP-16 the most polymorphic. Single bud cuttings of new sprouts from stumps of some mate clones are capable of rooting, without the need of indole butyric acid. The clones FO10 and FO52 have different capability for rooting. Minicuttings of the clone FO10 root without indol butyric acid.

**Key words:** Selection, Plant Production, Cutting, Minicutting, Indol Butyric Acid, Molecular Markers.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Área de distribuição natural da erva-mate ( <i>Ilex paraguayensis</i> St. Hil.).....	13
Figura 2 –	Produção de erva-mate dos principais estados brasileiros produtores. Nos anos de 1995, 2000, 2005 e 2006, comparativamente ao total nacional.....	14
Figura 3 –	Folhas jovens de erva-mate em tubos falcon com sílica. Santa Maria, RS, 2012.....	22
Figura 4 –	Dendrograma de similaridade obtido por marcadores RAPD das relações entre dez clones de erva-mate com base na similaridade de Jaccard. Santa Maria, RS, 2012.....	25
Figura 5 –	Padrão de bandas RAPD produzidas pelos iniciadores OPP 03, OPP 06, OPP 15, OPP 20 e OPP 16 em dez clones de erva-mate, C: controle. Santa Maria, RS, 2012.....	26
Figura 6 –	Brotações de erva-mate oriundas de poda drástica, representativas do material utilizado para a preparação das estacas de gema única. Santa Maria, RS, 2012.....	29
Figura 7 –	Sobrevivência de estacas dos clones de erva-mate, aos 90 dias, em função da aplicação de diferentes dosagens de AIB (0, 1.500, 3.000, 4.500 e 6.000 mg L <sup>-1</sup> ). Santa Maria, RS, 2012.....	31
Figura 8 –	Estacas enraizadas dos clones de erva-mate: (A) FR1 em 0 AIB, (B) FR4 em 0 AIB, (C) FR2 em 0 AIB e (D) FR3 em 0 AIB, aos 90 dias. Santa Maria, RS, 2012.....	32
Figura 9 –	Porcentagem de brotos (A) e comprimento de brotos (B) e número de folhas (C) de estacas de gema única de clones de erva-mate aos 90 dias, em função da aplicação de diferentes doses de AIB. Santa Maria, RS, 2012.....	33
Figura 10 –	Desenho esquemático do sistema sem solo, conduzido em bandejas de polietileno (55 x 34 x 15 cm), com fertirrigação realizada por subirrigação (BISOGNIN et al. 2007).....	36
Figura 11 –	Formação de minicepa por meio da recepa de mudas de erva-mate a aproximadamente 9 cm do colo. Santa Maria, RS, 2012.....	37
Figura 12 –	Brotações recém coletadas de minicepas de erva-mate(A); confecção de miniestacas em gema única e folha recortada pela metade. Santa Maria, RS, 2012.....	37
Figura 13 –	Sobrevivência de miniestacas de dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.....	39
Figura 14 –	Porcentagem de enraizamento (A) e número de raízes (B) de miniestacas dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.	40

Figura 15 – Brotações e folhas clone FR52 (A) e miniestacas enraizadas clone FR10, aos 60 dias. Santa Maria, RS, 2012.....	41
Figura 16 – Percentagem (A) e comprimento de brotos (B) de miniestacas dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.....	41
Figura 17 – Número de folhas de miniestacas dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Quantidade de DNA extraídas de dez clones de erva-mate da coleção do MPVP. Santa Maria, RS, 2012.....	24
Tabela 2 –	Séries de Iniciadores RAPD utilizados nas amostras de DNA. Santa Maria,RS,2012.....	25
Tabela 3 –	Valores dos quadrados médios e significância para a percentagem de sobrevivência, enraizamento e brotação; para o número de raízes e folhas e para o comprimento de brotações de miniestacas de erva-mate submetidas à aplicação de diferentes dosagens de AIB. Santa Maria, RS, 2012.....	30
Tabela 4 –	Percentagem de sobrevivência de clones de erva-mate aos 30 e 90 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2012.....	31
Tabela 5 –	Percentagem de enraizamento e número de raízes por estaca de gema única de clones de erva-mate aos 90 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2012.....	32
Tabela 6 –	Valores dos quadrados médios e significância para a percentagem de sobrevivência, enraizamento e brotação; para o número de raízes e folhas e para o comprimento de brotações de miniestacas de erva-mate submetidas à aplicação de diferentes dosagens de AIB. Santa Maria, RS, 2012.....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Erva-mate.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Técnicas para Avaliação de Diversidade Genética.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Fatores que Influenciam a Propagação Vegetativa de Espécies Perenes.....</b>	<b>16</b>
2.3.1 Genótipo.....	16
2.3.2 Maturação ou Idade Fisiológica.....	17
2.3.3 Reguladores de Crescimento.....	18
<b>2.4 Propagação Vegetativa por Estaquia e Miniestaquia.....</b>	<b>19</b>
<b>3 IDENTIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DE CLONES DE ERVA-MATE POR MARCADORES RAPD.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Introdução.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Material e Método.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Conclusão.....</b>	<b>27</b>
<b>4 ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DA REBROTA DE CEPAS DE PLANTAS ADULTAS DE ERVA-MATE.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Material e Método.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4 Conclusão.....</b>	<b>34</b>
<b>5 ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE ERVA MATE.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Introdução.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Material e Método.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4 Conclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Desde o século XVI, com os Jesuítas, até os dias de hoje a erva-mate é considerada um cultivo tradicional, com significativo impacto econômico nos países do sul da América do Sul (PARANÁ, 2012). Existe uma infinidade de usos para a erva-mate, além do tradicional chimarrão e do tererê, do chá-mate queimado e do solúvel. O extrato das folhas, a clorofila, os compostos voláteis, a cafeína, os flavonóides e as saponinas contidas na erva-mate podem ser empregados na fabricação de sucos, refrigerantes, corantes, sorvetes, chicletes, medicamentos, produtos cosméticos (perfumes, sabonetes, desodorantes), ampliando as possibilidades de mercado (MIRANDA; URBAN, 1998).

A variabilidade genética da erva-mate para estes diferentes usos só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada, sendo a descrição das introduções ou acessos fundamental para a manutenção e exploração do potencial das coleções. Tal caracterização pode ser feita por meio de marcadores ou descritores morfológicos e/ou moleculares (SINGH, 2001). A identificação de duplicatas é considerada um passo importante no desenvolvimento de uma coleção nuclear capaz de representar, com confiabilidade, a variabilidade genética disponível da espécie, otimizando a melhor condução dos trabalhos pelos melhoristas e tornando o germoplasma mais acessível a todos os usuários (FERREIRA et al., 2011). Dentre as técnicas existentes para estudos moleculares, a RAPD (WILLIAMS et al., 1990) é relativamente simples, rápida e de baixo custo, o que justifica a utilização e a boa aceitação para caracterização de bancos de germoplasma ou coleções de recursos genéticos (VIEIRA et al., 2004).

Apesar de ser uma espécie promissora, ainda existem obstáculos em relação à produção de mudas em escala comercial. A produção de mudas via semente é limitada pela baixa qualidade genética e fisiológica das mesmas; além disso, por apresentar dormência, é necessário um longo período para a germinação, o qual leva de 100 a 360 dias (HU, 1975). Além disso, por conta da coleta de sementes sem critérios e da própria recombinação genética, os ervais apresentam desenvolvimento heterogêneo gerando reflexos negativos na qualidade e produtividade do produto final (WENDLING, 2004). Neste contexto, a formação de povoamentos com mudas oriundas da propagação vegetativa de árvores matrizes selecionadas deve apresentar maior qualidade genética, possibilitando consideráveis ganhos na qualidade e produção (XAVIER; SANTOS, 2002).

A propagação vegetativa da erva-mate é estudada há bastante tempo, contudo ainda é limitada pela dificuldade de enraizamento de material adulto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), impossibilitando a definição de protocolos adequados para esta finalidade. Para contornar essa situação, trabalhos partindo de material juvenil ou rejuvenescido por técnicas específicas, com destaque para a poda drástica e miniestaquia, estão sendo realizados (BRONDANI et al., 2007). A poda drástica consiste na utilização de propágulos de brotações emitidas na base da planta, a poucos centímetros do colo (ALFENAS et al., 2004). Tal técnica vem sendo amplamente utilizada na clonagem de plantas adultas de difícil enraizamento, a exemplo do *Eucalyptus* spp. e da macieira (*Malus domestica* Borkh.) (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A miniestaquia, por sua vez, é uma variação da técnica de estaquia, desenvolvida para espécies florestais na metade da década de 90, que se baseia na utilização de brotos retirados de plantas propagadas pelo método de estaquia convencional, ou ainda, de mudas produzidas por sementes (WENDLING et al., 2005). A técnica surgiu por conta das limitações da microestaquia quanto à obtenção de material rejuvenescido em laboratório de micropropagação, tanto no que tange aos aspectos técnicos, estruturais e operacionais, quanto financeiros (XAVIER; WENDLING, 1998). Para espécies com alto valor econômico, como é o caso de *Eucalyptus* spp, a propagação vegetativa por miniestaquia tem se justificado pela redução de área e do tamanho da estaca e pelo aumento da taxa de multiplicação (HIGASHI; SILVEIRA, 2002). Contudo, para espécies nativas com importância comercial, a exemplo da erva-mate, o emprego da miniestaquia é bastante recente, sendo escassas as informações sobre o comportamento desta espécie.

Os objetivos deste trabalho foram identificar e separar clones que compõem o jardim clonal por meio de marcadores RAPD e avaliar o efeito de diferentes doses de ácido indol butírico no enraizamento de estacas e miniestacas de diferentes clones de erva-mate.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Erva-mate**

O gênero *Ilex* pertence à família Aquifoliaceae e apresenta cerca de 600 espécies, sendo 220 nativas da América do Sul, das quais 68 ocorrem no Brasil (SCHERER, 1997). A

*Ilex paraguariensis* possui as seguintes denominações: matin ou mati na língua quéchua; erva mate, chá-de-Paraguai, chá dos jesuítas, erva do diabo e k a'a em idioma guarani (INSTITUTO EUVALDO LODI, 1986, p.32). O vocábulo mati de origem quéchua significa cabaça, cuia ou porongo e caracteriza-se como um recipiente feito do fruto maduro da cucurbitácea *Legenaria siceraraia* (Mol) Standl. Entretanto, os conquistadores espanhóis aplicaram o termo para referirem-se ao que o nativo guarani denominou “caiguá” (kâa = erva, y = água, gua = sufixo de procedência), ou seja, “o que pertence à água”, ou “o da água” (RAU, 1997). No Brasil a espécie ocorre naturalmente nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e no nordeste da Argentina e grande parte do Paraguai (CARVALHO, 2003).

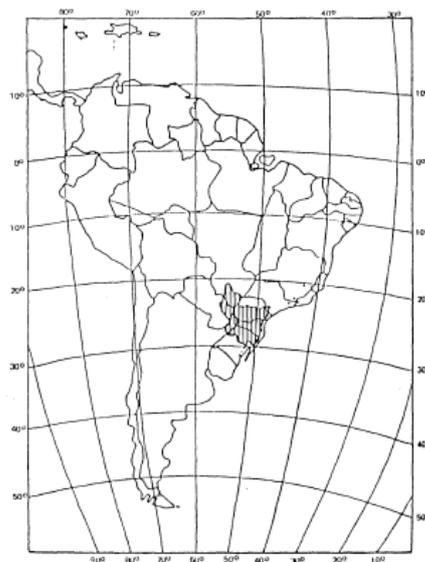


Figura 1 – Área de distribuição natural da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).  
Fonte: Oliveira e Rotta (1983).

