

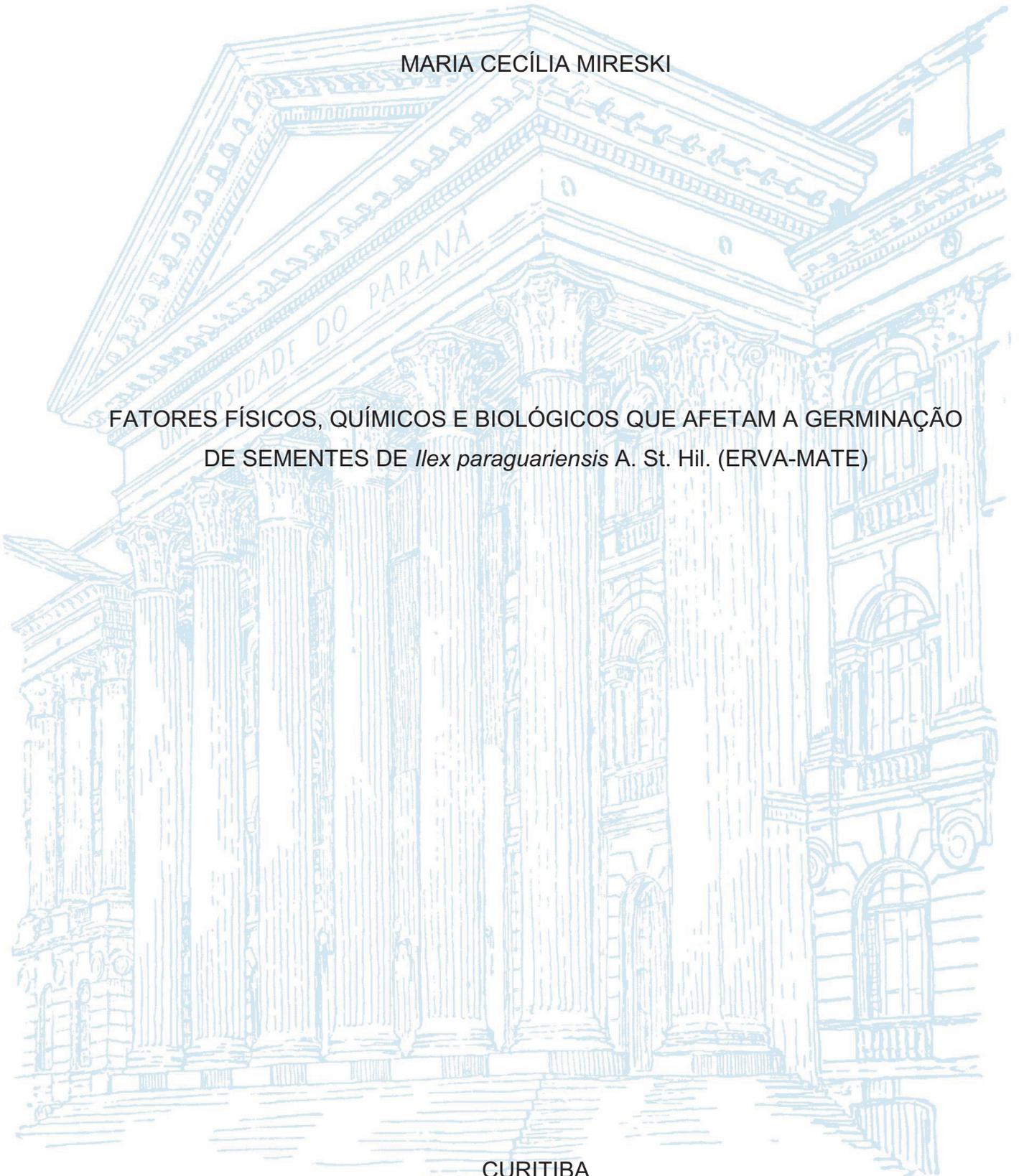
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CECÍLIA MIRESKI

FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS QUE AFETAM A GERMINAÇÃO
DE SEMENTES DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (ERVA-MATE)

CURITIBA

2018



MARIA CECILIA MIRESKI

FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS QUE AFETAM A GERMINAÇÃO
DE SEMENTES DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (ERVA-MATE)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Dr. Antonio Carlos Nogueira

Coorientadores: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Dr.^a Cristiane Vieira Helm
Dr.^a. Elisa Serra Negra Vieira
Dr. Ivar Wendling

CURITIBA
2018

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Mireski, Maria Cecília

Fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a germinação de sementes de *ilex paraguariensis* a. st. hil. (erva-mate) / Maria Cecília Mireski. – Curitiba, 2018.

116 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira

Coorientadores: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Dra. Cristiane Vieira Helm; Dra. Elisa Serra Negra Vieira

Dr. Ivar Wendling

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 26/02/2018.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Erva-mate. 2. Erva-mate – Sementes. 3. Erva-mate – Doenças e pragas. 4. Germinação. 5. Teses. I. Nogueira, Antonio Carlos. II. Santos, Álvaro Figueredo dos. III. Helm, Cristiane Vieira. IV. Vieira, Elisa Serra Negra. V. Wendling, Ivar. VI. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. VII. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.285



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL
Código CAPES: 40001016015P0

TERMO DE APROVAÇÃO

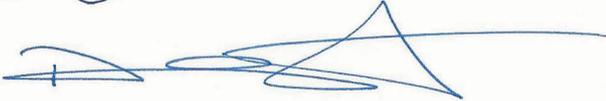
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MARIA CECILIA MIRESKI**, intitulada: "**FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS QUE AFETAM A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Ilex paraguariensis* A. ST. HIL. (ERVA-MATE)**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho,

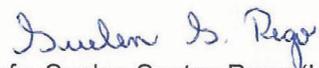
são de parecer pela sua APROVAÇÃO

Curitiba, 26 de fevereiro de 2018.




Prof. Antonio Carlos Nogueira (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


Profa. Dagma Kratz (UFPR)


Profa. Suelen Santos Rego (ULT)

Dedico,

*Aos meus pais, Paulo e Cecília (in memoriam),
pelo dom da vida. Saudade eterna!*

*Ao Sílvio, pelo amor, carinho, ajuda,
compreensão, paciência e principalmente por
acreditar em mim, sendo meu maior
incentivador.*

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para realização dessa etapa de minha vida, meu sincero reconhecimento e agradecimento, em especial:

À Deus, pela sua presença constante em minha vida, sendo minha força, esperança e meu refúgio nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela estrutura física e profissional durante minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa cedida.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira, pela orientação, confiança, apoio, paciência e conselhos valiosos. Ao senhor, meu profundo respeito e gratidão.

Aos meus coorientadores: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos; Dra. Cristiane Vieira Helm; Dra. Elisa Serra Negra Vieira e Dr. Ivar Wendling pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão. Muito obrigado pela confiança, acolhimento e dedicação para que eu me tornasse uma profissional melhor.

Aos integrantes da banca examinadora: Suelen Santos Rego, Dagma Kratz e Gizelda Maia Rego pelas excelentes contribuições.

À Embrapa Florestas, pelo suporte prestado durante as conduções dos experimentos.

À Caroline de Bastos Bühner, pela amizade, pelo estímulo e pelas suas contribuições na realização deste trabalho. Carol, à você minha eterna gratidão!

Aos demais funcionários da Embrapa Florestas: Davi, Joel, Adilson, Vero, Décio, Nide, Ozias e Onécimo, o meu muito obrigado pelo apoio técnico.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Florestal: Ana Lídia, Heloíse, João Arthur, Eduardo, Edson, Flávia e Tiago, pelos ensinamentos, pelos momentos de alegria. Agradeço por Deus ter colocado vocês na minha vida e assim, tornar esta fase mais leve.

À Manoela Mendes Duarte e Carlos André Stuepp, pela amizade e parceria nos artigos.

Ao Sílvio, pela compreensão, paciência, incentivo. Pelo apoio incondicional em todos os momentos. Pelas palavras de conforto, de esperança e de encorajamento...os meus sinceros agradecimentos.

Para viver melhor...

Não se preocupe, “se ocupe”.
Ocupe seu tempo, ocupe seu espaço, ocupe sua mente.

Não se desespere, “espere”.
Espere a poeira baixar, espere o tempo passar, espere a raiva desmanchar.

Não se indisponha, “disponha”.
Disponha boas palavras, disponha boas vibrações, disponha sempre.

Não se canse, “descanse”.
Descanse sua mente, descanse suas pernas, descanse de tudo.

Não menospreze, “preze”.
Preze por qualidade, preze por valores, preze por virtudes.

Não se incomode, “acomode”.
Acomode seu corpo, acomode seu espírito, acomode sua vida.

Não desconfie, “confie”.
Confie no seu sexto sentido, confie em você, confie em Deus.

Não se torture, “ature”.
Ature com paciência, ature com resignação, ature com tolerância.

Não pressione, “impressione”.
Impressione pela humildade, impressione pela simplicidade, impressione pela elegância.

Não crie discórdia, “crie concórdia”.
Concórdia entre nações, concórdia entre pessoas, concórdia pessoal.

Não maltrate, “trate bem”.
Trate bem as pessoas, trate bem os animais, trate bem o planeta.

Não se sobrecarregue, “recarregue”.
Recarregue suas forças, recarregue sua coragem, recarregue sua esperança.

Não atrapalhe, “trabalhe”.
Trabalhe sua humanidade, trabalhe suas frustrações, trabalhe suas virtudes.

Não conspire, “inspire”.
Inspire pessoas, inspire talentos, inspire saúde.

Não se apavore, “ore”.
Ore a Deus, ore aos santos, ore às forças e as energias.

Somente assim viveremos dias melhores. Então não perca tempo, aproveite seu tempo!