Segundo Reitz et al. (1983) e Carvalho (2003), a espécie classifica-se em arvoreta até árvore perenifólia de 10 a 15 m de altura, de tronco reto e de coloração acinzentada e bastante curto, com DAP de 20 a 40 cm de diâmetro. Na floresta pode atingir até 25 m de altura e 70 cm de diâmetro; os ramos são cilíndricos ou subcilíndricos, também cinzentos, sendo que os terminais são densamente tomados por pequenas lenticelas. É uma espécie florestal umbrófila e seletiva higrófila, crescendo preferentemente em associações mais evoluídas dos pinheirais de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, acompanhada de outras espécies como imbuia *Ocotea porosa* (Nees et Martius ex Nees), cedro *Cedrela fissilis* Vell., pinho bravo

*Podocarpus sp.*, canjerana *Cabralea canjerana (Vell) Mart*, além de plantas das famílias das Mirtaceas, Leguminosas e Lauraceas (REITZ; EDWIN, 1967; OLIVEIRA; ROTTA, 1983).

A erva-mate é largamente consumida sob a forma de infusão, de forma que a importância cultural da preparação da erva-mate (chimarrão) tem sido comparada à cerimônia do chá na cultura japonesa e é de conhecimento que nos países da América do Sul, extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* são consumidos numa razão de mais de um litro por dia por milhões de pessoas (MOSIMANN et al., 2006). No Brasil, os principais estados produtores de erva-mate são Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com alguma produção no Mato Grosso do Sul (Figura 2).

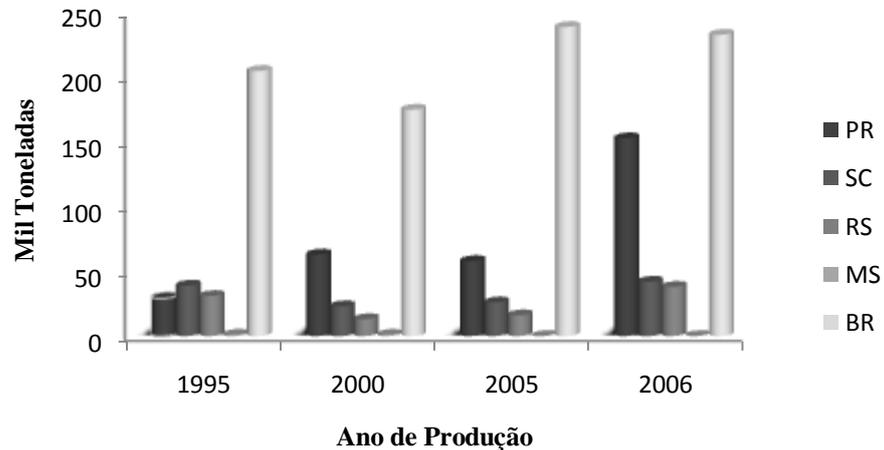


Figura 2 – Produção de erva-mate dos principais estados brasileiros, nos anos de 1995, 2000, 2005 e 2006, comparativamente ao total nacional.

Fonte: IBGE (2008).

A cultura de erva-mate constitui uma excelente geração de emprego e de renda, especialmente entre os médios e pequenos produtores rurais. Tal cultura forma um dos sistemas agroflorestais característicos da região sul do Brasil. É uma espécie perene bastante apreciada em todo Brasil na forma de bebidas, insumos para alimentos, produtos de uso e higiene pessoal. Depois do Uruguai, os maiores mercados compradores em potencial são Alemanha, Espanha, Itália, Estados Unidos (BOGUSZEWSKI, 2007), Canadá e Japão (ANDRADE, 1999), além do Oriente Médio, especialmente a Síria, sendo exportada sob diversas formas: cancheada, beneficiada, solúvel e em extrato/essência/concentrado (GOVERNO DO PARANÁ, 2007). No ano de 2008 foi fundada a Associação Brasileira da Indústria de Exportadores de Erva-Mate (ABIMATE) que, utilizando os serviços da Apex-

Brasil (Agencia Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos), vem ampliando o mercado no exterior, principalmente nos países do Oriente Médio (ABIMATE, 2010).

Problemas ainda são apontados por ervateiros no que diz respeito à silvicultura como novas formas e períodos de podas, adubação, correção do solo, doenças e pragas; ao social como à mão de obra e à comercialização (WENDT; FRIEDRICH, 2010). Salienta-se que no Brasil a maior parte da produção é extrativista, demonstrando que a atividade ainda é muito dependente de ervais nativos (MARTINS, 2009). Em um estudo desenvolvido junto às ervateiras que estão instaladas na área de abrangência da 26 Secretaria de Desenvolvimento Regional (SDR) do Estado de Santa Catarina foi observado que 80% da erva-mate produzida é proveniente de plantios nativos e 20% de ervais plantados (WENDT; FRIEDRICH, 2010). E ainda, por conta da variação natural das condições ambientais e do manejo dos ervais ocorre uma diferenciação da matéria-prima (MERCOMATE, 1993). Assim, por meio de técnicas que apresentem potencial no rejuvenescimento de indivíduos adultos superiores geneticamente será possível produzir matéria-prima uniforme, além de se ampliar a utilização de ervais plantados.

## **2.2 Técnicas para Avaliação de Diversidade Genética**

Os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta importante na manipulação do germoplasma utilizado em programas de melhoramento genético, por meio da caracterização molecular, comparação entre indivíduos, identificação de duplicatas, além de possibilitar a classificação do germoplasma em grupos de interesse para os diferentes programas (EICHENBERG et al., 2000). Atualmente, há inúmeros tipos de marcadores moleculares que se diferem quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, ao custo, a facilidade de uso, a consistência e a repetibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que surgiu na década de 80 e possibilita replicar sequências de DNA em condições controladas a partir de um pequeno par de fragmentos chamados iniciadores. Isso é possível por meio das variações alternadas e cíclicas de temperatura, que permitem a abertura da fita dupla de DNA, pareamento dos iniciadores e cópia da fita dupla original pela incorporação de nucleotídeos nas fitas complementares. Assim, uma determinada sequência de DNA é amplificada em progressão geométrica, tornando possível a sua visualização em gel de eletroforese em forma de uma banda (MULLIS; FALOONA, 1994). Contudo, para alguns tipos de análises, a reação de PCR representava um fator limitante, uma vez que necessita do prévio conhecimento das duas

extremidades da sequência de DNA que se deseja amplificar. Para contornar este problema surgiu, na década de 90, uma técnica que utiliza apenas um iniciador decâmero na reação de PCR. Tal mudança possibilitou que a amplificação ocorresse ao acaso nos seguimentos de DNA do genoma. A amplificação ocorre em função da probabilidade de após a abertura da fita dupla de DNA, existir no genoma uma sequência complementar ao iniciador em uma das fitas e, a uma distância que possa ser percorrida pela polimerase, uma outra sequência complementar ao iniciador da fita oposta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A técnica, desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos, foi patenteada com o nome mais comumente utilizado, RAPD (ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente). Diferentemente das demais técnicas de PCR, a RAPD utiliza um único iniciador composto por 10 pares de bases de sequências arbitrárias com, no mínimo, 50% de conteúdo GC (CRUZ; MILACH, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores RAPD possuem natureza binária e segregam como alelos mendelianos dominantes, havendo apenas dois fenótipos moleculares, presença ou ausência de bandas. O polimorfismo detectado por RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização do iniciador. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação (VIEIRA et al., 2004). Portanto, a presença de um determinado marcador no padrão de bandas de dois indivíduos indica que ambos compartilham o mesmo alelo naquele loco, por outro lado, a ausência da banda representa o fenótipo recessivo, não sendo possível a distinção entre homozigoto e heterozigoto (ALMEIDA et al., 2001). Apesar dessas limitações, os marcadores RAPD apresentam boa aceitação para: construção de mapas genéticos, seleção indireta de outros caracteres, análise de estrutura genética de populações, identificação de regiões específicas do genoma, e caracterização de bancos de germoplasma ou coleções de recursos genéticos (VIEIRA et al., 2004).

## **2.3 Fatores que Influenciam na Propagação Vegetativa de Plantas Perenes**

### **2.3.1 Genótipo**

A habilidade de enraizamento das espécies florestais pode ser classificada da seguinte forma: espécies de fácil enraizamento, espécies com respostas crescentes ao enraizamento quando são proporcionadas condições adequadas de controle ambiental e manejo da fonte de propágulo vegetativo e aquelas espécies com resposta pequena ou nenhuma aos estímulos

para enraizamento (XAVIER, 2002). Além disso, estudos apontam para respostas diferenciadas ao enraizamento com relação às características genéticas de cada planta (WENDLING, 2002). Em miniestacas provenientes de brotação apical de mudas jovens de dez famílias de *Pinus taeda* foram obtidos percentuais de enraizamento que variaram de 42,9% a 98,2%, de acordo com a família e o tipo de substrato utilizado (ANDREJOW; HIGA, 2009). Testando-se o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus cloeziana* por meio de avaliações em clones oriundos de duas procedências (C12, C13 e C9, C10, C11, C14, C15) foi verificado um maior potencial ao enraizamento para os clones C9, C14 e C15, os quais responderam mais positivamente às menores dosagens do regulador de crescimento (ALMEIDA et al., 2007). Na avaliação da miniestaquia seriada em *Eucalyptus grandis* observou-se que a técnica foi mais eficiente no rejuvenescimento de clones com menor potencial de enraizamento (WENDLING; XAVIER, 2005). Para erva-mate, avaliando-se diferentes concentrações de AIB no enraizamento de estacas, foram constatadas diferenças significativas para o genótipo, sendo observado que algumas matrizes obtiveram enraizamento superior, com valores variando entre 14,8 e 26,5 % (PICHETH, 1997). Assim, observa-se que estacas de certas espécies enraízam mais facilmente do que as de outras, além de também existirem consideráveis discrepâncias quanto à capacidade de enraizamento entre árvores da mesma espécie (KRAMER; KOZLOWSKI, 1972).

### 2.3.2 Maturação ou Idade Fisiológica

Em plantas lenhosas existe um gradiente de maturação em direção à base da árvore (ZOBEL; TALBERT, 1984; ELDRIDGE et al., 1994), de modo que a maior juvenilidade da região basal deve-se ao fato de que esses meristemas formam-se em épocas mais próximas à germinação que os das regiões terminais, evidenciando a hipótese de que a maturação tem uma base celular (HARTMANN et al., 2002), onde o estado de maturação é em função das divisões celulares cumulativas (GREENWOOD; HUTCHISON, 1993). Assim, brotações laterais mais distantes do ramo central apresentam menores graus de juvenilidade do que aqueles mais próximos (HUANG et al., 1990). Existem algumas características relacionadas com a maturação, como mudanças no hábito de crescimento, forma e retenção das folhas, presença de espinhos, pigmentação, anatomia caulinar e foliar e vigor ao crescimento (WENDLING; XAVIER, 2005). Notoriamente, uma das mais consistentes expressões da maturação em plantas lenhosas está relacionada com a transição da alta para baixa capacidade de enraizamento de estacas caulinares e foliares (HACKETT, 1987; ELDRIDGE et al., 1994).

Desta forma, em algumas espécies lenhosas, estacas juvenis oriundas de sementes possuem fácil enraizamento, já plantas maduras podem apresentar maior dificuldade para enraizar, ou nem mesmo enraízam (ZOBEL; TALBERT, 1984).

Técnicas como a poda drástica, micropropagação, enxertia seriada e estaquia e miniestaquia seriadas (WENDLING; XAVIER, 2005) permitem reverter o estágio maduro para o juvenil das plantas (HACKETT; MURRAY, 1993). Com o intuito de comparar estacas de brotações do ano, provenientes de plantas de erva-mate com 13 anos de idade e estacas de rebrota provenientes de decepta realizada em árvores de 17 anos de idade, Bitencourt et al. (2009) verificaram que as estacas provenientes de rebrota, compostas de material rejuvenescido, obtiveram maior porcentagem de enraizamento (65,50%), assim como maior número de raízes (13,20 raízes/estaca) e maior comprimento médio das três maiores raízes (27,78mm/estaca) quando comparadas àquelas provenientes de brotações do ano (8,50% de enraizamento; 2,27 raízes e 4,45mm; respectivamente). Isso indica que o rejuvenescimento dos ramos é eficiente para otimizar o enraizamento das estacas.

### 2.3.3 Reguladores de Crescimento

Os reguladores de crescimento, especialmente as auxinas, são normalmente utilizados em trabalhos de propagação, uma vez que proporcionam maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade no enraizamento (HARTMANN et al., 2002). As concentrações utilizadas destes reguladores variam conforme a espécie, o clone, o estado de maturidade dos propágulos e a forma de aplicação. Observa-se que a utilização de algumas técnicas, como a miniestaquia e a microestaquia a partir de propágulos rejuvenescidos, tem proporcionado a diminuição e até mesmo a eliminação do uso destes reguladores de crescimento (XAVIER; COMÉRCIO, 1996; WENDLING, 1999; TITON, 2001; XAVIER et al., 2001). Na propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por meio de estaquia de brotações obtidas por decepta de árvores de cinco anos de idade, a não utilização de AIB proporcionou, para a maioria das características avaliadas, melhores respostas, sendo que para as de 15 anos de idade, a utilização de AIB favoreceu o enraizamento (ALMEIDA et al., 2007).

## 2.4 Propagação Vegetativa por Estaquia e Miniestaquia

A propagação vegetativa é um processo fundamentado no princípio da totipotência, que se baseia na capacidade de regeneração de órgãos vegetais (raízes, caules e folhas) se recomporem, quando cortados e colocados em condições favoráveis, dando origem a um novo indivíduo com características idênticas às de seu genitor (HARTMANN et al., 2002). Assim, um dos principais objetivos da propagação vegetativa é possibilitar a multiplicação de árvores que apresentam características superiores (THORPE et al., 1991).

Em programa de silvicultura clonal, a seleção da árvore matriz com características superiores é geralmente realizada na fase adulta (ALMEIDA et al., 2007). Sendo assim, um dos principais obstáculos da propagação vegetativa é o enraizamento de propágulos maduros (ALFENAS et al., 2004), sendo muitas vezes necessário rejuvenescer o material propagativo antes do enraizamento (XAVIER et al., 2009). A idade fisiológica se refere aos aspectos negativos da idade, tais como a perda de vigor, que não coincide precisamente com a idade cronológica, que se refere ao tempo decorrido desde a germinação (GOMES, 1987). Além disso, dentro de uma mesma árvore, existem zonas que mantêm por mais tempo a juvenilidade e são suscetíveis de serem estimuladas para a produção de material vegetativo fisiologicamente juvenil (BONGA; VON ADERKAS, 1992).

Para espécies do gênero *Eucalyptus* o enraizamento de propágulos maduros não constitui mais um obstáculo e a estaquia está bem estabelecida. As plantas selecionadas na fase adulta são podadas para a emissão de brotos, os quais são estaquiados, micropropagados ou enxertados (WENDLING, 2004). Já para erva-mate, a falta de métodos eficientes de rejuvenescimento de material adulto ainda constitui-se um limitante para a propagação vegetativa em nível comercial (WENDLING et al., 2007), onde os valores médios de enraizamento da espécie em relação à estaquia convencional situam-se em torno de 17 % (GRAÇA et al., 1988). Além disso, existe variação com relação ao potencial de enraizamento entre as árvores de erva-mate (STURION; RESENDE, 1997). A miniestaquia é uma variação da técnica de estaquia, desenvolvida para espécies florestais na metade da década de 90, que se baseia na utilização de brotos retirados de plantas propagadas pelo método de estaquia convencional (WENDLING et al., 2005). O método consiste na poda do ápice das mudas que, em intervalos variáveis, emite brotos que são enraizados para a produção de novas plantas. Assim, a parte basal da muda podada constitui uma minicepa, que fornecerá brotos os quais serão utilizados para a confecção das miniestacas, sendo o conjunto das minicepas denominado minijardim clonal. Em relação à técnica de estaquia convencional, a miniestaquia

apresenta uma série de vantagens, entre elas, a eliminação do jardim clonal de campo; a maior facilidade de controle de patógenos e das condições nutricionais e hídricas no minijardim clonal; a maior produtividade, uma vez que as operações de manejo do minijardim clonal, coleta e confecções de miniestacas são mais fáceis e rápidas de serem executadas; a maior produção de propágulos por unidade de área e em menor unidade de tempo; a necessidade de menores dosagens ou até a eliminação do uso de fitoreguladores; a melhor qualidade do sistema radicular em termos de vigor, número, uniformidade e volume de raízes (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003).

Os minijardins clonais têm sido amplamente empregados pelas principais empresas florestais, especialmente na produção comercial de mudas de *Eucalyptus*, possibilitando a formação de plantios clonais de alta produtividade e uniformidade (ASSIS, 1996). No que diz respeito a espécies nativas com valor econômico, alguns trabalhos vêm sendo realizados. A avaliação de eficiência da técnica de miniestaquia na propagação vegetativa de material juvenil de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan mostrou-se eficiente tecnicamente, não necessitando do uso de AIB no enraizamento das miniestacas (DIAS et al., 2012). A avaliação da técnica de miniestaquia como método de propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.) também mostrou-se tecnicamente viável, chegando a 79% de sobrevivência aos 120 dias de idade das mudas, sendo que a aplicação do AIB proporcionou melhores resultados (XAVIER et al., 2003). No que diz respeito à miniestaquia da erva-mate, as técnicas de manejo do ambiente de propagação, a dificuldade no manejo da nutrição e também no transplante das estacas após o enraizamento ainda não estão bem elucidados (WENDLING et al., 2007).

### 3 IDENTIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DE CLONES DE ERVA-MATE POR MARCADORES RAPD

#### 3.1 Introdução

A variabilidade genética só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada, sendo a descrição das introduções ou acessos fundamental para manutenção e exploração do potencial de utilização das coleções. A caracterização pode ser feita por marcadores combinando com descritores morfológicos (SINGH, 2001). Além disso, a identificação de duplicatas é considerada um passo importante no desenvolvimento de uma coleção nuclear capaz de representar com confiabilidade, a variabilidade genética disponível da espécie, otimizando a melhor condução dos trabalhos pelos melhoristas e tornando o germoplasma mais acessível a todos os usuários (FERREIRA et al., 2011).

Dentre as técnicas disponíveis para estudos moleculares, a ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD) (WILLIAMS et al., 1990) é relativamente simples, rápida e de baixos custos e tem boa aceitação para a caracterização de bancos de germoplasma ou coleções de recursos genéticos (VIEIRA et al., 2004). Diferentemente das demais técnicas de Reação em Cadeia Polimerase (PCR), a técnica de RAPD utiliza um único iniciador composto por 10 pares de bases de sequências arbitrárias com, no mínimo, 50% de conteúdo GC (CRUZ; MILACH, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Na reação de amplificação, estes iniciadores, quando submetidos a condições apropriadas de temperatura (37 a 42°C), se hibridizam com sequências genômicas complementares. Para que ocorra amplificação é necessário que existam no genoma dois sítios complementares ao iniciador, localizados em direções opostas e distantes entre si, no máximo, 3.000 pb. Como a sequência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua sequência e, por isso, revelar vários locos. Os fragmentos amplificados, por sua vez, são separados em um gel de poliacrilaminada ou agarose, e visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo sob luz UV (LOPES et al., 2002).

A utilização da técnica de marcador RAPD foi eficiente ao analisar a diversidade genética de 22 acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), os quais compunham a Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE. Para a caracterização da variabilidade foram utilizados 60 locos polimórficos, onde, pela análise de agrupamento verificou-se a formação de dois grupos e quatro subgrupos, além de elevada variabilidade

genética entre os acessos. Também foi possível constatar a não existência de acessos redundantes no germoplasma (GUIMARÃES et al., 2007). Na comparação da diversidade genética em espécies de jabuticabeiras, utilizando marcadores RAPD, os 11 iniciadores selecionados geraram 45 bandas polimórficas, sendo que os iniciadores mais polimórficos foram aqueles que geraram as melhores imagens no gel de agarose (PEREIRA, 2003). Ainda, a utilização da técnica também foi eficiente na identificação de acessos duplicados pertencentes ao banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura (FERREIRA et al., 2011). Em erva-mate foi comparada a variabilidade genética existente em populações de plantas adultas e jovens com o uso de marcadores RAPD (KUBIAK et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de utilização de marcadores RAPD para identificar e separar clones de erva-mate.

### 3.2 Material e Método

Para a caracterização molecular, dez folhas jovens foram retiradas de dez clones de erva-mate utilizados nos estudos de propagação no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Foram estudados seis clones oriundos da cultura de embriões (CE1, CE3, CE5, CE15, CE23, CE25) e quatro clones oriundos de estaquia convencional (FR6, FR7, FR10 e FR52), que estão sendo mantidos em minijardim clonal. O material recém coletado foi armazenado em tubos falcon, devidamente identificados, os quais possuíam sílica, a fim de evitar o murchamento e oxidação do DNA (Figura 3).

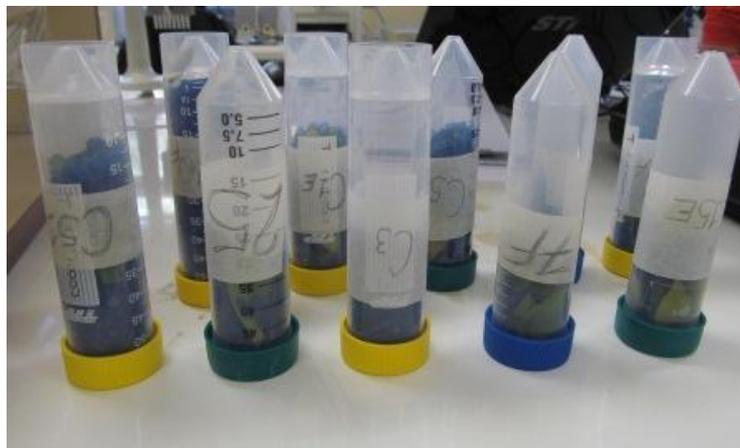


Figura 3 – Folhas jovens de erva-mate em tubos falcon com sílica. Santa Maria, RS, 2012.

O isolamento total do DNA de cada clone foi efetuado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Porto Alegre. Inicialmente foi testado o método de extração utilizado no próprio laboratório, por ser amplamente utilizado em diversas espécies. O processo básico consistiu na maceração de quantidades iguais de folhas de cada planta em nitrogênio líquido dentro de eppendorfs; adição de tampão de extração (2% CTAB, 2002  $\mu$  L NaCl %5M, 286  $\mu$ L EDTA, 715 $\mu$ L Tris 0,1M, 286g PVP 1%, pH 8,0); desproteinização com clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico 24:1); precipitação com isopropanol e lavagem com etanol; ressuspensão em 30  $\mu$ L TE pH 8,0. A quantificação do DNA extraído foi realizada em espectrofotômetro UV, a 260nm, e confirmação da integridade do mesmo em gel de agarose a 1% em cuba de eletroforese horizontal.