Bruno Pitanga

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), é o principal produto não madeireiro do agronegócio florestal do Sul do Brasil. Devido ao potencial econômico, social e ecológico, a cultura se constitui numa das opções de emprego e de renda, para os produtores rurais que desenvolvem suas atividades em ervais nativos e plantados. A produção de mudas é feita predominantemente por sementes, porém, os frutos maduros apresentam sementes com embriões imaturos. Assim, para promover o desenvolvimento embrionário utiliza-se a estratificação em areia por seis meses, mas, mesmo assim o percentual de germinação não ultrapassa 20%. Diante disso, no intuito de retomar as pesquisas referentes às sementes de erva-mate, este trabalho investiga os principais problemas relacionados à germinação. Dessa forma, a dissertação foi agrupada em três capítulos, conforme segue: **Capítulo 1. “Caracterização fisiológica das sementes de erva-mate quanto a tolerância à dessecação”**, o qual objetiva classificar as sementes de erva-mate em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. Para isso, utilizou-se o protocolo adaptado de Hong e Ellis (1996), onde as sementes de erva-mate foram avaliadas quanto a tolerância a dessecação pelo método em sílica gel. A viabilidade foi avaliada por meio do teste de tetrazólio e o teor de água pelo método de estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24h. Após as avaliações, os resultados indicaram que as sementes de erva-mate podem ser classificadas como ortodoxas. **Capítulo 2. “Polifenóis totais, bioensaio e histoquímica em sementes frescas, desidratadas e estratificadas de erva-mate”**. Este capítulo objetiva quantificar os polifenóis totais em sementes de erva-mate: frescas (SF); desidratadas durante setenta dias (SD) e estratificadas em areia durante 180 dias (SE); avaliar o potencial inibidor de germinação dos extratos em água, etanol/água (1:1) e etanol (99%), oriundos das sementes (SF, SD e SE) de erva-mate sobre a germinação e crescimento de plântulas de alface e verificar a presença de polifenóis em sementes frescas de erva-mate através de métodos histoquímicos. No bioensaio utilizaram-se extratos provenientes de sementes de erva-mate sobre a germinação de alface e na análise histoquímica, efetuaram-se secções em sementes de erva-mate, as quais foram coradas com corantes específicos. Assim, concluiu-se que em sementes frescas de erva-mate há uma maior concentração de compostos fenólicos, sendo reduzida nas sementes desidratadas e quase nula em sementes estratificadas; pelo bioensaio foi possível presumir que os polifenóis presentes nos

extratos elaborados a partir das sementes de erva-mate, ocasionaram uma ação fitotóxica nas raízes das plântulas de alface; na análise histoquímica foi evidenciada a presença de barreira rugosa lignificada e compostos fenólicos entre o endocarpo e o endosperma das sementes de erva-mate. **Capítulo 3. “Associação de fungos em sementes e patogenicidade de *Colletotrichum* sobre folhas e de *Fusarium* em mudas de erva-mate”**. Neste capítulo objetiva-se avaliar a incidência dos fungos: antes, durante e após o processo de estratificação das sementes, por meio de testes de sanidade. Foram detectados através dos testes de sanidade fungos epifíticos e endofíticos que incidem sobre as sementes de erva-mate ao longo do processo de estratificação. Além disso, fungos fitopatogênicos pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi* e ao complexo *Fusarium graminearum* podem influenciar na qualidade fitossanitária das mudas e no potencial germinativo das sementes de erva-mate.

Palavras-chave: Espécies florestais nativas. Sementes ortodoxas. Patologia de sementes. Polifenóis.

ABSTRACT

The yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) is the main non-timber product of the Brazilian agribusiness. Due to the economic, social and ecological potential, culture is one of the best options for employment and income, especially for rural producers who develop their activities in native and planted herbs. The production of seedlings is predominantly made by seeds, however, the mature fruits present seeds with immature embryos. Thus, to promote embryonic development, the stratification in sand is used for six months, but even so the percentage of germination does not exceed 20%. Therefore, in order to resume the research concerning the seeds of yerba mate, this work investigates the main problems related to germination. Thus, the dissertation was grouped into three chapters, as follows: **Chapter 1. "Physiological characterization of yerba mate seeds on tolerance to desiccation"**, which aims to classify yerba mate seeds as orthodox, recalcitrant or intermediate. For this, the protocol adapted from Hong and Ellis (1996) was used, where the yerba mate seeds were evaluated for the desiccation tolerance by the silica gel method with the aid of a desiccator. The viability was evaluated by the tetrazolium test and the water content by the greenhouse method at 105 ± 3 ° C for 24 h. After the evaluations, the results indicated that the yerba mate seeds can be classified as orthodox. **Chapter 2. "Total polyphenols, bioassay and histochemistry in fresh, dehydrated and stratified seeds of yerba mate"**. This chapter aims to quantify the total polyphenols in yerba mate seeds: fresh (SF); dehydrated for seventy days (SD) and stratified in sand for 180 days (SE); (1: 1) and ethanol (99%), from the seeds (SF, SD and SE) of yerba mate on the germination and growth of lettuce seedlings and to verify the presence of polyphenols in fresh yerba mate seeds by histochemical methods. In the bioassay extracts were obtained from yerba mate seeds on lettuce germination and on histochemical analysis, sections were done on yerba mate seeds, which were stained with specific dyes. Thus, it was concluded that in fresh seeds of yerba mate there is a higher concentration of phenolic compounds, being reduced in dehydrated seeds and almost null in stratified seeds; by the bioassay it was possible to assume that the polyphenols present in the extracts elaborated from the yerba mate seeds, caused a phytotoxic action on the roots of the lettuce seedlings; in the histochemical analysis the presence of lignified rugged barrier and phenolic compounds between the endocarp and the endosperm of the yerba mate seeds was evidenced. **Chapter 3. "Association of fungi on seeds and**

pathogenicity of *Colletotrichum* about leaves and *Fusarium* on seedlings of yerba mate". In this chapter we aim to evaluate the incidence of fungi: before, during and after the process of stratification of the seeds, through sanitary tests. Epiphytic and endophytic fungi were evaluated through sanity tests on the mate grass seeds throughout the stratification process. In addition, phytopathogenic fungi belonging to the *Gibberella fujikuroi* complex and the *Fusarium graminearum* complex may influence the phytosanitary quality of the seedlings and the germinated potential of the yerba mate seeds.

Keywords: Native forest species. Orthodox seeds. Seed pathology. Polyphenols.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Flores de erva-mate.....	20
Figura 2. Inflorescência e maturação heterogênea dos frutos.....	21
Figura 3. Aspectos dos frutos de erva-mate.....	21
Figura 4. Corte longitudinal da semente de erva-mate.....	22
Figura 5. Estádios de desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate...	23
Figura 6. Folhas de erva-mate.....	24
Figura 7. Esquematização do protocolo de classificação fisiológica.....	38
Figura 8. Viabilidade dos embriões de erva-mate.....	41
Figura 9. Curva de calibração de calibração	57
Figura 10. Corte histológico transversal em semente de erva-mate.....	60
Figura 11. Plântulas de alface submetidas ao extrato de sementes frescas.....	63
Figura 12. Teste de patogenicidade de <i>Colletotrichum</i> sp.....	77
Figura 13. Sequencia do teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> sp.....	79
Figura 14. Porcentagem do teor de água nas sementes de erva-mate.....	82
Figura 15. Teor de água e viabilidade (%) das sementes de erva-mate	83
Figura 16. Desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate.....	85
Figura 17. Patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.....	91
Figura 18. Sintomas primários observados nas mudas.....	93
Figura 19. Aspecto das mudas de erva-mate.....	93
Figura 20. Características morfológicas dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	95
Figura 21. Hifas delgadas.....	95
Figura 22. Esporodóquio.....	96
Figura 23. Clamidósporos.....	96

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação do percentual de viabilidade, teor de água e desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate ao longo do tempo.....	41
Tabela 2. Curva padrão de ácido gálico.....	54
Tabela 3. Teores de polifenóis totais nos diferentes extratos.....	58
Tabela 4. Índice de velocidade de germinação (IVG).....	61
Tabela 5. Percentagem de germinação (%G)	61
Tabela 6. Avaliação do efeito fitotóxico dos extratos.....	62
Tabela 7. Incidência de fungos epifíticos em sementes de erva-mate.....	88
Tabela 8. Incidência de fungos endofíticos em sementes de erva-mate.....	89
Tabela 9. Patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.....	90
Tabela 10. Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> sp.....	92
Tabela 11. Características morfológicas dos isolados de <i>Fusarium</i> sp.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

BDA - Batata Dextrose Ágar

BOD - Demanda bioquímica de oxigênio

DFSCI - Danida Forest Seed Centre

DNA - Ácido desoxiribonucleico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IPGRI - International Plant Genetic Resources Institute

MDIC - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços

PAM - Produção Agrícola Municipal

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PF - Papel filtro

PVC - Polyvinyl chloride

RAS - Regras para análise de sementes

SD – Semente desidratada

SE – Semente estratificada

SF – Semente fresca

SINDIMATERS - Sindicato da Indústria do Mate no Estado do Rio Grande do Sul

TA – Teor de água

TZ – Teste de tetrazólio

UR – Umidade relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 A FAMÍLIA AQUIFOLIACEAE E O GÊNERO <i>Ilex</i> L.....	17
2.2 A ESPÉCIE <i>Ilex paraguariensis</i>	18
2.2.1 Área de ocorrência natural.....	18
2.2.2 Área de produção.....	19
2.2.3 Aspectos taxonômicos e botânicos.....	19
2.2.4 Inibidores da germinação de sementes de <i>I. paraguariensis</i>	24
2.2.4.1 Substâncias químicas.....	24
2.2.4.2 Barreiras físicas.....	25
2.2.4.3 Imaturidade embrionária.....	25
2.2.5 Tratamentos para facilitar a germinação de <i>I. paraguariensis</i>	26
2.2.5.1 Estratificação em areia.....	26
2.2.5.2 Secagem.....	26
2.2.6 Patologia de sementes.....	26
2.2.7 Tolerância à dessecação.....	27
3 REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE ERVA-MATE QUANTO A TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO.....	34
CHAPTER 1 PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF YERBA MATE SEEDS ON DESICCATION TOLERANCE.....	35
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	37
2.2 OBTENÇÃO DAS SEMENTES.....	37
2.3 CLASSIFICAÇÃO DE SEMENTES QUANTO TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO.....	37
2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA.....	39
2.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS SEMENTES.....	39
2.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4 CONCLUSÕES.....	43
5 REFERÊNCIAS.....	43

CAPITULO 2 POLIFENÓIS TOTAIS, BIOENSAIO, HISTOQUÍMICA EM SEMENTES FRESCAS, DESIDRATADAS E ESTRATIFICADAS DE ERVA-MATE.....	46
CHAPTER 2 TOTAL POLYPHENOLS, BIOASSAY AND HISTOCHEMISTRY IN FRESH, DEHYDRATED AND STRATIFIED OF YERBA MATE SEEDS.....	Erro! Indicador não definido.
1 INTRODUÇÃO.....	48
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	50
2.2 OBTENÇÃO DAS SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	50
2.2.1 Amostra 1: sementes de erva-mate frescas (SF).....	51
2.2.2 Amostra 2: sementes desidratadas durante 70 dias (SD).....	51
2.2.3 Amostra 3: sementes estratificadas em areia durante 180 dias (SE).....	51
2.3 PREPARO DA AMOSTRA.....	52
2.4 PREPARO DOS EXTRATOS.....	52
2.5 SOLUÇÃO TAMPÃO DE CARBONATO DE SÓDIO (15%).....	52
2.6 SOLUÇÃO ÁCIDO-GÁLICO.....	52
2.7 SOLUÇÃO BRANCO.....	53
2.8 SOLUÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS SEMENTES.....	52
2.9 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	53
2.10 POLIFENÓIS TOTAIS.....	54
2.11 CÁLCULOS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	54
2.11.1 Equação da reta.....	54
2.11.2 Valor em gramas da amostra que terá no volume do extrato.....	55
2.11.3 Compostos fenólicos totais equivalentes em ácido gálico.....	55
2.11.4 Compostos fenólicos totais, equivalente em ácido gálico em mg.L ⁻¹	55
2.12 ANÁLISE HISTOQUÍMICA.....	55
2.13 BIOENSAIO.....	55
2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1 POLIFENÓIS TOTAIS	57
3.2 HISTOQUÍMICA.....	59
3.3 BIOENSAIO.....	60