Realizaram-se as reações de amplificação utilizando o protocolo estabelecido por Ferreira e Grattapaglia (1998) adaptado para milho. As amplificações, em um volume final de 13 $\mu$ L, continham: 3 $\mu$  L de DNA genômico e 3  $\mu$  L de iniciador. Para o restante dos reagentes foi preparado um “mix”, contendo Tampão 10 x, MgCl<sub>2</sub> 50mM; dNTPs 10 mM; BSA purificado 10 mg/ml, Taq polimerase 5U/ $\mu$ L e água estéril para que se completasse o volume final da reação. Controles foram feitos com DNA genômico do clone CE52, o qual nos primeiros pilotos hibridizou-se com o iniciador OPP16. No total foram testados 25 iniciadores.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Programmable Thermal Controller, Modelo PTC100 TM), no qual as amostras foram submetidas a ciclos de amplificações, usando-se um programa composto por 44 ciclos, sendo cada ciclo formado de uma etapa de desnaturação a 94 °C, durante 1'30"s, uma etapa de anelamento a 35,5 °C por 1', uma etapa de extensão a 72 °C por 2', seguida de uma etapa de alongamento a 72 °C por 10', finalizando com 4°C, por tempo indeterminado. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese, a uma migração de 110 V por 2 horas, em gel de agarose a 2,5% contendo brometo de etídeo, imerso em tampão TBE 0,5x. O gel foi então fotografado com câmara digital. O marcador DNA Ladder-1 Kb, PLUS, foi utilizado como padrão para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados, os quais foram visualizados sob luz ultravioleta. As bandas geradas no gel foram avaliadas de maneira binária, 0 ausência da banda e 1 presença da banda. Aplicou-se o índice de Jaccard na matriz, por meio do programa R (R Development Core Team, 2006), o qual gerou o dendrograma de similaridade.

### 3.3 Resultados e Discussão

O protocolo de extração de DNA foi eficiente na extração de DNA de erva-mate, não sendo observada a presença de contaminantes. A quantidade de DNA obtida em cada amostra foi satisfatória para os trabalhos (Tabela 1). Não foi observado arrastes de DNA nas amostras indicando que o ambiente onde o material de extração foi armazenado propiciou condições adequadas para manter a qualidade do mesmo.

Tabela 1: Quantidade de DNA extraída de dez clones de erva-mate. Santa Maria, RS, 2012.

Clone	Quantidade de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )
CE1	206,9
CE3	615,6
CE5	275,4
CE15	367,6
CE23	704
CE25	199,2
FR6	355,7
FR7	412,7
FR10	2.316
FR52	1.329

Dos 25 iniciadores de RAPD (Tabela 2) utilizados nas amostras de DNA a fim de identificar marcadores polimórficos para a separação dos clones, quatro, da série OPP (Operon Technologies Inc.) amplificaram 27 locos, a saber: OPP-03, OPP-06, OPP-15 e OPP-16, cujas sequências (5'–3') eram: GTGATACGCC; GTGGGTTGA, GGAAGCCAAC e CCAAGCTGCC, respectivamente. Em jabuticabeira, 11 marcadores RAPD geraram 45 locos polimórficos, sendo os mais polimórficos aqueles que geraram as melhores imagens no gel (PEREIRA, 2003).

Tabela 2: Séries de Iniciadores RAPD utilizados nas amostras de DNA. Santa Maria,RS,2012.

OPP	OPP	OPP	OPE	OPL	OPY
02	08	17	06	12	04
03	12	18	09	13	07
04	14	20	10	16	
06	15		11	17	
07	16		13	18	

As amostras no gel apresentaram similaridade variando entre 0,15 e 0,7 (Figura 4). Em um estudo sobre a diversidade genética em plantas adultas e jovens de erva-mate, utilizando marcadores RAPD os valores de diversidade pelo índice de Jaccard variaram entre 0,53 e 0,89, sendo considerada uma variabilidade significativamente alta (KUBIAK, 2010). Para este trabalho, comparativamente a estes valores, pode-se inferir que existe uma grande variabilidade genética entre os clones avaliados.

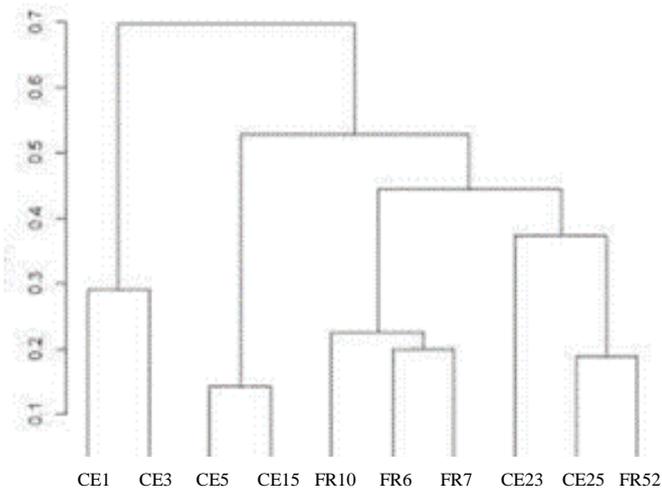


Figura 4 – Dendrograma de similaridade obtido por marcadores RAPD das relações genéticas entre dez clones de erva-mate com base na similaridade de Jaccard. Santa Maria, RS, 2012.

Observou-se que os clones CE5 e CE15 foram os mais semelhantes entre si (0,15) seguidos por CE25 e FR52 (0,2), os quais formaram um grupo com dissimilaridade genética acima de 0,5. Os clones CE5 e CE15 são oriundos do cultivo de embriões, vindos do mesmo lote de sementes e, portanto, eram esperados que fossem mais similares entre si. Os clones FR6, FR7 e FR10, também possuem a mesma origem, sendo todos de estquia convencional

de matrizes de um mesmo povoamento. Os clones CE23 e CE25 advêm de cultura de embriões e o clone FR52 é oriundo de estaquia convencional. A similaridade entre CE5 e CE15 pode ser explicada pela mesma origem do material, bem como os clones FR7 e FR6. Não houve formação de bandas monomórficas entre este conjunto de clones, o que descarta a existência de duplicatas (Figura 5). Para os clones CE3 e FR52, observou-se a formação de bandas monomórficas entre eles com a utilização do iniciador OPP16 (Figura 5). Esses resultados mostram que os iniciadores utilizados foram polimórficos o suficiente para diferenciar os clones de erva-mate. Pode-se inferir que a metodologia utilizada foi eficaz para a discriminação dos clones de erva-mate que estão sendo utilizados em estudos de miniestaquia no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas da Universidade Federal de Santa Maira. Novos estudos devem ser conduzidos para a identificação e seleção de iniciadores eficazes para a discriminação de clones de erva-mate e identificação de redundância no banco de germoplasma.

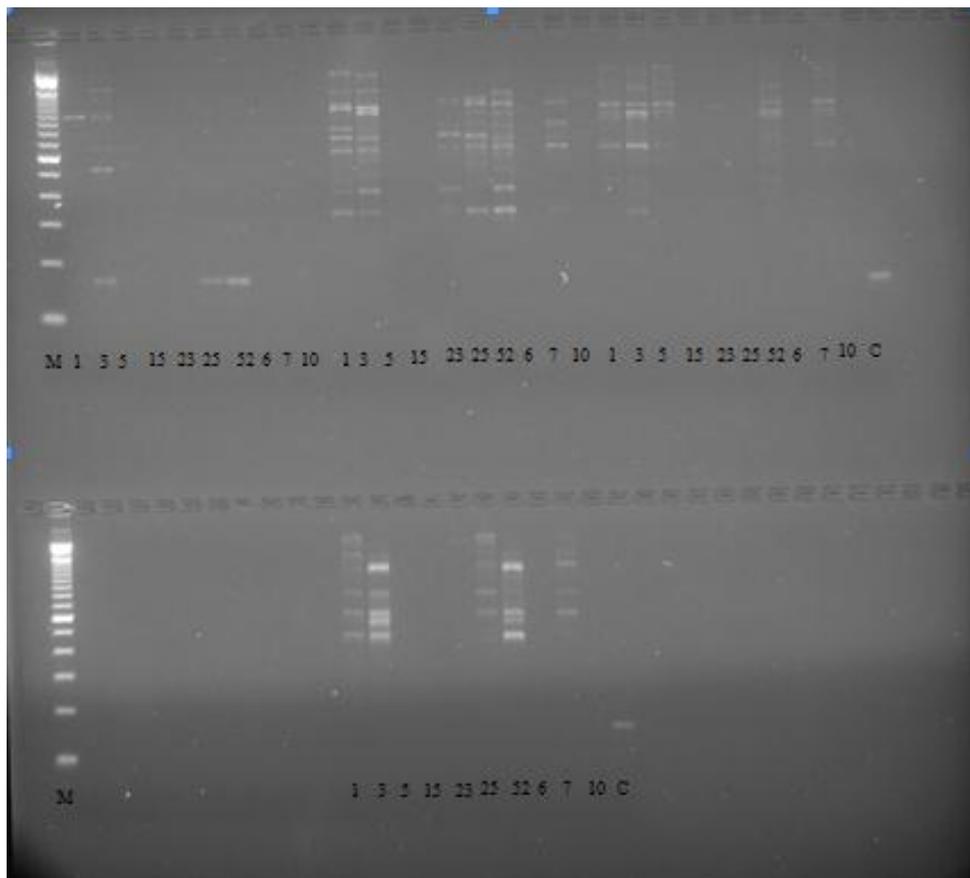


Figura 5 – Padrão de bandas RAPD produzidas pelos iniciadores OPP 03, OPP 06, OPP 15, OPP 20 e OPP 16 em dez clones de erva-mate, C: controle. Santa Maria, RS, 2012.

### 3.4 Conclusão

A técnica RAPD é eficaz para a separação de clones de erva-mate, sendo que os iniciadores OPP-03, OPP-06, OPP-15 e OPP-16 foram os mais polimórficos.

## 4 ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DA REBROTA DE CEPAS DE PLANTAS ADULTAS DE ERVA-MATE

### 4.1 Introdução

A estaquia é uma técnica que consiste em promover o enraizamento de partes da planta, como ramos, raízes, folhas e até mesmo fascículos, no caso de *Pinus* spp (PAIVA; GOMES, 1995), porém não é viável técnica e economicamente para todas as espécies florestais (ASSIS, 1996). Para espécies do gênero *Eucalyptus*, a estaquia já está bem estabelecida. As plantas selecionadas na fase adulta são podadas para a emissão de brotos, os quais são estaquiados, micropropagados ou enxertados (WENDLING, 2004). No caso da erva-mate, os índices de enraizamento são de aproximadamente 17 % (GRAÇA et al., 1988), o que limita a sua utilização comercial (WENDLING et al., 2007). Além disso, o índice de enraizamento é variável, sendo que 27 das 30 árvores selecionadas de erva-mate tiveram estacas enraizadas, com percentuais entre 1,1 e 60,1 % (STURION; RESENDE, 1997). O ácido indol butírico (AIB) é muito utilizado para promover o enraizamento de estacas, cujos valores são muito variáveis, como os encontrados por Picheth (1997) de 14,8 a 26,5% entre plantas matrizes de erva-mate.

Uma das principais causas do baixo índice de enraizamento de estacas de árvores adultas é a falta de juvenilidade dos explantes, sendo importante utilizar técnicas de rejuvenescimento das estacas para viabilizar técnica e economicamente a estaquia da erva-mate (WENDLING, 2004). Técnicas como a poda drástica, micropropagação e enxertia, estaquia e miniestaquia seriadas (WENDLING; XAVIER, 2005) permitem reverter o estágio maduro para o juvenil das brotações (HACKETT; MURRAY, 1993). O maior percentual de enraizamento (65,5%), maior número (13,2) e comprimento (27,8 mm) das três maiores raízes foram obtidos com estacas provenientes de rebrota da decepa de árvores com 17 anos de idade comparados com estacas oriundas de brotação do ano de plantas com 13 anos de idade, que apresentaram 8,5% de enraizamento, 2,27 raízes por estaca com um 4,4 mm de comprimento (BITENCOURT, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de AIB no enraizamento de estacas de gema única de brotações oriundas da poda drástica de quatro clones de erva-mate.

## 4.2 Material e Método

O experimento foi conduzido no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP), do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. Plantas com aproximadamente 15 anos de idade de quatro clones de erva-mate foram decepadas para induzir a emissão de brotações. Aos 12 meses as brotações apresentavam entre 15 e 80 cm, que foram coletadas para o preparo das estacas de gema única com uma folha recortada pela metade (Figura 6).



Figura 6 – Brotações de erva-mate oriundas de poda drástica, representativas do material utilizado para a preparação das estacas de gema única. Santa Maria, RS, 2012.

A base de cada estaca foi tratada com 0, 1.500, 3.000, 4.500 ou 6.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB por 10 s e estaqueadas em bandejas de 128 alvéolos contendo substrato. O substrato foi composto de areia grossa, vermiculita média e substrato comercial (1:1:1). Em seguida o material foi levado para câmara úmida para o enraizamento. Aos 30 dias avaliou-se a percentagem de sobrevivência. Aos 90 dias avaliou-se a percentagem de sobrevivência, de enraizamento e de estacas brotadas, o número de raízes e folhas e o comprimento de brotos.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de quatro clones e cinco doses de AIB, com quatro repetições de cinco miniestacas. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias de clones comparadas pelo teste de Tukey e de doses de AIB por regressão polinomial, em nível de 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 1999).

### 4.3 Resultados e Discussão

Não houve interação entre clones e doses de AIB para a variável percentagem de sobrevivência aos 30 e 90 dias (Tabela 3). Também não houve interação para a percentagem de enraizamento e número de raízes. Para a percentagem e comprimento de brotos e número de folhas foi encontrada interação de clones de erva-mate e doses de AIB. Para a percentagem de sobrevivência aos 30 e 90 dias e para a percentagem e comprimento de brotos foram observadas diferenças entre clones. A menor sobrevivência foi observada com o clone FR1 aos 30 dias, sendo que os clones FR2 e FR3 apresentaram as maiores percentagens de sobrevivência aos 90 dias em câmara úmida (Tabela 4). A aplicação de diferentes concentrações de AIB também afetou a sobrevivência das estacas de erva-mate aos 90 dias (Figura 7).

Tabela 3: Valores dos quadrados médios e significância para a percentagem de sobrevivência, de enraizamento e de brotação, para o número de raízes e folhas e para o comprimento de brotações de estacas de erva-mate submetidas à aplicação de diferentes dosagens de AIB. Santa Maria, RS, 2012.

Fonte de Variação	Sobrev. 30 dias (%)	Sobrev. 90 dias (%)	Raízes (%)	Raízes (n°)	Brotos (%)	Brotos (cm)	Folhas (n°)
Clone	2.276667*	4.621000*	4.726667*	56.589000*	3.871667*	2.745490*	59.916000*
AIB	0.10375 <sup>ns</sup>	0.607000*	0.460000 <sup>ns</sup>	5.123000 <sup>ns</sup>	1.685000*	0.400930*	13.087000*
Clone*AIB	0,05634 <sup>ns</sup>	0.24350 <sup>ns</sup>	0.277500 <sup>ns</sup>	5.606500 <sup>ns</sup>	0.805833*	0.483807*	5.955167*
Resíduo	0.069247	0.164323	0.213438	4.405365	0.184427	0.153785	2.719167
Média	90	73	42	1,4	37	0,2	0,9
CV(%)	29	55	40	47	36	31	28

\*significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não-significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4: Percentagem de sobrevivência de clones de erva-mate aos 30 e 90 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2012.

Clone	Sobrevivência aos 30 dias (%)	Sobrevivência aos 90 dias (%)
FR3	100 a*	88 a*
FR2	98 a	97 a
FR4	96 a	64,5 b
FR1	68 b	52 b
Média	90	73,2

\*Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

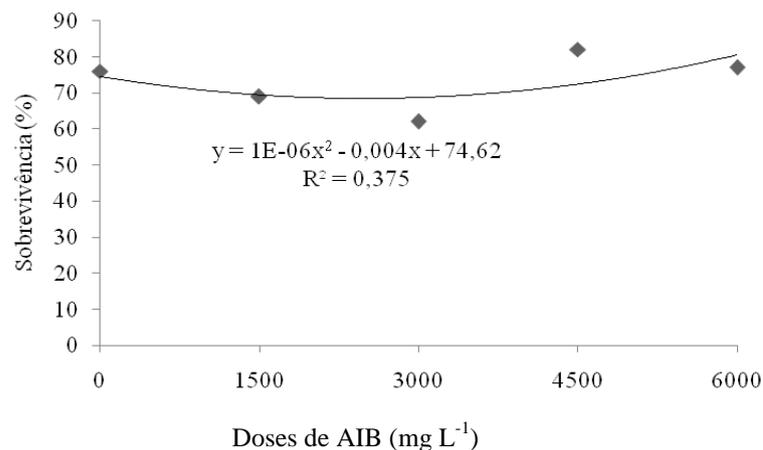


Figura 7 – Sobrevivência de estacas dos clones de erva-mate aos 90 dias em função da aplicação de diferentes dosagens de AIB. Santa Maria, RS, 2012.

As maiores percentagens de enraizamento e de número de raízes foram observadas nos clones FR2 e FR3 (Tabela 5). Para estas variáveis não houve variação entre doses de AIB, indicando que a aplicação desta auxina não resulta em maiores percentagens de enraizamento e nem de maior número de raízes. Estes resultados vão de encontro aos observados por Bitencourt (2009) que ao avaliar o percentual e o número de raízes de estacas oriundas de brotos de decepa também não observou efeito significativo das diferentes doses de AIB. Também confirmam que o AIB é desnecessário para incrementar o enraizamento de materiais juvenis ou rejuvenescidos (XAVIER; COMÉRCIO, 1996), pois tanto a percentagem de enraizamento quanto o número de raízes foi similar em estacas tratadas ou não tratadas com

AIB, provavelmente pelo conteúdo hormonal interno e a competência das estacas ao enraizamento (Figura 8).

Tabela 5 – Percentagem de enraizamento e número de raízes por estaca de gema única de clones de erva-mate aos 90 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2012.

Clone	Enraizamento (%)	Raízes (nº)
FR2	62 a*	2,4 a*
FR3	61 a	1,6 a
FR4	34 b	1,2 b
FR1	19 b	0,6 b
Média	42	1,4

\*Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

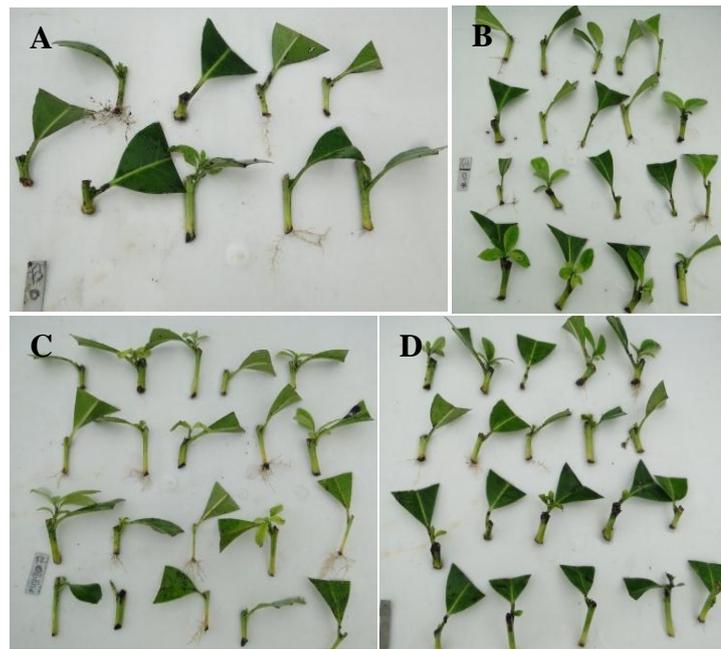


Figura 8 – Estacas enraizadas dos clones de erva-mate: (A) FR1 em 0 AIB, (B) FR4 em 0 AIB, (C) FR2 em 0 AIB e (D) FR3 em 0 AIB, aos 90 dias. Santa Maria, RS, 2012.

As doses de AIB aplicadas em estacas de gema única dos clones FR1 e FR4 não afetaram a brotação das estacas e nem o número de folhas produzidos, porém o aumento das doses de AIB afetou a percentagem de estacas brotadas e o número de brotos e de folhas por estaca dos clones FR2 e FR3 (Figura 9).

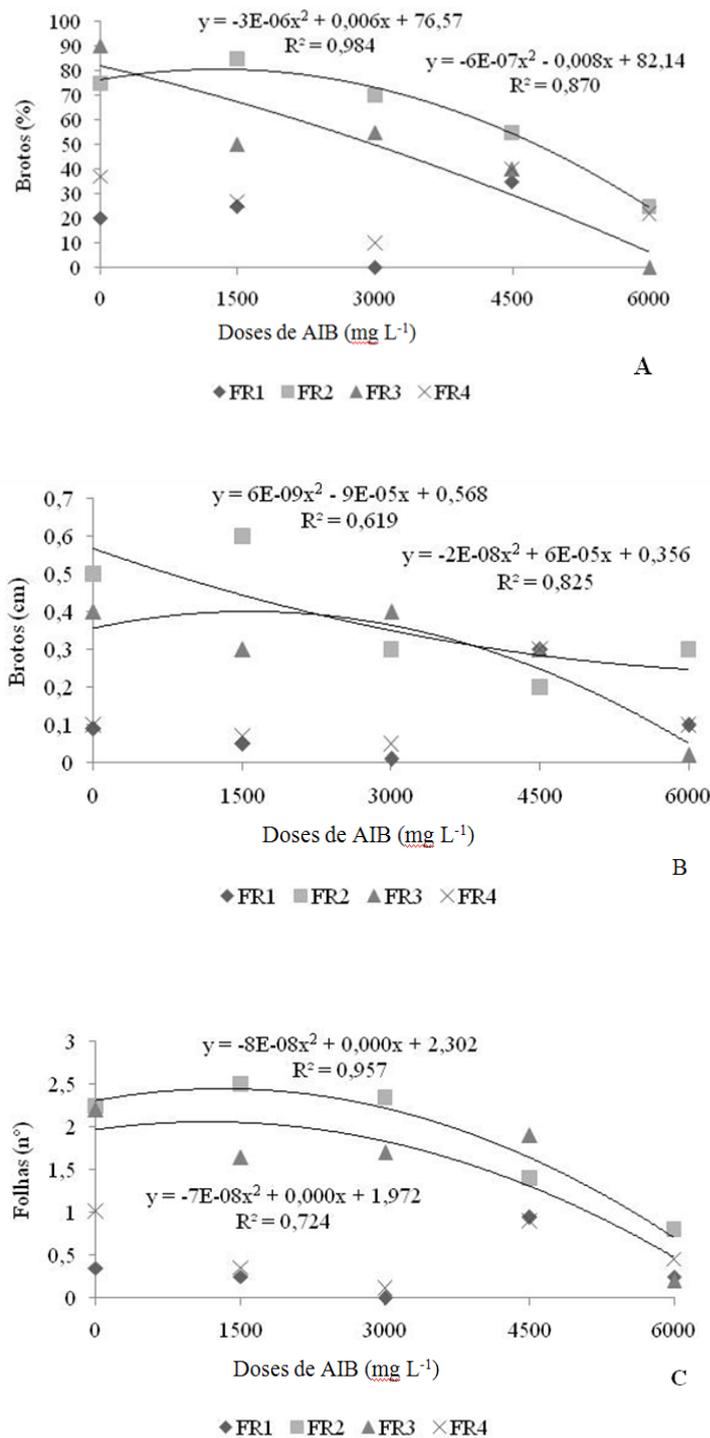


Figura 9 – Percentagem de brotos (A) e comprimento de brotos (B) e número de folhas (C) de estacas de gema única de clones de erva-mate aos 90 dias, em função da aplicação de diferentes doses de AIB. Santa Maria, RS, 2012.

Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Wendling e Xavier (2005). Onde clones rejuvenescidos pela miniestaquia não apresentaram incremento da parte aérea com a aplicação de AIB. Além disso, nos clones CC10 e CC15 foi observado um efeito inibitório a partir da dosagem de  $1.500 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB e, para o clone CC12, a partir de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB para esta variável.

Os resultados deste trabalho mostram claramente um efeito de clone sobre o enraizamento e a brotação de estacas de gema única de erva-mate, o que era esperado e já indicado na literatura. Também confirmam que estacas de brotações rejuvenescidas não requerem a aplicação de AIB para a obtenção de valores elevados (acima de 60%) de enraizamento. Assim, a viabilidade econômica de produção massal de mudas por estaquia de gema única depende do clone utilizado, mesmo a partir de brotações rejuvenescidas por decepta de árvores adultas. As mudas produzidas a partir de estacas de gema única dos clones FR2 e FR3 podem ser diretamente utilizadas para a formação de um minijardim clonal para a produção massal de mudas de erva-mate. Já para os clones FR1 e FR4, a miniestaquia seriada poderia ser utilizada para promover um maior rejuvenescimento antes da formação do minijardim clonal. É possível que a aplicação de AIB não afete nem mesmo a brotação das miniestacas após completar o rejuvenescimento, conforme observados nos clones FR2 e FR3. Portanto, a decepta de árvores adultas é uma técnica suficiente para o rejuvenescimento de clones de erva-mate, porém nem todos os clones atingem o nível necessário de rejuvenescimento, o que requer a sua complementação com a miniestaquia seriada.

#### **5.4 Conclusão**

Estacas de gema única de brotações oriundas da decepta de alguns clones de erva-mate são competentes para o enraizamento, o que dispensa o uso de ácido indol butírico.

## 5 ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE ERVA-MATE

### 5.1 Introdução

A miniestaquia surgiu do aprimoramento da técnica de estaquia com o intuito de contornar as dificuldades de enraizamento de alguns clones (XAVIER; WENDLING, 1998). O método consiste na poda do ápice das mudas que, em intervalos variáveis, emite brotos que serão enraizados para a produção de novas plantas. Assim, a parte basal da muda podada constitui uma minicepa, que fornecerá brotos para a confecção de miniestacas, sendo o conjunto das minicepas denominado minijardim clonal (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003). Dentre as vantagens em relação à técnica de estaquia convencional ressalta-se a redução de área para a formação do minijardim clonal, redução dos custos com coleta e transporte das brotações, maior eficiência em atividades de manejo do jardim clonal (irrigação, nutrição, manutenções e controle de pragas e doenças) e proporcionar maior qualidade, velocidade e percentual de enraizamento (XAVIER et al., 2003).

A miniestaquia tem propiciado a produção massal de mudas de clones de *Eucalyptus* spp. sem a aplicação de ácido indol butírico (AIB) ou sua utilização em doses como 2.000 mg L<sup>-1</sup> (WENDLING, 1999 e XAVIER et al., 2001). A utilização de mudas clonais possibilita a formação de plantios comerciais de alta produtividade e uniformidade (ASSIS, 1996). No entanto pouco se conhece sobre a miniestaquia como técnica de propagação vegetativa em espécies florestais nativas de valor econômico, como a erva-mate. Isto justifica a formação e o desenvolvimento de técnicas de manejo de minijardim clonais, bem como de avaliação da produção de mudas por miniestaquia a partir do resgate de plantas adultas de erva-mate por gema única de rebrota natural pós-fogo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de AIB no enraizamento de miniestacas de dois clones de erva-mate.

### 5.2 Material e Método

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

(UFSM). Para a formação do minijardim clonal foram utilizados dois clones (10FR e 52FR) resgatados de plantas adultas de erva-mate por estaquia de gema única de rebrota natural pós-fogo. Após enraizadas, as estacas foram cultivadas em substrato comercial em casa de vegetação por cinco meses para aclimatização e rustificação. As mudas foram transferidas para o sistema fechado de cultivo sem solo (Figura 11), que consiste de uma bandeja de polietileno preto, onde foi adicionada uma camada de sete centímetros de brita média para drenagem da solução. Uma tela fina de polietileno foi disposta entre a brita média e o substrato, que foi composto por uma camada de oito centímetros de areia grossa. As bandejas foram cobertas por plástico de dupla face e a solução nutritiva era drenada por dois orifícios localizados na parte frontal das bandejas (BISOGNIN, 2007). Em cada bandeja foram plantadas seis mudas de cada um dos clones avaliados.

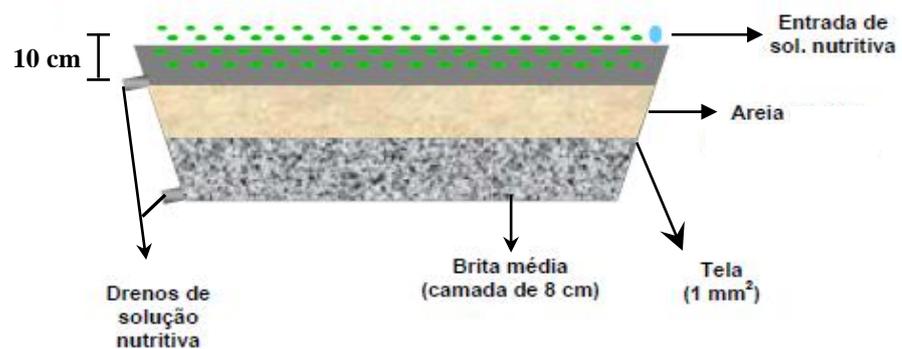


Figura 10 – Desenho esquemático do sistema sem solo, conduzido em bandejas de polietileno (55 x 34 x 15 cm), com fertirrigação realizada por subirrigação (BISOGNIN et al. 2007).

A solução nutritiva foi composta pelos seguintes nutrientes: 54,20 mg L<sup>-1</sup> de N na forma de nitrato; 69,90 mg L<sup>-1</sup> de N na forma de amônio; 16,28 mg L<sup>-1</sup> de P; 170,68 mg L<sup>-1</sup> de K; 161,40 mg L<sup>-1</sup> de Ca; 33,70 mg L<sup>-1</sup> de Mg; 79,65 mg L<sup>-1</sup> de S; 0,50 mg L<sup>-1</sup> de B; 0,50 mg L<sup>-1</sup> de Cu; 5 mg L<sup>-1</sup> de Fe; 1 mg L<sup>-1</sup> de Mn; 0,2 mg L<sup>-1</sup> de Zn; 0,07 mg L<sup>-1</sup> de Mo., diluída 50% (WENDLING et al., 2007). A solução ficou armazenada em recipiente com capacidade de 50L. Realizou-se uma irrigação diária com duração de 30 minutos, por meio de uma bomba submersa, acionada por controlador horário. Após uma semana para a adaptação das mudas ao sistema efetuou-se a poda do ápice a uma altura de aproximadamente 9 cm, formando as minicepas do minijardim clonal (Figura 12).



Figura 11 – Formação de minicepa por meio da recepa de mudas de erva-mate a aproximadamente 9 cm do colo. Santa Maria, RS, 2012.

A cada quatro semanas era efetuada a troca da solução nutritiva, sendo o pH ajustado a  $5,6 (\pm 1)$  e a condutividade elétrica para  $2,20 \text{ mS.cm}^{-1}$ . As épocas das coletas foram determinadas em função da existência de brotações com tamanho entre 15 e 20 cm (Figura 13 A). A partir dos brotos coletados foram confeccionadas miniestacas de gema única, mantendo-se uma folha recortada pela metade (Figura 13 B).



Figura 12 – Brotações recém coletadas de minicepas de erva-mate(A); confecção de miniestacas em gema única e folha recortada pela metade (B). Santa Maria, RS, 2012.

A porção basal das miniestacas foram tratadas com 0, 1.500 ou  $3.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB por 10s, sendo que no tratamento controle a base das miniestacas foram imersas somente em água. Em seguida foram estaqueadas em bandejas de 128 alvéolos contendo substrato, composto pela mistura de vermiculita média, areia e substrato comercial (1:1:1) e colocadas

em câmara úmida. Foram avaliados a percentagem de sobrevivência, de enraizamento e de brotação, o número de raízes e folhas e o comprimento dos brotos.

O experimento foi um fatorial (dois clones x três doses de AIB) no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco miniestacas. Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 1999).

### 5.3 Resultados e Discussão

Não houve interação entre clones e doses de AIB somente para a sobrevivência aos 60 dias, sendo que as doses de AIB afetaram somente o número de folhas (Tabela 6). A existência de interação indica que a resposta a aplicação de AIB varia entre clones de erva-mate. Cabe ressaltar que somente o número de folhas respondeu a aplicação de AIB e que, apesar da baixa percentagem média de enraizamento (16%), o aumento das doses de AIB não proporcionou o aumento do enraizamento.

Tabela 6: Valores dos quadrados médios e significância para a percentagem de sobrevivência, de enraizamento e de brotação, o número de raízes e folhas e o comprimento dos brotos de miniestacas de erva-mate submetidas a diferentes doses de AIB. Santa Maria, RS, 2012.

Fonte de Variação	GL	Sobrev. (%)	Raízes (%)	Raízes (n°)	Broto (%)	Broto (cm)	Folhas (n°)
Clone	1	0.033333*	0.408333 <sup>ns</sup>	0.084042 <sup>ns</sup>	0.675000 <sup>ns</sup>	0.456333 <sup>ns</sup>	0.365402 <sup>ns</sup>
AIB	2	0.858333 <sup>ns</sup>	0.058333 <sup>ns</sup>	0.001078 <sup>ns</sup>	0.258333 <sup>ns</sup>	0.946750 <sup>ns</sup>	1.688104*
Clone*AIB	2	0.258333 <sup>ns</sup>	0.758333*	0.621789*	0.925000*	2.911083*	1.592689*
Resíduo	114	0.207895	0.122368	0.137908	0.227632	0.757833	0.469678
Média		58	16	1,3	59	67	1,4
CV(%)		22,2	22,9	43,3	24,3	33,6	57,1

\*significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não-significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

O clone FR10 tratado com 3.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB apresentou a menor sobrevivência aos 60 dias em câmara úmida (Figura 14). Em condições similares, Brondani et al. (2008) obtiveram sobrevivência de miniestacas de três clones (A35, A21 e A7) de erva-mate tratados

com 3.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB obtiveram valores de sobrevivência aos 90 dias de 71,9%, 57,1% e 58,0%, respectivamente.

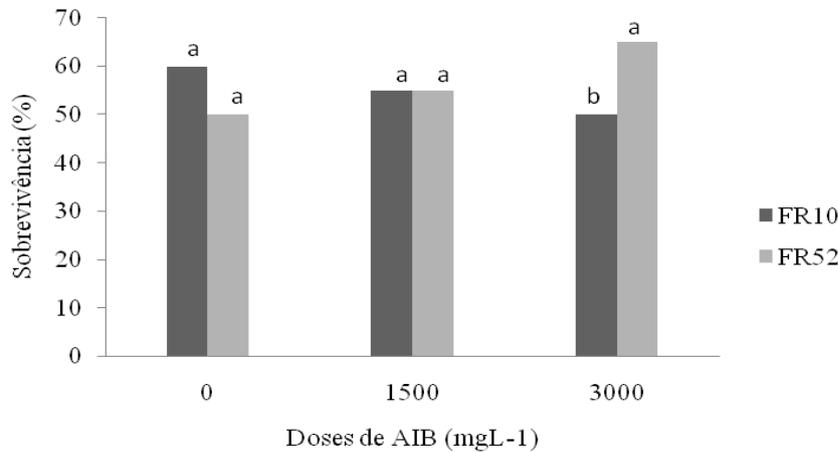


Figura 13 – Sobrevivência de miniestacas de dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.