4 CONCLUSÕES.....	64
5 REFERÊNCIAS.....	64
CAPITULO 3 ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES E PATOGENICIDADE DE <i>Colletotrichum</i> SOBRE FOLHAS E DE <i>Fusarium</i> EM MUDAS DE ERVA-MATE.....	69
CHAPTER 3 ASSOCIATION OF FUNGI ON SEEDS AND PATHOGENICITY OF <i>Colletotrichum</i> ABOUT LEAVES AND <i>Fusarium</i> ON SEEDLINGS OF YERBA MATE.....	70
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 PROCEDÊNCIAS DAS SEMENTES.....	72
2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA.....	73
2.3 TESTE DE TETRAZÓLIO.....	73
2.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES DE ERVA-MATE.....	74
2.5 ESTRATIFICAÇÃO DAS SEMENTES EM AREIA.....	74
2.6 TESTE DE GERMINAÇÃO.....	74
2.7 TESTE DE SANIDADE EM PAPEL-FILTRO (PF).....	75
2.8 DETECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	75
2.9 TESTE DE PATOGENICIDADE DE <i>Colletotrichum</i> spp. SOBRE FOLHAS DE ERVA-MATE.....	76
2.10 TESTE DE PATOGENICIDADE DE <i>Fusarium</i> spp. EM MUDAS DE ERVA-MATE.....	78
2.10.1 Identificação morfológica e molecular de <i>Fusarium</i> spp.....	80
2.10.2 Caracterização morfológica.....	81
2.10.3 Caracterização molecular.....	81
2.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
3.1 TEOR DE ÁGUA E VIABILIDADE.....	82
3.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	84
3.3 ESTRATIFICAÇÃO E TESTE DE GERMINAÇÃO.....	86
3.4 TESTE DE SANIDADE EM PAPEL-FILTRO (PF).....	87
3.5 DETECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	89

3.6	TESTE DE PATOGENICIDADE DE <i>Colletotrichum</i> spp. SOBRE FOLHAS DE ERVA-MATE.....	90
3.7	TESTE DE PATOGENICIDADE DE <i>Fusarium</i> spp. EM MUDAS DE ERVA-MATE.....	91
3.7.1	Caracterização morfológica.....	94
3.7.2	Identificação molecular.....	97
4	CONCLUSÕES.....	98
5	REFERÊNCIAS.....	99
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	103
7	REFERÊNCIAS GERAIS.....	104

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nativa da América do Sul, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., (erva-mate) é tradicionalmente consumida em forma de bebida (chimarrão, tererê e chá mate) e recentemente explorada também para fins estéticos e culinários (FREITAS et al., 2011, p. 103). A Alemanha, França, Síria e Japão importam suas folhas e as transformam em extrato vegetal, para utilização em formulações fitoterápicas (RIL et al., 2011 p. 333), em função das características químicas presentes nessa matéria-prima (CARDUCCI et al., 2000 p.1172). Em consequência da diversidade de usos, a erva-mate tem despertado o interesse dos mercados mundiais, cuja exportação em 2016, teve um elevado percentual para países como Uruguai (84,4%), Chile (3,7%), Alemanha (2,7%), Estados Unidos da América (3,8%) e França (1,3%) (MDIC, 2016).

A produção nacional de erva-mate extrativa em 2016, apresentou um crescimento em torno de 1,7% em relação a 2015, alcançando 346.953 toneladas e o segundo maior valor de produção, gerando em torno de R\$ 398,8 milhões (IBGE, 2016, p. 18). Por outro lado, a erva-mate cultivada, também em 2016 teve uma redução de 21% em sua área plantada em relação a 2015, no entanto, a quantidade produzida, subiu para 2,2% (SINDIMATE, 2016).

A espécie desempenha grande importância socioeconômica para a região Sul do Brasil, sendo produzida sob cultivo ou por extrativismo (SIMEÃO et al., 2002), e, com a crescente demanda e a redução dos ervais nativos, o plantio surge como uma solução para atender o mercado consumidor (WENDT, et al., 2007, p. 47). Nesse aspecto, torna-se fundamental que a erva-mate seja produzida por sementes com alto vigor, proporcionando mudas com elevada qualidade genética, fisiológica e sanitária a fim de gerar plantas produtivas e com excelente padrão da matéria-prima.

A forma mais utilizada para propagação da erva-mate é por mudas provenientes de sementes. No entanto, seus frutos maduros, possuem cerca de 99% de embriões imaturos tornando a germinação irregular, lenta e frequentemente baixa (CUNHA; FERREIRA, 1987, p. 974-975). Assim, no intuito de promover o desenvolvimento embrionário, os viveiristas utilizam mecanismos de estratificação das sementes entre duas camadas de areia, porém, esse processo é muito demorado (em torno de seis meses) (ZANON, 1988, p. 7). Contudo, após esse longo período de estratificação, o percentual de germinação é em geral, inferior a 20% (MENNA, 1995, p. 238; STURION, 1988, p. 8).

Os mecanismos que envolvem a dormência embrionária das sementes de erva-mate já foram investigados (MELLO, 1980, p. 24; FERREIRA; HU, 1984, p. 442; ZANON, 1988, p. 5; NIKLAS, 1987, p. 48; HEUSER et al., 1993, p. 42; CATAPAN, 1998, p. 22; MEDEIROS, 1998, p. 15), entretanto, constituem um problema não solucionado e, conseqüentemente tem sido apontado como um dos motivos pelos quais ainda há dificuldades na produção das mudas. Não obstante as informações existentes sobre a baixa capacidade de germinação, a tecnologia de sementes ainda tem aspectos importantes a serem esclarecidos quanto ao seu comportamento no armazenamento, visando a conservação da qualidade fisiológica. Mesmo com algumas informações na literatura sobre a dormência das sementes de erva-mate (MEDEIROS, 1998, p. 15), ainda há aspectos que envolvem o desenvolvimento morfofisiológico das sementes de erva-mate que não foram sanados, especialmente por se tratar de uma combinação de causas.

Diante disso, este trabalho investiga alguns problemas relacionados à germinação (incidência de fungos; presença de inibidores) e nessa perspectiva, a dissertação foi agrupada em três capítulos, conforme segue: **Capítulo 1.** “Caracterização fisiológica das sementes de erva-mate quanto a tolerância à dessecação”; **Capítulo 2.** “Polifenóis totais, bioensaio e histoquímica em sementes frescas, desidratadas e estratificadas de erva-mate”; **Capítulo 3.** “Associação de fungos em sementes e patogenicidade de *Colletotrichum* spp. sobre folhas e de *Fusarium* spp. em mudas de erva-mate”.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Família Aquifoliaceae e o Gênero *Ilex* L.

A família Aquifoliaceae é extensivamente disseminada nas regiões tropicais e temperadas do planeta (GROPPO; PIRANI, 2002, p. 31; GOTTLIEB et al, 2005, p. 352). Possui grande importância madeireira (serraria e lenha), bem como algumas espécies são utilizadas no preparo de bebidas (BROTTO et al., 2007, p. 130). Atualmente possui apenas dois gêneros: *Nemophantus* Raf. (03 espécies) e *Ilex* L. com cerca de 700 espécies (SPICHIGER et al., 1993, p. 463).

O gênero *Ilex* L. apresenta vasta importância econômica e de uso, sendo que algumas das espécies são utilizadas na jardinagem, como ornamentação e outras no preparo de bebidas (TEZUKA et al., 2013, p. 352; YANG et al., 2015, p. 733). O sul da América do Sul é considerado um dos mais importantes centros de dispersão desse gênero o qual ocorre naturalmente nessa região (BROTTO et al., 2007, p. 130). No Brasil, ocorrem 70 espécies deste gênero, dentre as quais algumas destas são utilizadas como adulterantes na comercialização da erva-mate, dentre as quais podemos citar: *Ilex brevicuspis* Reissek; *I. theezans* Mart. ex. Reissek; *I. microdonta* Reissek; *I. dumosa* var. *dumosa* Reissek; *I. taubertiana* Loes; *I. pseudobruyus* Reissek; *I. integerrima* Reissek e *I. argentina* Lillo (SCHENKEL et al., 1997, p. 360).

2.2 A espécie *Ilex paraguariensis*

A erva-mate é uma árvore encontrada nas regiões da Argentina, Brasil e Paraguai (OLIVEIRA; ROTA, 1985, p. 17). Típica da Floresta Ombrófila Mista (CARVALHO, 2006, p. 459), foi descrita e publicada em 1822, nas memórias do Museu de História Natural de Paris (MAZUCHOWSKI, 1991, p. 03) pelo naturalista francês August de Saint Hilaire, que estudou e coletou o material de muitas plantas (DANIEL, 2009, p. 40), e entre elas, a espécie *Ilex paraguariensis*, nos arredores de Curitiba (naquela época pertencente à Província de São Paulo). O nome “paraguariensis” foi atribuído pelo autor, por acreditar que este, era o mesmo material encontrado no Paraguai (DANIEL, 2009, p. 40).

2.2.1 Área de ocorrência natural

A ocorrência natural da erva-mate abrange o Brasil, a Argentina e o Paraguai (OLIVEIRA; ROTA, 1985, p. 24; ZAMPIER, 2001, p. 07). Na Argentina esta espécie ocupa 60% do território e concentra-se na província de Misiones. Já no Paraguai, sua maior concentração situa-se entre os Rios Paraguai e Paraná (OLIVEIRA; ROTA, 1985, p. 24). No Brasil, a ocorrência natural encontra-se predominantemente nas regiões do centro sul e sudeste do estado do Paraná; praticamente em todo estado de Santa Catarina; a região centro-norte do Rio Grande do Sul e a região sul do Mato Grosso do Sul (DIAZ, 2013, p. 27).

2.2.2 Área de produção

A erva-mate cultivada no Brasil em 2016, ocupou uma área de 77.325 hectares, produzindo em torno de 616.213 toneladas, com valor de produção atingindo R\$ 541,1 milhões. Atualmente, quatro estados brasileiros (RS, SC, PR e MS), concentram toda a produção nacional de erva-mate, sendo que Paraná, numa área de 30.388 hectares, produziu 227.804 toneladas, obtendo o valor de produção de R\$ 161.073 milhões (IBGE – PAM, 2016).

Dos 20 municípios líderes de produção de erva-mate extrativa no País, 18 são paranaenses. Em 2016 destacaram-se em relação a quantidade produzida, os municípios de São Mateus do Sul, que foi o maior produtor nacional com 65.000 toneladas, seguido por Cruz Machado (49.800 toneladas), Bituruna (25.800 toneladas), Paulo Freitas (22.600 toneladas) e Inácio Martins com 14.820 toneladas (PEVS, 2016, p. 19).

2.2.3 Aspectos taxonômicos e botânicos

A erva-mate é uma planta alógama dioica críptica (CARVALHO, 2006, p. 457), não possibilitando a autopolinização, mas mesmo sendo dióica, em todas as flores encontram-se estames e pistilos, sendo que em flores femininas os estames não são funcionais e nas flores masculinas o pistilo é abortado, (Figura 1 A e 1 B) havendo portanto somente a forma de reprodução através da fecundação cruzada (DANIEL, 2009, p. 45; SOUZA et al., 2015, p. 316) e a maturidade sexual inicia-se a partir do segundo ano (se for oriunda de propagação vegetativa) e aos cinco anos se for produzida a partir de sementes (DANIEL, 2009, p. 45).

Sua polinização é realizada por insetos pertencentes às ordens Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera (FERREIRA et al., 1983, p. 30) e a floração ocorre entre setembro a dezembro (CARVALHO, 2006, p. 458). Já a frutificação ocorre entre dezembro e abril, onde também nesse período seus frutos são dispersos principalmente pelos pássaros (DANIEL, 2009, p. 44).

A maturação dos frutos (Figura 2) é bastante heterogênea, assim existe grande possibilidade de encontrar numa mesma árvore, desde frutos verdes até pós-maduros e ainda, a coloração do fruto varia de acordo com o grau de maturidade, modificando

de verde, vermelho, vermelho vivo e violeta-escuro, quando maduro (ZANON, 1988, p. 05).

O fruto de erva-mate (Figura 3), é classificado como drupa (drupóide) (KUNIYOSHI, 1983, p. 41), possui formato esférico e superfície lisa com o pericarpo constituído por uma epiderme de cutícula espessa e um parênquima de preenchimento não especializado (CATAPAN, 1998, p. 5), apresentam em média quatro pirênios¹ (endocarpo + semente) (BACKES, 2002, p. 129), os quais possuem consistência lenhosa e coloração parda com envoltórios lignificados, caracterizados como cristas, formadas por feixes vasculares lignificados na zona do endocarpo (AYUB et al, 1992, p. 134).

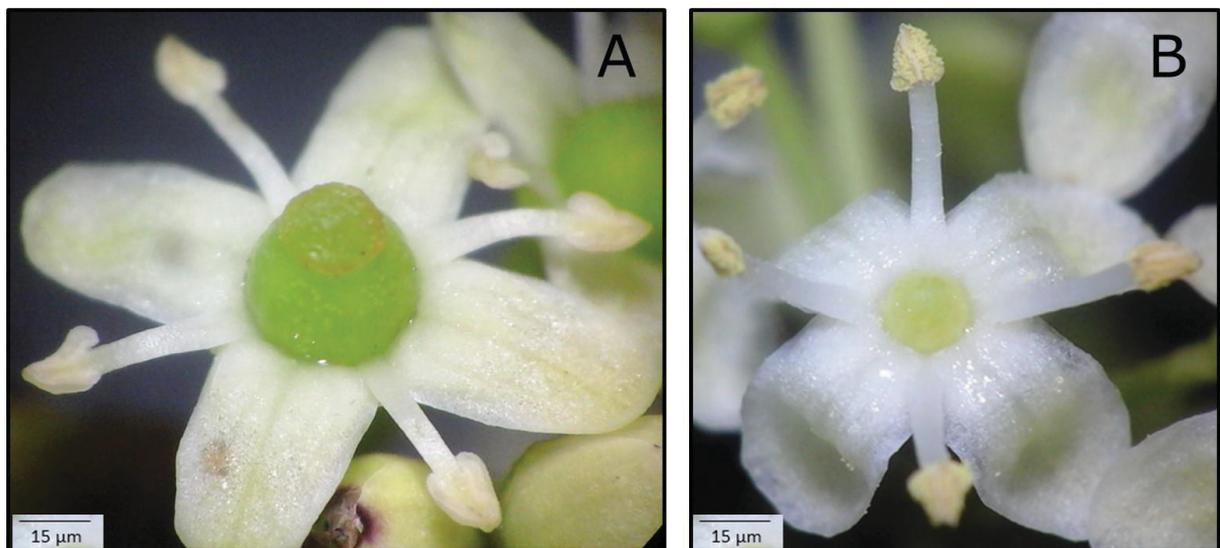


FIGURA 1. FLORES DE ERVA-MATE: (A) FEMININAS; (B) MASCULINAS.

FONTE: O autor (2017).

¹ Embora o termo correto seja pirênio, neste trabalho esta estrutura será apenas denominada como “semente”.



FIGURA 2. INFLORESCÊNCIA (A) E MATURAÇÃO HETEROGÊNEA DOS FRUTOS DE ERVA-MATE (B).

FONTE: O autor (2017).

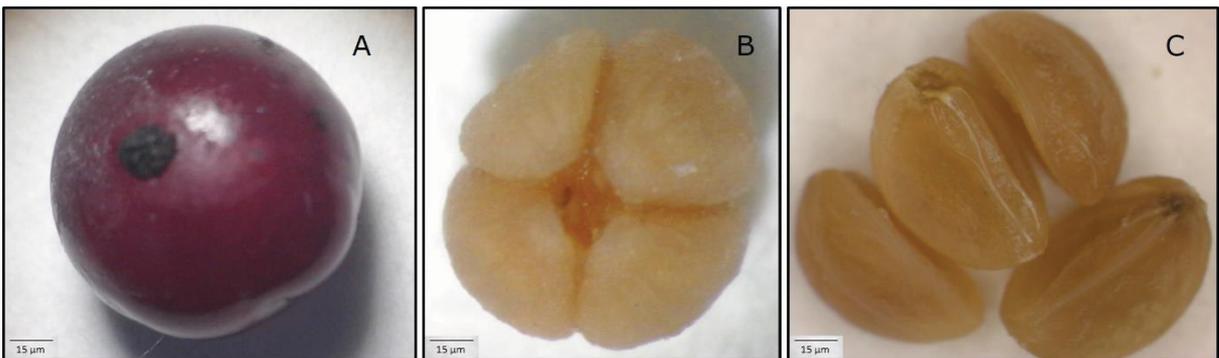


FIGURA 3. ASPECTO DOS FRUTOS DE ERVA-MATE: (A) FRUTO MADURO, GLOBOSO; (B) DRUPA TETRALOCULAR COM QUATRO PIRÊNIOS; (C) PIRÊNIOS (ENDOCARPO + SEMENTE).

FONTE: O autor (2017).

Aderida internamente ao endocarpo está a semente propriamente dita (Figura 4), com tegumento membranáceo (KUNIYOSHI, 1983, p. 41), de cor castanho clara e endosperma carnoso de cor creme (DIAZ, 2013, p. 31). Seu embrião é minúsculo, situado no ápice, na parte mais atenuada da semente, junto à micrópila. Entre o poro exterior e a micrópila há uma câmara preenchida por tecido esponjoso (KUNIYOSHI, 1983, p. 41).

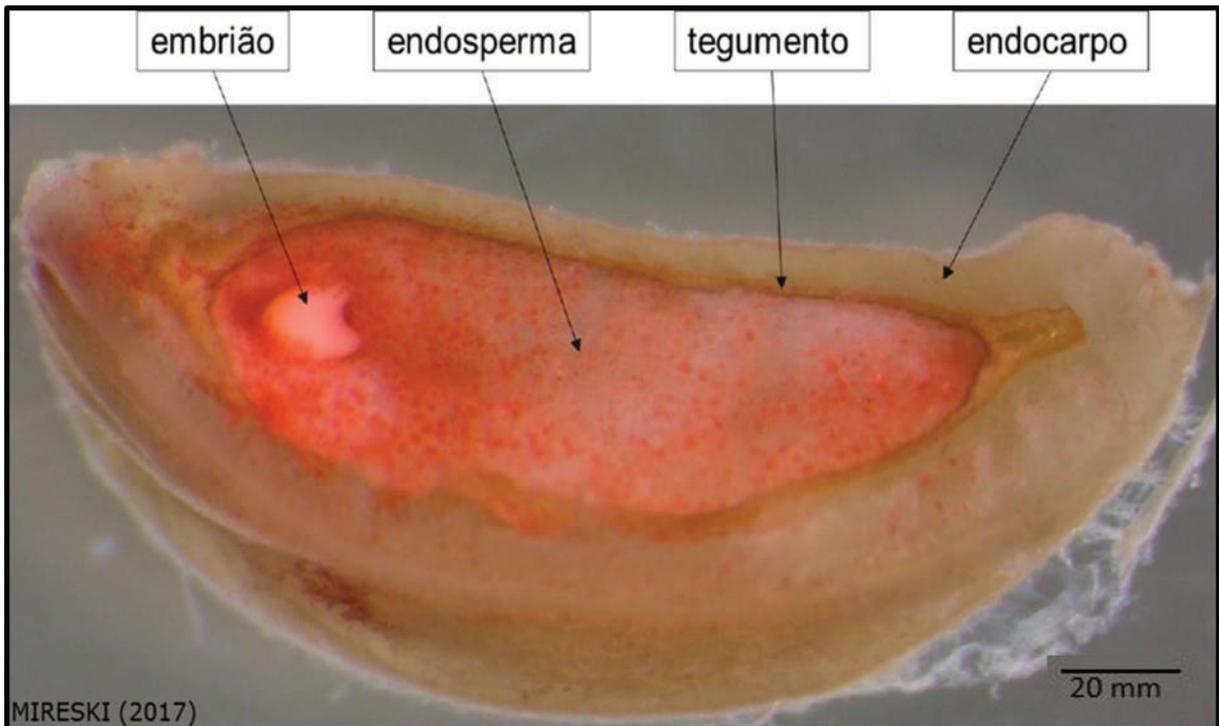


FIGURA 4. CORTE LONGITUDINAL DA SEMENTE DE ERVA-MATE, INDICANDO AS ESTRUTURAS INTERNAS.

FONTE: O autor (2017).

Com relação ao desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate, Heuser (1990, p. 23 – 33), descreveu o desenvolvimento do embrião, desde o estágio rudimentar, relatando as diferentes fases da embriogênese e endospermogênese, concluindo que a manutenção do suspensor para a continuidade do desenvolvimento embrionário, tanto quanto a dinâmica das reservas lipoprotéicas e seu processo de translocação, são de fundamental importância para a conclusão do desenvolvimento embrionário.

Os estádios de desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate (Figura 5), são caracterizados pela mudança de forma do embrião desde as fases globular, coração, pós-coração, torpedo até o estágio maduro e suas medidas de área variam entre 25mm² a mais de 80mm². (MIRESKI et al., 2017, p. 251).