O maior percentual de enraizamento (40%) e número de raízes por miniestaca (1,6) foram obtidos com o clone FR10, sem a aplicação de AIB (Figura 14). Para as três doses avaliadas, o clone FR10 foi superior aos clones FR52 em enraizamento, indicando que as miniestacas do clone FR10 apresentam maior competência ao enraizamento. Cabe ressaltar que nenhum dos clones respondeu à aplicação de AIB, já que não houve diferença significativa entre clones (Tabela 6).

O controle genético do enraizamento de miniestacas é conhecido na literatura e, portanto, era esperado encontrar diferença significativa mesmo entre dois clones apenas. Em miniestacas provenientes de brotação apical de mudas jovens de dez famílias de *Pinus taeda* foram obtidos percentuais de enraizamento que variaram de 42,9% a 98,2%, de acordo com a família e o tipo de substrato utilizado (ANDREJOW; HIGA, 2009). Almeida et al., 2007 ao testarem o enraizamento de miniestacas de clones de duas procedências (C12, C13 e C9, C10, C11, C14, C15) de *Eucalyptus cloeziana* verificaram um maior potencial ao enraizamento para os clones C9, C14 e C15, os quais também responderam a menores doses de AIB. Para miniestacas de erva-mate tratadas com 3.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, foi observado que houve diferença significativa entre os clones para o percentual de enraizamento, onde os valores encontrados foram de 62,5 % para o clone A35, 50% para o clone A21 e 44,6 % para o clone A7. Neste trabalho, foram encontradas diferenças entre clones, mas não entre doses de AIB

apesar de ter sido testada a dose de 3.000 mg L<sup>-1</sup>, o que pode ser considerado alto para miniestacas.

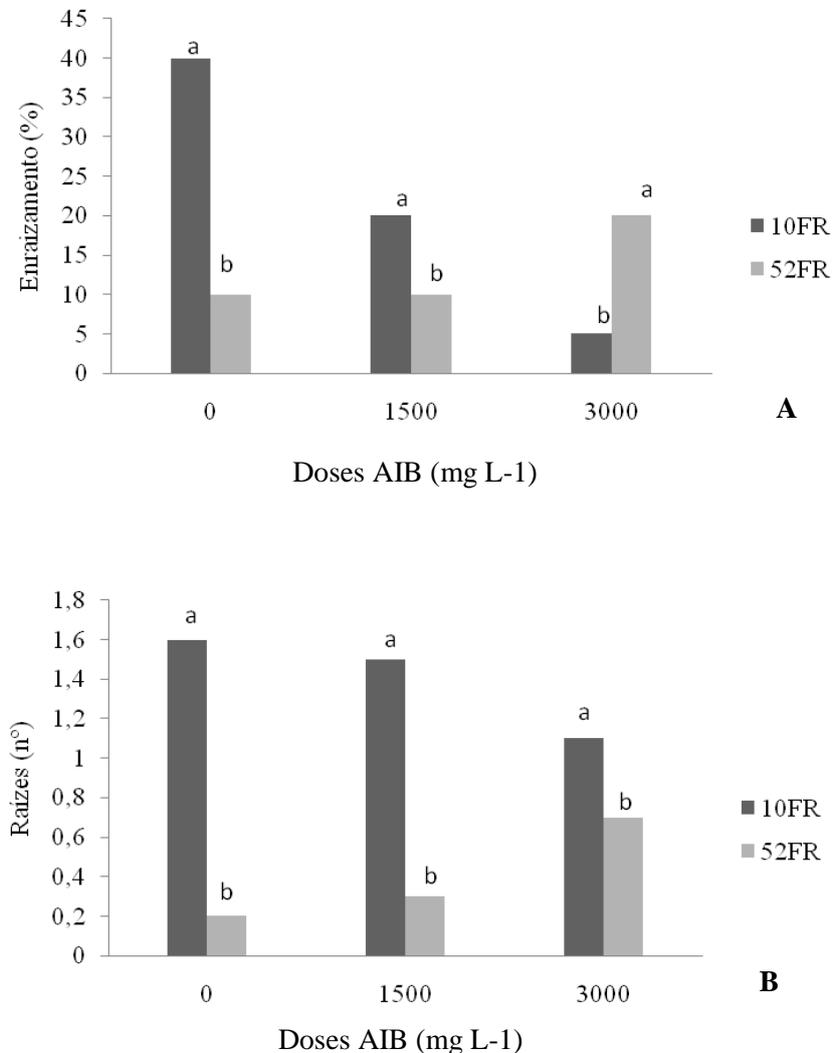


Figura 14 – Percentagem de enraizamento (A) e número de raízes (B) de miniestacas dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.

A maior percentagem de miniestacas brotadas e o menor comprimento das brotações foram observados com o clone FR52 (Figura 15 A). Esse fato poderia ser explicado em função do maior consumo das reservas na formação de raízes ou de brotos (CHALFUN et al., 1990; NICOLOSO et al., 1999) uma vez que o clone 10FR obteve a maior percentagem de enraizamento (Figura 15 B). Em condições semelhantes Brondani et al. (2008) também observaram, em três clones de erva-mate, que o clone A21 diferiu significativamente dos demais, com o menor valor de comprimento de brotos (0,70 cm).



Figura 15 – Brotações e folhas clone FR52 (A) e miniestacas enraizadas clone FR10, aos 60 dias. Santa Maria, RS, 2012.

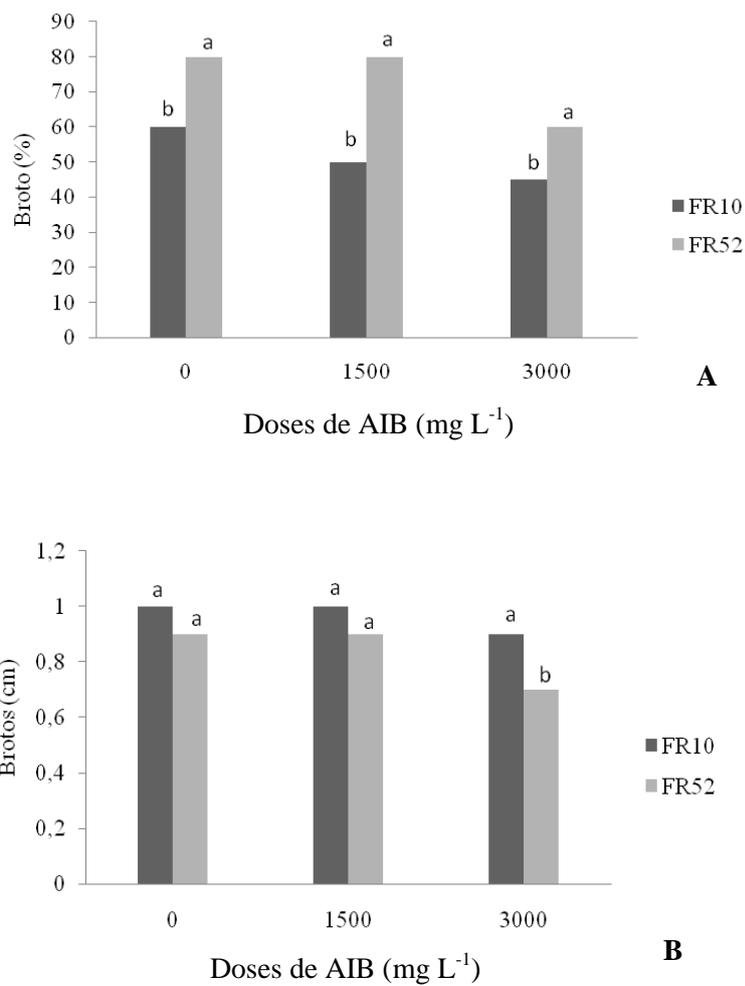


Figura 16 – Percentagem (A) e comprimento de brotos (B) de miniestacas dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.

O clone FR52 apresentou o menor número de folhas por miniestaca aos 60 dias quando tratado com 3000 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Figura 17), diferindo significativamente dos outros tratamentos. Não foi observada resposta positiva da aplicação do AIB sobre a parte aérea das miniestacas em todos os tratamentos. Mas, observou-se no clone FR52 que a aplicação de 3.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB teve efeito inibitório. A presença de folhas na miniestaca é importante para o processo de enraizamento no que diz respeito à produção de carboidratos durante a fotossíntese e também à produção de auxinas responsáveis pelos efeitos sobre o enraizamento (HARTMANN et al., 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004). Neste caso, as folhas se desenvolveram nas brotações, o que é importante para sustentar o crescimento das raízes.

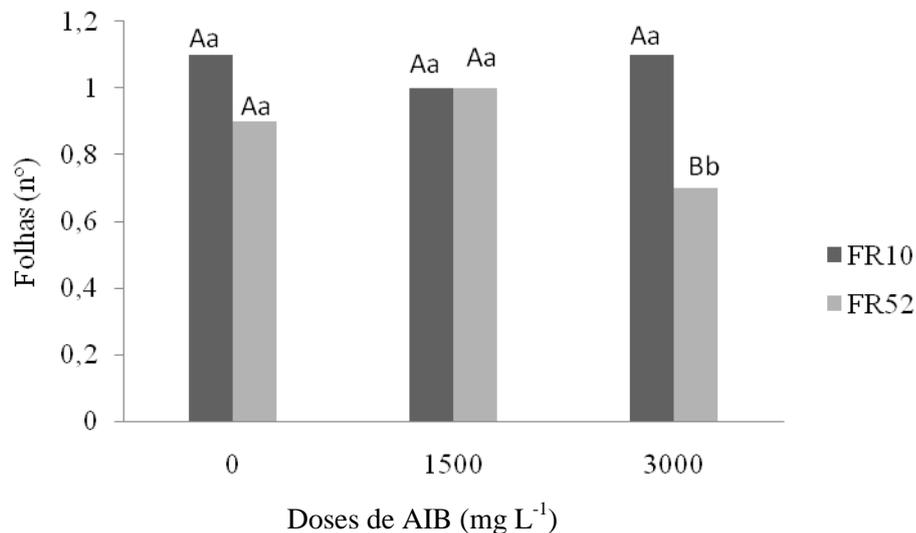


Figura 17 – Número de folhas de miniestacas dois clones de erva-mate aos 60 dias em câmara úmida. Médias de clone não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2012.

Entre os principais fatores que afetam o enraizamento de miniestacas estão o clone (com as condições fisiológicas da planta fornecedora e o tipo e juvenilidade do propágulo) e a demanda por auxinas exógenas, como o AIB (GREENWOOD; HUTCHISON, 1993; HARTMANN et al., 2002). A aplicação de AIB em miniestacas tem sido avaliado em espécies de *Eucalyptus*, cujos resultados tem apontado para a diminuição das doses, que variam entre 1.000 mg L<sup>-1</sup> e 3.000 mg L<sup>-1</sup> (WENDLING, 1999, WENDLING, 2000). Além disso, em trabalhos realizados com *Eucalyptus grandis* foi verificado que a aplicação de AIB não resultou em aumento do enraizamento e sobrevivência das miniestacas, inclusive com influência negativa em doses acima de 500 mg L<sup>-1</sup> de AIB em alguns clones para algumas

variáveis estudadas. Neste trabalho a aplicação de AIB, independente da dose, somente afetou o número de folhas por miniestaca, sendo que houve interação entre clones e as doses de AIB para o enraizamento e a brotação das miniestacas. As melhores respostas de enraizamento, tanto na percentagem quanto no número de raízes, foram obtidas com o clone FR10 sem a necessidade de AIB. Por outro lado, o clone FR52 apresentou as melhores respostas em brotação das miniestacas, indicando claramente uma diferença de competência em termos de resposta organogênica. Portanto, o clone FR10 apresenta maior competência para o enraizamento e o clone FR52 para a diferenciação de brotações adventícias. As miniestacas enraizadas do clone FR52 devem ser utilizadas para a formação de um novo minijardim clonal, pois a miniestaquia seriada é uma técnica utilizadas para o rejuvenescimento dos propágulos e, como isso, maximizar o enraizamento. Com o rejuvenescimento do clone FR52 é possível que as melhores percentagens de enraizamento sejam alcançadas sem a necessidade de AIB, a exemplo do clone FR10. Estas hipóteses estão sendo testadas com clones de diferentes origens.