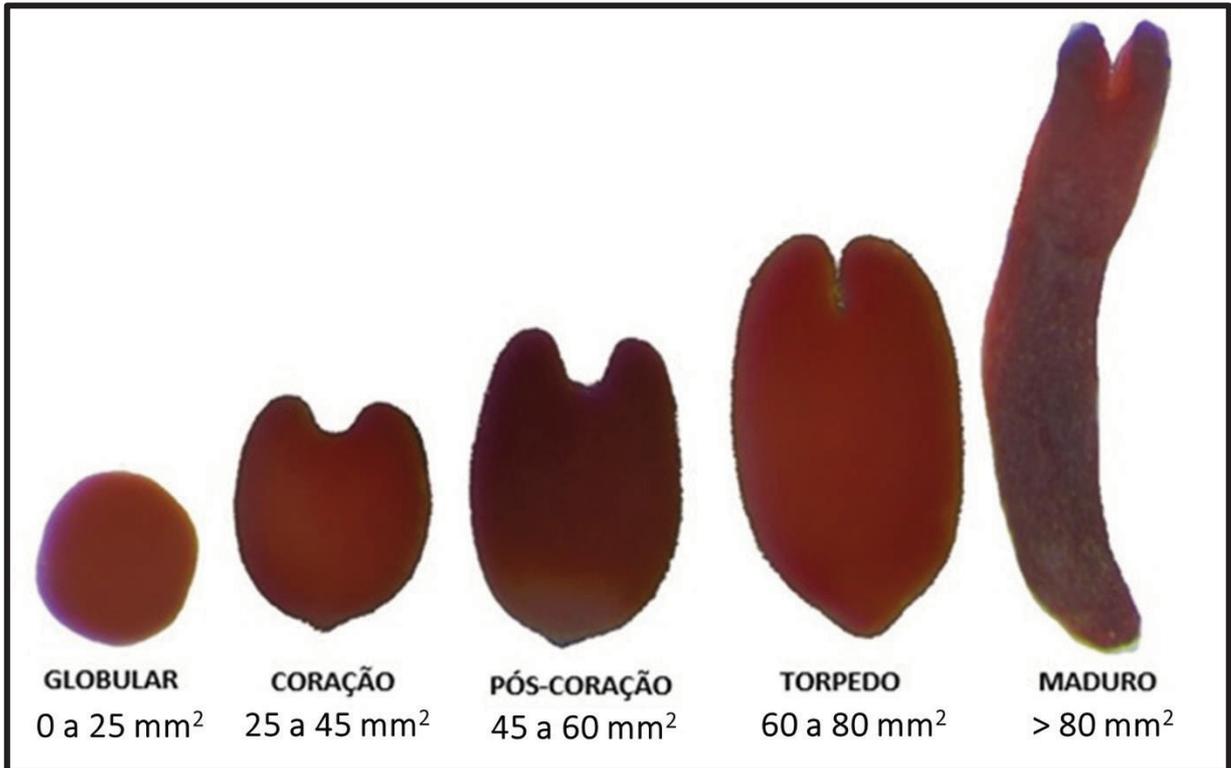


FIGURA 5. ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES DE ERVA-MATE. **FONTE:** O autor (2015). AUMENTO: 400 X. ESCALA: 2 mm.

As folhas da erva-mate (Figura 6), são alternas e simples, subcoriáceas a coriáceas, geralmente estipuladas, limbo foliar obovado, com margem irregular serrilhada ou dentada, no terço da base geralmente é lisa, com ápice obtuso (CARVALHO, 2003, p. 280).

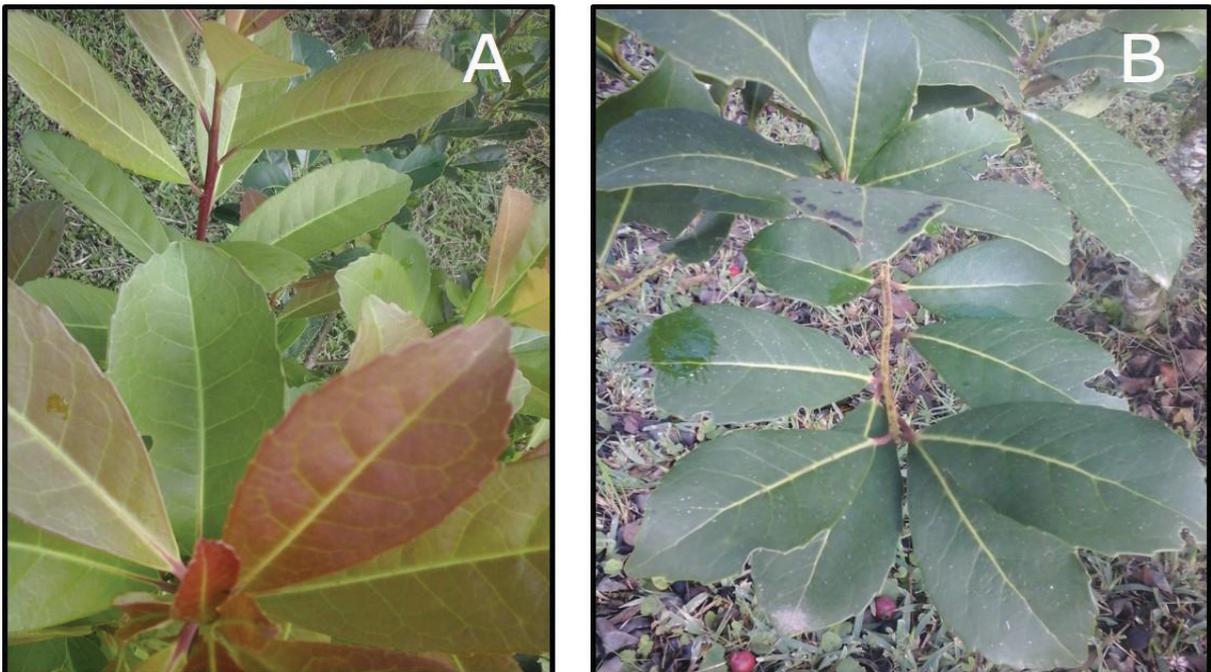


FIGURA 6. FOLHAS DE ERVA-MATE: (A) FOLHAS JOVENS; (B) FOLHAS MADURAS. **FONTE:** O autor (2017).

2.2.4 Inibidores da germinação de sementes de *I. paraguariensis*

2.2.4.1 Substâncias químicas

Estudos relacionados aos antioxidantes (principalmente flavonoides e ácidos fenólicos), presentes em grande quantidade nas folhas de erva-mate, tem despertado grande interesse, principalmente quanto aos benefícios relacionados à saúde que podem proporcionar (BARTÉ et al 2011, p. 5526). Entretanto, alguns dos componentes podem atuar como inibidores em vários processos de desenvolvimento das plantas, pois em nível celular, influenciam no metabolismo de lipídios e no mecanismo bioquímico da respiração, inibindo o transporte de glicose e a síntese de celulose (LADEIRA et al., 1987, p. 60).

Essas substâncias, de diferentes categorias químicas, podem ser encontradas em sementes de várias espécies, interferindo no processo germinativo (TOKUHISA, 2007, p. 181). Bewley e Black (1982, p. 186 - 187) relataram diversos compostos químicos como fenóis, terpenos, alcaloides, taninos, cumarinas e flavonoides, localizados em diferentes estruturas da semente, os quais podem estar relacionados com a dormência. Em sementes florestais, Maciel et al. (1992, p. 3), concluíram que a inibição promovida pelos fenóis é variável de acordo com sua localização na semente. Conforme Siqueira et al. (1991, p. 79), compostos fenólicos podem inibir em 50% a germinação por interferirem no metabolismo energético e nos processos biossintéticos dos embriões das sementes.

Dias (2005, p. 3), relata que os tecidos que circundam o embrião ou aqueles do próprio embrião podem restringir a entrada de O_2 e a saída de CO_2 , interferindo na respiração da semente e, conseqüentemente, bloqueando o crescimento do embrião. Esta impermeabilidade aos gases é atribuída aos compostos fenólicos, existentes no envoltório da semente, que retêm o O_2 , reduzindo a disponibilidade desse gás para o embrião. Assim, nas sementes de algumas espécies do gênero *Ilex*, o desenvolvimento embrionário pode estar sendo afetado pela presença de substâncias voláteis ou hormônios no interior das sementes, os quais estariam dificultando a expansão das células embrionárias e, conseqüentemente, retardando o seu desenvolvimento (TEZUKA et al., 2013, p. 355). Quando essas substâncias forem eliminadas, supõe-se que os embriões possam avançar seu estágio de desenvolvimento até atingirem o ponto de germinação.

2.2.4.2 Barreiras físicas

Apesar de possuírem endocarpo duro, lenhoso (MELLO, 1980, p. 20), as sementes de erva-mate conseguem absorver água após um determinado tempo de embebição, assegurando assim, que o endocarpo é permeável e, portanto, não caracteriza uma barreira física que impede a germinação das sementes (MELLO, 1980, p. 37).

Em espécies como *Cuscuta pedicellata* Ledeb e *C. campestris* Yunck, ocorre a dormência física, a qual ocorre no tegumento das sementes, pois estas possuem duas camadas de células paliçádicas que impedem a embebição. Essas camadas possuem células esclereificadas com parede celular secundária lignificada (VIVIAN et al., 2008, p. 697 - 698).

2.2.4.3 Imaturidade embrionária

Um importante mecanismo de sobrevivência de certas plantas (geralmente espécies florestais nativas), retardarem a germinação de suas sementes, até que as condições ambientais estejam adequadas, denomina-se dormência e geralmente ocorre devido à redução da hidratação do citoplasma. Dentre as causas de dormência em sementes, destacam-se as restrições físicas, devido ao endocarpo lenhoso, o qual impede a protrusão da raiz durante o processo de germinação, e, o embrião fisiologicamente imaturo (MEDEIROS, 2001, p. 1 - 2).

As sementes (pirênios) de erva-mate, possuem além da imaturidade fisiológica do embrião, apontada por Mello (1980, p. 20), o endocarpo lenhoso (MEDEIROS, 1998, p. 12), caracterizando a dormência por uma combinação de causas.

Na dormência morfofisiológica há diferenciação do embrião, porém o mesmo se encontra pouco desenvolvido, e neste caso, o embrião requer um período adicional de crescimento depois que a semente é dispersa pela planta, para que, então, a germinação possa ocorrer (METIVIER, 1986, p. 349). Frequentemente é observado em Annonaceae, Arecaceae, Araceae, Liliaceae, Magnoliaceae, sendo a maioria de clima tropical e poucas espécies de clima temperado (BASKIN; BASKIN, 1998, p. 432).

2.2.5 Tratamentos para facilitar a germinação de *I. paraguariensis*

2.2.5.1 Estratificação em areia

Para que ocorra a germinação o processo ainda utilizado é a estratificação em areia (ZANON, 1998, p. 7 - 8). Esse mecanismo consiste em colocar as sementes de erva-mate em meio úmido e aerado (POPINIGIS, 1977, p. 91), para que ocorram em seu interior mudanças fisiológicas e metabólicas (METIVIER, 1986, p. 347). Além disso, Kuniyoshi (1983, p. 44), observou que esse processo auxilia no abrandamento do endocarpo pela ação de hifas fúngicas. Já, Bewley e Black (1994, p. 73) sugerem que o contato com um substrato úmido reduz a influência dos inibidores da germinação.

2.2.5.2 Secagem

Segundo Dias (2005, p. 27), o calor seco pode auxiliar na superação da dormência de algumas plantas da floresta tropical. Assim, a secagem controlada, pois certas enzimas têm sua produção induzida pela secagem da semente durante seu processo de desenvolvimento, tornando-se fundamental que a dessecação seja controlada (BARBEDO; MARCOS-FILHO, 1998, p. 148).

2.2.6 Patologia de sementes

Existe um grande número de fatores que afetam a qualidade das sementes, dentre os quais os sanitários que se caracterizam pelo efeito deletério provocado pela ocorrência de microrganismos e insetos associados às sementes, desde o campo de produção até o armazenamento. Os mecanismos de transmissão utilizados pelos patógenos são variados e podem ser classificados de acordo com sua localização na semente (misturado, aderido à superfície ou localizado no interior da semente) e com o desenvolvimento do patógeno durante o crescimento da planta (PESKE et al., 2012, p. 225).

As sementes de modo geral podem abrigar e transportar microrganismos ou agentes patogênicos de todos os grupos taxonômicos, causadores e não causadores de doenças (BRASIL, 2009, p. 12). De modo que, a presença de patógenos pode

acarretar perdas por deterioração, lesões em plântulas e redução no poder germinativo das sementes (AIMI, et al., 2016, p. 1362).

A detecção de fungos associados às sementes pode ser realizada pelos métodos *blotter-test* ou com a utilização de diversos meios de cultura (LAZAROTTO, et al., 2012, p. 494). Em espécies florestais, há poucos estudos referentes à associação de patógenos com sementes. No entanto, esse tipo de conhecimento é indispensável, principalmente nas espécies florestais nativas, pois, para que as mudas sejam produzidas com qualidade é necessário que se conheça a sanidade e a qualidade fisiológica da semente utilizada (SANTOS; PARISI, 2015, P. 37).

2.2.7 Tolerância à dessecação

Diversas técnicas têm sido estudadas visando melhores condições de armazenamento, sendo que a principal, é a redução do metabolismo da semente, obtida através da dessecação da semente ou da diminuição da temperatura. Contudo, várias espécies tropicais, dentre as quais, muitas são arbóreas nativas do Brasil, são intolerantes à dessecação, sendo necessário, portanto, o desenvolvimento de tecnologias específicas para sua conservação (KOHOMA et al., 2006, p. 73).

Durante a maturação, na maior parte das sementes é adquirida a tolerância à dessecação, a qual permite que a semente seja armazenada por muitos anos sem perda de viabilidade, sendo que essa capacidade de armazenamento varia entre as espécies (GROOT et al., 2003, p. 279).

Essa tolerância está relacionada à capacidade do organismo em enfrentar o estresse da quase completa perda de água e, posterior reidratação dos tecidos das sementes, ou seja, o organismo reduz seu metabolismo após a dessecação e nessas condições acumula altos níveis de açúcares (HOEKSTRA et al., 2003, p. 260). Tais açúcares podem prevenir mudanças nas fases das membranas e mudanças estruturais das proteínas evitando que as membranas se rompam e dessa forma a atividade enzimática é preservada (CROWE et al., 1998, p. 221).

3 REFERÊNCIAS

AIMI, S. C.; ARAUJO, M. M.; MUNIZ, M. F. B.; WALKER, C. TESTE DE SANIDADE E GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 1361-1370, 2016.

AYUB, D.M.; MARIATH, J.E; COCUCCHI, A. E. Ontogenia do fruto de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. In: REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1. **Anais....** Porto Alegre, p. 132-138, 1992.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. 1.ed. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, 2002, 320 p.

BASKIN, C.; BASKIN, J. **Seeds: ecology biogeography and evolution of dormancy and germination**. Academic Press, San Diego, 1998, 666 p.

BARBEDO, C. J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botânica Brasílica**. São Paulo, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.

BARTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523-5527, 2011.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. **Springer-Verlag**, New York. 1982.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2ª Ed. Plenum Press, New York, NY. 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 200p.

BROTTO, M. L.; VIEIRA, T.; SANTOS, E. P. Flórmula do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Paraná, Brasil: Aquifoliaceae. **Estudos de Biologia**, v.29, n. 67, p. 129-135, 2007.

CARDUCCI, C. N.; DABAS, P. C.; MUSE, J. O. Determination *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.), of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in a plant used to prepare tea in South America. **Journal of AOAC International**, Maryland, v. 83, n. 5, p. 1167-1173, 2000.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras**, vol. 2. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 627p.

CATAPAN, M. I. S. Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. [Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais]. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998, 97 p.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M.; ANCHORDOGUY, T. J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Criobiology*, v. 27, p. 219 - 231, 1998.

CUNHA, G. G.; FERREIRA, A. G. Viabilidade das sementes de erva-mate. **Ciência e Cultura**, Porto Alegre, v. 10, n. 39, p. 974-976, 1987.

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados, MS. UFGD/ UEMS, 2009. 288 p.

DIAS, D. C. F. S. Dormência em sementes: mecanismos de sobrevivência das espécies. **Revista Seed News**. Pelotas, RS, jul/ago, ano IX, n.4, 2005.

DIAZ, V. S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguaçu**. [Dissertação de Mestrado]. ESALQ/USP. Piracicaba, 2013. 89 p.

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

FERREIRA, A.G.; HU, C.Y. Influência da luz na embriogênese tardia de *Ilex*, cultura "in vitro". In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34. Porto Alegre. **Anais...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, p. 441-449, 1984.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 54, p. 105-108, jan/jun., 2007.

FREITAS, G. B. L.; ANDRIOLA, A.; GAUER, A. G.; IENK, L. S. S. Erva-mate, muito mais que uma tradição, um verdadeiro potencial terapêutico. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol. VIII, n. 3, p. 101 - 113, 2011. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/download/15966/9817> Acesso em: nov. 2017.

GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n.2, p. 352-369, 2005.

GROOT, S. P. C.; SOEDA, Y.; STOOPEN, G.; KONINGS, M. C. J. M.; GEEST, A. H. M. van der. Gene expression during loss and regaining of stress tolerance at seed priming and drying. In: NICOLÁS, G.; BRADFORD, K. J.; CÔME, D.; PRITCHARD, H. D. (Ed.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003. p. 279 - 287.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R. Aquifoliaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. (Org.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. 1ªed. São Paulo: HUCITEC/FAPESP, v. 2, p. 31-37, 2002.

HEUSER, E. D.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A. *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. **Boletim de la Sociedad Argentina de Botanica**. La Plata, v. 29, n. 1-2, p. 39-48, 1993.

HEUSER, E. D. **Embriogênese em *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aspectos do suspensor e endosperma**. Tese de Doutorado em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1990, 145 p.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; NIJSSE, J. What do we know about desiccation tolerance mechanism? In: NICOLÁS, G.; BRADFORD, K. J.; CÔME, D.; PRITCHARD, H. D. (Ed.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003. p. 259 - 270.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2016**. Rio de Janeiro, v. 30, p.1-48, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção Agrícola Municipal – PAM – 2016**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em nov. 2017.

KOHOMA S.; MALUF A. M.; BILIA D. A. C.; BARBEDO C. J. SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *Eugenia brasiliensis* LAM. (GRUMIXAMEIRA). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, n. 1, p. 72 - 78, 2006.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. [Dissertação Mestrado em Engenharia Florestal], UFPR, Curitiba. 1983.

LADEIRA, A. M.; ZAIDAN, L. B. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. *Ageratum conyzoides* L. (Compositae): germinação, floração e ocorrência de derivados fenólicos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Hoehnea**, v.15, p.53-62, 1987.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; MACIEL, C. G.; LONGH, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região Sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, 2012.

MACIEL, A.S.; BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 14, n.1, p.1-8, 1992.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. Curitiba, EMATER. 1991. 104 p.

MEDEIROS, A. C. S. Dormência em sementes de erva-mate. **Documentos**, 16. Embrapa Florestas, Curitiba, 1998, 25 p.

MEDEIROS, A. C. S. Aspectos de dormência em sementes de espécies arbóreas. **Circular técnica 55**. Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2001, 12 p.

MELLO, V. D. C. **Morfologia e germinação da semente de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. [Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias]. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 1980. 49 p.

MENNA, A. B. Proposta para ação extensionista na cultura da erva-mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E., de A.; TARASCONI, L. C. (Org.). **Erva-mate: biologia e cultura no cone sul**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p. 235-239, 1995.

METIVIER, J.R. Dormência e germinação. In: FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo, EPU/EDUSP, v.2, cap.12, p. 343-392, 1986.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS (MDIC). **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet**. Disponível em: < <http://alicesweb.mdic.gov.br>>. Acesso em: nov. 2017.

MIRESKI, M. C.; VIEIRA, E. S. N.; WENDLING, I.; BÜHRER, C. B.; NOGUEIRA, A. C. Desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Informativo Abrates**, Londrina, PR, v. 27, n. 2. p. 251, 2017.

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

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. 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).

PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G. R. M. **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos**. 3ª edição. Pelotas: Editora Pelotas, 2012. 573 p.

PEVS - Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs>>. Acesso em nov./2017.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

RIL, F. T.; LOCH, C. R.; VALDUGA, A.T.; MACEDO, S. M. D.; CICHOSKI, A. J. Nota científica: perfil bioquímico de ratos alimentados com iogurte contendo extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 332-337, 2011.

SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D. Doenças em mudas e tipos de associações entre fungos e sementes florestais. In: SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. (Ed.). **Patologia de Sementes Florestais**. Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2015, 236 p.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MONTANHA, J. A.; HEIZMANN, B. M.; ATHAYDE, M. L.; TAKETA, A. T. C.; PIRES, V. S.; GUILLAUME, D. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: ten years research on *Ilex*

saponins. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 49, p. 359-363, 1997.

SIMEÃO, R. M.; STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V.; FERNANDES, J. S. C.; NEIVERTH, D. D.; ULBRICH, A. L. Avaliação genética em erva-mate pelo procedimento BLUP individual multivariado sob interação genótipo x ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1589 - 1596, 2002.

SINDIMATERS – Sindicato da Indústria do Mate no Estado do Rio Grande do Sul. **Dados estatísticos Erva-Mate**. Porto Alegre, RS. 2016. Disponível em: <<http://sindimaters.com.br/pagina.php?cont=estatisticas.php&sel=9>> Acesso em nov. 2017.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHIMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial system. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, p. 63-121, 1991.

SOUSA, V. A.; AGUIAR, A. V.; SPOLADORE, J. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 39, p. 315-323, 2015.

SPICHIGER, R.; SAVOLAINEN, V.; MANEN, JEAN-FRANÇOIS. **Systematic affinities of Aquifoliaceae and Icacinaceae from molecular data analysis**. *Candollea*. Geneve. v. 48, n. 2, p. 459-464. 1993.