#### **5.4 Conclusão**

Os clones FR10 e FR52 diferem quanto a competência ao enraizamento das miniestacas.

O enraizamento de miniestacas do clone FR10 ocorre sem a aplicação de ácido indol butírico.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descrição de introduções e acessos de uma coleção potencializa a sua manutenção e utilização e a identificação de duplicatas otimiza a utilização de espaço e custos. A técnica de marcadores RAPD foi eficaz para identificar e separar clones de erva-mate que estão sendo utilizados em estudos de miniestaquia e microestaquia no Núcleo de Melhoramento de Propagação Vegetativa de Plantas da Universidade Federal de Santa Maria. Além disso, foi possível agrupar os clones por origem e verificar a existência de variabilidade genética entre os mesmos.

Um grande desafio para a propagação vegetativa de erva-mate é o resgate de plantas adultas. Neste trabalho foi utilizada a técnica da decepa das plantas adultas para a diferenciação de gemas da base da planta e produção de brotações adventícias juvenis. Estas brotações fornecem propágulos competentes para o enraizamento, porém variável entre clones. Neste trabalho os clones FR2 e FR3 apresentaram a maior competência ao enraizamento, com percentuais acima de 60%. Ficou também evidente que a aplicação de AIB não promoveu o enraizamento das estacas de gema única. No entanto, a aplicação de AIB afetou a brotação das estacas, principalmente dos clones FR1 e FR4, justamente aqueles que apresentaram menores percentagens de enraizamento. Portanto, a resposta ao rejuvenescimento e a consequente competência ao enraizamento são dependentes de cada clone.

Como esperado, diferenças genéticas foram encontradas quanto ao enraizamento de miniestacas, mesmo avaliando apenas dois clones. O clone FR10 apresentou as melhores respostas de enraizamento sem a necessidade de AIB. Novamente ficou evidente que propágulos rejuvenescidos não necessitam de AIB para o enraizamento, o que é muito importante para a produção comercial de mudas. Além disso, o sistema de cultivo sem solo se mostrou adequado para o cultivo das minicepas, necessitando, contudo, de ajustes para a erva-mate. O clone FR52 requer mais estudos, pois apresentou maior competência para a diferenciação de brotações adventícias do que de raízes. Isso é um indicativo para a realização de estudos com miniestaquia seriada para complementar o rejuvenescimento do clone FR52.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMATE (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE ERVA-MATE). Disponível em [www.abimate.org.br](http://www.abimate.org.br). Acesso em: 13agost.2012.

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

ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.

ALMEIDA, J. P.; ZANATTA, B.; WINGE, H. Avaliação do efeito do endocarpo na germinação da semente de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). In: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a cultura da Erva-Mate, 2000, Encantado-RS. **Anais...** Porto Alegre: Edição dos organizadores, 2000. p 427-431.

ALMEIDA, C.A.S. et al. Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Eds.) **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Rio de Janeiro: Vozes. 2001. 430p.

ANDRADE, F. M. **Diagnóstico da cadeia produtiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. São Mateus do Sul-PR: Consultoria, 1999. 92p.

ANDREJOW, G. M. P.; HIGA, A. R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* provenientes de brotação apical de mudas jovens. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 39, n. 4, p. 897-903, out./dez. 2009.

ARAUJO, J. P. C. et al. Propagação da figueira por estaquia tratadas com AIB. **Biociencia Journal**, v.21, n.2, p.59-63, 2005.

ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de 67 plantas. Brasília: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, v.1, p.261-296, 1998.

BERTONI, M. H. et al. Fresh leaves of *Ilex paraguariensis* Saint Hil. III. Effect of different stages of the tradicional process for yerba mate production on the composition of fresh leaves. **Anales de la Association Quimica Argentina**, Buenos Aires, v. 80, n. 6, p. 493-501, 1992.

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

- BITENCOURT, J. et al. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.3, p.277-281, 2009.
- BOGUSZEWSKI, J. H. **Uma história cultural da erva-mate**: o alimento e suas representações. 2007. 130f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236p.
- BRONDANI, G. E. et al. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.3, p.257-267, 2007.
- BRONDANI, G. E. et al. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.57, p.29-38, 2008.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: **Embrapa Florestas**, v. 1, 1039 p., 2003.
- CHALFUN, N. N. J. et al. Comportamento de açúcares, aminoácidos e etileno no enraizamento de estacas de *Hibiscus rosa-sinensis* L. **Ciência & Prática**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 146-157, 1990.
- CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. cap.2. p.107-116.
- DIAS NETO, E. et al. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 57, n. 1, p. 83-88, jan. 1993.
- DIAS, P. C. et al. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de Angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por Miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.36, n.3, p.389-399, 2012
- EICHENBERG, K.; GUGERLI, F.; SCHNELLER, J. J. Morphological and molecular diversity of swiss common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae) and their origin. **Botanica Helvetica**, Basel, v.110, n.1, p.61-67, 2000.
- ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.
- FERREIRA, D. F. **SisVar**: sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 4.0. Lavras: DEX/ UFLA, 1999. Software estatístico.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

FERREIRA, C. F. et al. Uso de marcadores RAPD e SSR na detecção de acessos duplicados de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 2011. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 14.; FEIRA BRASILEIRA DA MANDIOCA, 1., 2011, Maceió. Mandioca: fonte de alimento e energia: **Anais...** Maceió: ABAM: SBM, 2011. 1 CD-ROM.

GOVERNO DO PARANÁ. Parque Histórico do Mate. Disponível em: <<http://www.museuparanaense.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=59>>. Acesso em: 15.mar.2012.

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

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

GREENWOOD, M. S., HUTCHISON, K. W. Maturation as a developmental process. In: AHUJA, M. R.; LIBBY W. J. **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 14 - 33.

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

GUIMARÃES, W. N. R. et al. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.11, n.1, p.37-45, 2007.

HABER, R.A.; MOTA, M.G.C.; RODRIGUES, V.L.F. Efeito de Diferentes Concentrações de AIB no Enraizamento de Estacas de Bacuri (*Platonia insignis* Mart.). VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA Amazônia Oriental, **Anais ...** local, 2008.

HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIES, T. D., HAISSIG, B. E., SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1987. p. 11-28 (Advances in Plant Sciences Series, 2).

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.

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

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

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

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.

**IBGE**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2003/pevs2003.pdf>>. Acesso em: 18.fev.2011.

INSTITUTO EUVALDO LODI (Mato Grosso do Sul). Org.. Ciclo da Erva Mate em Mato Grosso do Sul - 1883-1947. Campo Grande: Instituto Euvaldo Lodi, 1986. 518 p. (Série Histórica). Coletânea.

KRAMER, P.J., KOZLOWSKI, T.T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calourte Gulbenkian, 1972. 745p.

LOPES, M.S. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Uberlândia, v.5, n.29, p.56-60, 2002.

MARTINS, J.V. **Variabilidade genética de procedências e progênies de erva-mate. (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 33f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2009.

MERCOMATE. **Economia ervateira no MERCOSUL**. Comitê de Cooperação Técnica. Agência Brasileira de Cooperação do Ministério das Relações Exteriores. Brasília, 1993.10 p.

MIRANDA, N.; URBAN, T. **Engenhos & barbaquas**. Curitiba: Posigraf, 1998. 120p.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHEM-FILHO, D.; SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, p. 59-70, 2006.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific syntheses of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, v.55, p. 335-350.1994.

NICOLOSO et al. Propagação Vegetativa de *Platanus Acerifolia* Ait.: (I) Efeito de tipos fisiológicos das estacas e épocas de coleta no enraizamento de estacas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 479-485, 1999.

OLIVEIRA, Y.M.M. de; ROTTA, E. Área de distribuição geográfica nativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10.; Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPq, 1985. p.17-36. (EMBRAPA-CNPq. Documentos, 15).

PAIVA, H. N., GOMES, J. M. Propagação vegetativa de espécies florestais. Viçosa, MG: UFV, 1995. 40 p. (Boletim, 322).

PARANÁ. Secretaria de Estado da Cultura. Coordenadoria do Patrimônio Cultural. **A erva mate e o parque histórico do mate**. Disponível em:

<<http://www.patrimoniocultural.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=24>>. Acesso em: 18.mar.2012.

PICHETH, J. A. T. DE F. Efeito de soluções alcoólicas do ácido indol-3-butírico no enraizamento de estacas de árvores adultas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Revista Floresta**, v. 27, n. 1/2, p. 137-138, 1997.

RAU – Red Academica del Uruguay. El mate. 1997. Disponível em: <<http://www.rau.edu.uy/uruguay/cultura/mate.htm>>. Acesso em: 06.novemb.2012.

REITZ, R; EDWIN, G. **Aquifoliaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1967. 47p.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Erva-mate. In: Projeto madeira do Rio Grande do Sul . Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1983. p.284-292. (Sellowia, n.34-35, 1983).

SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**, Madison, v.41, n.6, p.1659-1675, 2001.

SCHERER, R. A. **Early selection of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. In: Argentina. Bonn: Rheinischen Friedrich-wilhelms-Universitat, 1997, 58p.

SOUZA, J.C.A. Propagação vegetativa de cedro-australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, V.33, n.2, p.205-213, 2009.

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. Programa de melhoramento genético da erva-mate no centro nacional de pesquisa de florestas da Embrapa. In. CONGRESSO SUL AMERICANO DA ERVA-MATE, 1; REÚNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2, 1997, Curitiba. **Anais**. Colombo: Embrapa- CNPF, 1997. P. 285-297. (Embrapa- CNPF. Documentos, 33).

TAIZ, L.; ZEIGER, E.. **Fisiologia vegetal**. 3. Ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

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

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

VIEIRA, M. L. C.; VELLO, N. A.; SILVA-FILHO, M. C. Genética e Melhoramento Vegetal. In: MIR, Luis (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalytus spp.* por miniestaquia**. 1999. Tese (Mestrado em Engenharia Florestal...) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

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

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

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

WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire), por miniestaquia de material juvenil. In: **3º Congresso sul-americano da erva-mate**. 1ª Feira do Agronegócio da erva-mate. Chapecó-SC, 2003. CD-ROM.

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

WENDT, J. G. N.; FRIEDRICH, F. Diagnóstico do Setor Ervateiro na 26ª Secretaria de Desenvolvimento Regional (SDR) do estado de Santa Catarina. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 40, n. 3, p. 555-558, jul./set. 2010.

WILLIAMS, J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

VALLE, C. F. Enraizamento de estacas de *Eucalyptus* sp. **Boletim Informativo IPEF**, v. 6, n. 16, p. 1-5, 1978.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 64p. (Caderno didático, 92).

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

XAVIER, A. et al. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestaquia de clones de híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, n. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.

XAVIER, A. et al. Propagação Vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.2, p.139-143, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. da **Silvicultura Clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272p.

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

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa, MG: SIF, 1998. 10 p.(Informativo Técnico SIF, 11).

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: Wiley & Sons, 1984. 505p.