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

TEZUKA, T.; YOKOYAMA, H.; TANAKA, H.; SHIOZAKI, S.; ODA, M. Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. **HortScience**, v. 48, p. 352–356, 2013.

TOKUHISA, D.; SANTOS DIAS, D. C. F.; ALVARENGA, E. M.; HILST, P. C.; DEMUNER, A. J. Phenolic compound inhibitors in papaya seeds (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 180-188, 2007.

VIVIAN, R.; SILVA, A. A.; GIMENES JÚNIOR, M.; FAGAN, E. B.; RUIZ, S. T.; LABONIA, V. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência: breve revisão. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 695 - 706, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000300026>

YANG, Y.; ZHANG, D.; LI, Z.; JIN, X.; DONG, J. Immature Embryo Germination and Its Micropropagation of *Ilex crenata* Thunb. **HortScience**, v. 50, p.733-737, 2015.

WENDT, S. N.; SOUSA, V. A.; QUOIRIN, M.; SEBBENN, A. M.; MAZZA, M. C.; STURION, J. A. Caracterização genética de procedências e progênies de *Ilex paraguariensis* St. Hil. utilizando marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, n. 73, p. 47 - 53, 2007.

ZAMPIER, A. C. **Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).** [Dissertação de Mestrado]. UFPR, Curitiba, 2001.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva mate.** (Circular Técnica, 16). Colombo (PR): Embrapa Florestas, 1988. 8p.

CAPÍTULO 1

Caracterização fisiológica das sementes de erva-mate quanto a tolerância à dessecação

RESUMO

A germinação das sementes de erva-mate tem sido apontada como baixa, irregular e lenta, tornando a produção de mudas um grande desafio. Sabe-se que perda da viabilidade das sementes das espécies está diretamente relacionada com a tolerância à dessecação, que é avaliada a partir da determinação do teor de água mínimo suportável pelos seus tecidos. Diante disso e da escassez de estudos nessa área, justifica-se a condução de estudos que elucidem o comportamento fisiológico das sementes de erva-mate. Por isso, objetiva-se nesse capítulo classificar as sementes de erva-mate em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. Para tanto, utilizou-se o protocolo adaptado de Hong e Ellis (1996), onde as sementes de erva-mate foram desidratadas em sílica gel com auxílio de dessecador. A viabilidade foi avaliada por meio do teste de tetrazólio e o teor de água pelo método de estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24h. Após as avaliações, os resultados indicaram que as sementes de erva-mate podem ser classificadas como ortodoxas, as quais podem ser armazenadas à baixa temperatura (-18°C) e com conteúdo de água em torno de 5%, sem comprometer a viabilidade.

Palavras-chave: Ortodoxas. Viabilidade. Teor de água.

CHAPTER 1

Physiological characterization of yerba mate seeds on desiccation tolerance

ABSTRACT

The germination of the yerba mate seeds has been pointed as low, irregular and slow, making the production of seedlings a great challenge. It is known that loss of viability of the seeds of the species is directly related to the desiccation tolerance, which is evaluated from the determination of the minimum water content that can be supported by their tissues. Faced with this and the scarcity of studies in this area, it is justified to conduct studies that elucidate the physiological behaviour of the yerba mate seeds. Therefore, this chapter aims to classify the yerba mate seeds as orthodox, recalcitrant or intermediate. For this, the protocol adapted from Hong and Ellis (1996) was used, where the yerba mate seeds were dehydrated in silica gel with the aid of a desiccator. The viability was evaluated by the tetrazolium test and the water content by the greenhouse method at 105 ± 3 ° C for 24 h. After evaluations, the results indicated that mate seeds can be classified as orthodox, which can be stored at low temperature (-18°C) and low water content ($\geq 5\%$) for long periods without compromising their viability.

Keywords: Orthodox. Viability. Water content.

1. INTRODUÇÃO

Em 2016 a produção nacional de erva-mate extrativa, apresentou um crescimento em torno de 1,7% em relação a 2015, alcançando 346.953 toneladas (IBGE, 2016, p. 18). Por outro lado, a erva-mate plantada, em 2016 ocupou uma área de 77.325 hectares, produzindo em torno de 616.213 toneladas (IBGE – PAM, 2016).

A forma mais utilizada para propagação dessa espécie é por meio de sementes, por se tratar de um método com menor custo, maior domínio de produção, associado às estruturas mais baratas em relação à propagação via estaquia (WENDLING; BRONDANI, 2015, p. 13).

Nem todas as sementes são tolerantes à dessecação, exigindo condições especiais de armazenamento (HONG et al., p. 1996). Desta forma, de modo geral as sementes apresentam distintos comportamentos quanto à perda de água no final da maturação, os quais foram estudados por Roberts (1973, p. 501), que classificou as sementes em ortodoxas e recalcitrantes, mais tarde Ellis et al. (1990, p. 1173) introduziram as intermediárias. Nesse sentido, consideram-se recalcitrantes, as sementes perdem sua viabilidade quando atingem seu nível crítico de água (15% a 35%). Por outro lado, as sementes ortodoxas toleram dessecação a baixos (2% a 5%) conteúdos de água (ROBERTS, 1973, p. 501). Sementes intermediárias são sensíveis a temperaturas inferiores a zero (HONG; ELLIS, 1996, p. 53) e toleram dessecação parcial até em torno de 10% a 12,5% de teor de água (ELLIS et al., 1990, p. 1173).

No que se refere ao comportamento fisiológico das sementes de espécies do gênero *Ilex*, há poucos trabalhos, os quais apontam que as espécies da família Aquifoliaceae normalmente possuem sementes ortodoxas (ELLIS et al., 1987, p. 29). Em estudos realizados por Mayrinck et al. (2016, p. 90), sementes das espécies *Ilex brevicuspis* Reissek e *I. cerasifolia* Reissek apresentaram comportamento intermediário. Com relação a *I. paraguariensis*, Medeiros e Silva (2001, p. 44), concluíram que as sementes dessa espécie apresentam tolerância à dessecação e podem ser enquadradas no grupo das ortodoxas.

Com base na divergência de informações sobre o comportamento fisiológico das sementes do gênero *Ilex*, objetiva-se neste capítulo classificar as sementes de erva-mate em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Florestas (Colombo – PR), no Laboratório de Sementes Florestais.

2.2 Obtenção das sementes

Sementes de quinze matrizes de erva-mate da safra 2016/2017, provenientes de Chapecó (SC) - 27° 05' 47" S/52° 37' 06" W - da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), foram doadas para a execução desse experimento. As sementes foram coletadas em meados de março/2017 e recebidas no final do mesmo mês pelo laboratório de Sementes Florestas da Embrapa Florestas. As sementes estavam acondicionadas em saco do tipo *kraft*, laminado por dentro. Logo após o recebimento, foram colocadas em embalagem de vidro hermeticamente fechado e mantidas em câmara com temperatura de 10°C e umidade relativa de 25%, apresentando viabilidade de 83% e teor de água 11,8%.

2.3 Classificação das sementes quanto a tolerância à dessecação

A classificação fisiológica das sementes quanto ao comportamento durante a secagem foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Hong e Ellis (1996, p. 17), revisto por Sacandé et al. (2004, p. 345) e adaptado neste trabalho (Figura 7).

Para a dessecação das sementes, utilizou-se 200 gramas de sílica gel colocada no fundo de dessecadores com capacidade de 2L, os quais foram acondicionados em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), regulada para 25°C.

Após a estabilização da umidade relativa do ar no interior de cada dessecador (25%), foi depositada a placa de porcelana perfurada, sobre a qual permaneceram recipientes contendo cinco amostras com 30 gramas cada de sementes de erva-mate até o estabelecimento do equilíbrio higroscópico entre a água contida nas sementes e a umidade relativa do ar proporcionada pela sílica gel.

Durante a dessecação em sílica gel, a massa das sementes foi avaliada a cada meia hora até atingir 8% de conteúdo de água e da mesma forma, até atingir 5% de conteúdo de água. Ao atingirem tais percentuais, as sementes foram avaliadas quanto a viabilidade e teor de água, conforme determina o protocolo. Ao atingirem 5% de conteúdo de água e mais de 50% de viabilidade, o remanescente das sementes dessecadas foi armazenado em freezer (-18°C) em vidro hermeticamente fechado durante 3 meses.

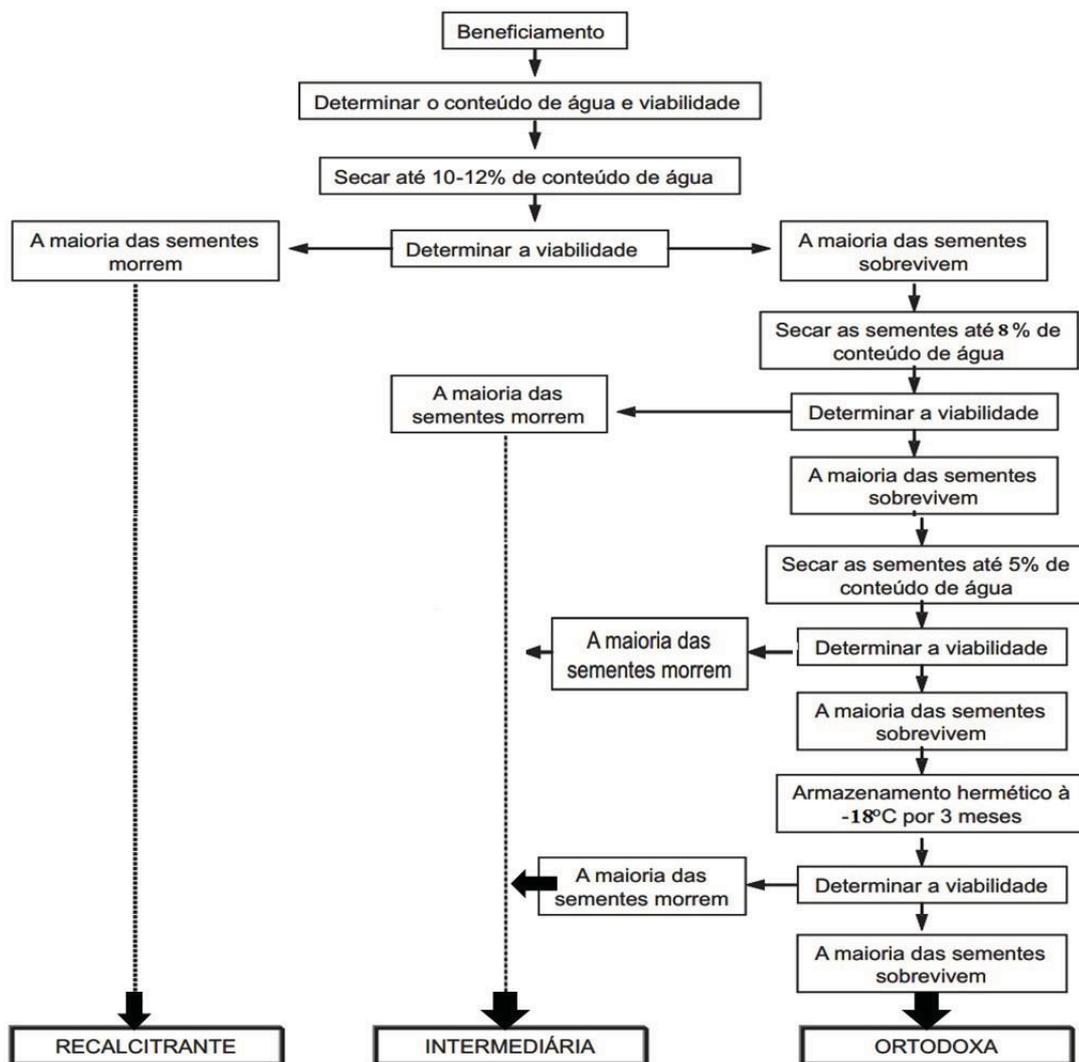


FIGURA 7. ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO ADAPTADO UTILIZADO PARA A CLASSIFICAÇÃO FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ERVA-MATE QUANTO À TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E AO ARMAZENAMENTO.

FONTE: HONG; ELLIS (1996, P. 17).

Após esse período, as sementes remanescente (armazenadas em freezer -18°C), foram avaliadas por meio dos testes de viabilidade e monitoramento do conteúdo de água para conclusão do protocolo. Utilizou-se a expressão proposta por IPGRI/DFSCI (2000, p. 349), adaptada por José et al. (2007, p. 173), para a estimativa

do conteúdo de água pela diferença de massa, a cada 30 minutos até obter a umidade alvo:

$$M = \frac{(100 - CAi)}{(100 - CAd)} \times Mi, \text{ onde:}$$

M: massa (g) no conteúdo de água desejado

Mi: massa (g) no conteúdo de água inicial

CAi: conteúdo de água inicial (% base úmida)

CAd: conteúdo de água desejado (% base úmida)

2.4 Determinação do teor de água²

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24h, conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Entretanto, utilizaram-se 150 sementes de erva-mate com seis repetições de 25 sementes, sendo considerada para cálculos a média das seis repetições.

2.5 Avaliação da viabilidade das sementes

O teste do tetrazólio (TZ) foi aplicado para determinar a viabilidade dos embriões ao longo dos períodos de exposição à secagem, seguindo metodologia sugerida por Catapan (2008, p. 28-29), em que o preparo das sementes para o TZ foi realizado em quatro etapas:

I - Pré-condicionamento: 100 sementes (quatro repetições de 25 sementes), foram imersas em água destilada a temperatura de 30°C por 24 h; II - Exposição dos tecidos para coloração: as sementes foram cortadas longitudinalmente, próximo ao eixo embrionário, com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico, sendo que apenas a parte da semente que abrigava o embrião foi imersa para coloração dos tecidos em solução de TZ; nesta etapa foram descartadas as sementes vazias; III - Coloração: as partes das sementes contendo o embrião foram imersas na solução de TZ com concentração de 0,1%, por 24h a 35°C , no escuro; IV - Avaliação: as sementes foram

² Segundo Marcos-Filho (2015, p. 218-221), “a proporção da substância água, em uma estrutura como a das sementes, é definida pelo teor de água, cuja dimensão pode ser expressa pelo grau de umidade, permitindo o estabelecimento de comparações entre o comportamento de sementes que contenham diferentes quantidades de água.” Assim, nesse trabalho será utilizada a expressão “teor de água”, indicando o “grau de umidade das sementes”.

lavadas em água destilada e avaliadas quanto à intensidade da coloração e consistência dos tecidos para se obter sua viabilidade. Consideraram-se viáveis as sementes cujo endosperma e embrião encontravam-se com a coloração rosa ou vermelho claro e inviáveis as sementes de cor púrpura e de cor branca (Figura 8).

2.6 Análise dos dados

Os dados foram interpretados de acordo com protocolo de classificação estabelecido por Hong e Ellis (1996, p. 17) revisto por Sacandé et al., (2004, p. 345) e adaptado no presente trabalho (Figura 7).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água das sementes de erva-mate (Tabela 1) no tempo 0 (zero) foi de 11,6% e sua viabilidade avaliada pelo teste de tetrazólio apresentava-se em 80%, sendo que a maioria dos embriões se encontravam no estágio de coração.

Após duas horas de secagem em sílica gel, as sementes atingiram 8% de água, porém, a viabilidade foi reduzida a 58%. Passadas quatro horas as sementes de erva-mate atingiram 5,6% de água e novamente sua viabilidade foi reduzida, agora para 52%. Segundo Nogueira et al. (2001, p. 268), para algumas espécies como *Cedreia fissilis* Vell., o teor de água das sementes também foi reduzido após secagem em sílica gel, porém, sem prejudicar a qualidade fisiológica das sementes.

Assim, como a maioria das sementes apresentou-se viável nessas condições de secagem, prosseguiu-se com a execução dos procedimentos descritos no protocolo, pelo qual o remanescente das sementes dessecadas até 5,6% de teor de água foram depositadas em vidro fechado, e, mantidas em condições de freezer a -18°C e 44% de UR (umidade relativa), durante três meses.

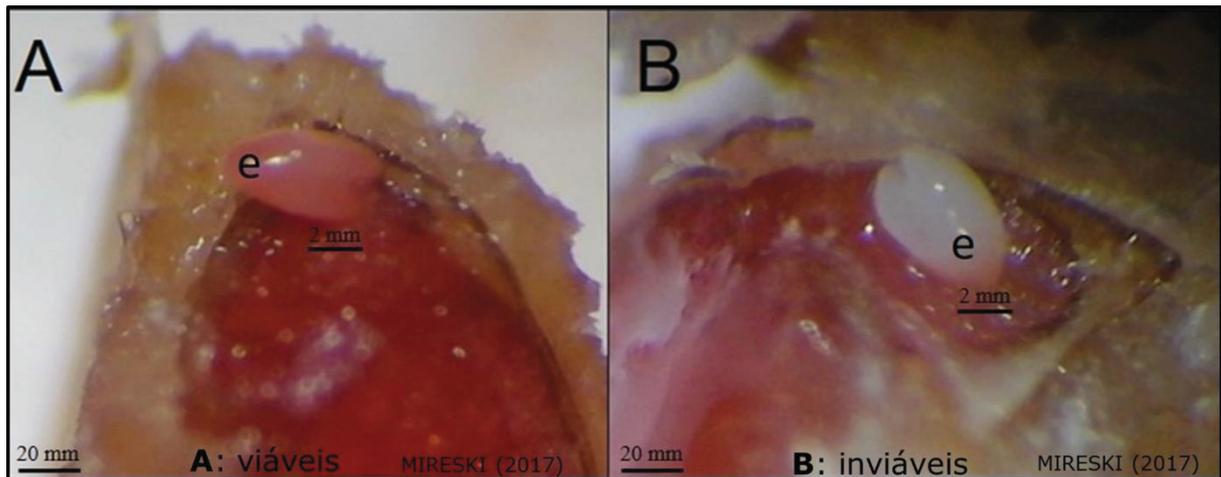


FIGURA 8: VIABILIDADE DOS EMBRIÕES DA SEMENTE DE ERVA-MATE: (A) VIÁVEL; (B) INVIÁVEL.

FONTE: O autor (2017).

TABELA 1. AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE VIABILIDADE, DO TEOR DE ÁGUA E DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES DE ERVA-MATE AO LONGO DA DESSECAÇÃO EM SÍLICA GEL E DE TRÊS MESES DE ARMAZENAMENTO (-18°C)

TEMPO 0		VIABILIDADE		TEOR DE ÁGUA
ESTÁDIOS	TOTAL	VIÁVEIS	INVIÁVEIS	
Globular	09	03	06	11,6%
Coração	57	52	05	
Pós-coração	34	25	09	
%	100	80	20	

TEMPO 2 HORAS		VIABILIDADE		TEOR DE ÁGUA
ESTÁDIOS	TOTAL	VIÁVEIS	INVIÁVEIS	
Globular	09	04	05	8,0%
Coração	56	33	23	
Pós-coração	35	21	14	
%	100	58	42	

TEMPO 4 HORAS		VIABILIDADE		TEOR DE ÁGUA
ESTÁDIOS	TOTAL	VIÁVEIS	INVIÁVEIS	
Globular	04	00	04	5,6%
Coração	59	27	32	
Pós-coração	37	25	12	
%	100	52	48	

TEMPO 3 MESES		VIABILIDADE		TEOR DE ÁGUA
ESTÁDIOS	TOTAL	VIÁVEIS	INVIÁVEIS	
Globular	00	00	00	9,1%
Coração	34	15	19	
Pós-coração	66	36	30	
%	100	51	49	

FONTE: O autor (2018).

Após três meses de armazenamento em embalagem hermética no freezer (-18 °C), novamente avaliou-se a viabilidade, a qual resultou em 51% apresentando as sementes com os embriões em sua maioria no estágio de desenvolvimento pós-coração.

Já o teor de água, aferido logo após a retirada das sementes do freezer foi de 9,1%, provavelmente devido a embalagem inadequada, utilizada para armazenar as sementes dentro do freezer por 90 dias. Pois, apesar da embalagem de vidro estar fechada hermeticamente, ela não foi adequada, pois seu tamanho foi desproporcional à quantidade de sementes, permitindo assim, o acúmulo de ar. Pressupõe-se que o ar acumulado dentro da embalagem tenha influenciado no teor de água durante os 3 meses de armazenamento em freezer a -20 °C.

Em futuros estudos, sugere-se retirar completamente o ar da embalagem em que as sementes forem acondicionadas, para que se possa averiguar se a estocagem das sementes de erva-mate em baixas temperaturas, aliada a baixas tensões de oxigênio, retardam os processos degenerativos, prolongando assim a sua viabilidade, como sugerem Cunha e Ferreira (1987, p. 975).

O armazenamento em baixas temperaturas mantém as semente em criptobiose, ou seja, em um estado de parada do crescimento do embrião, pela redução do metabolismo ativo (FAIT et al., 2006, p. 839). Baixos teores de água reduzem a taxa metabólica das sementes resultando na manutenção da viabilidade durante o armazenamento. Entretanto, as sementes de erva-mate ao absorverem umidade, enquanto estavam armazenadas durante três meses em -18°C, desencadearam sinais internos em nível molecular, que possivelmente induziram a ativação de compostos ou reações metabólicas responsáveis pelo crescimento do embrião.

De acordo com os resultados observados, antes de serem armazenadas no frio durante os três meses, as sementes apresentavam 59% dos embriões no estágio coração. Após o tempo de armazenamento, verificou-se que haviam apenas 34% de embriões nesse estágio. Ou seja, supõe-se que houve um lento desenvolvimento embrionário, pois ao final dos três meses de armazenamento haviam 29% a mais de embriões em estágio pós-coração em relação ao início da armazenagem.

Seguindo a metodologia sugerida por Hong e Ellis (1996, p. 17) revista por Sacandé et al., (2004, p. 345) e seguida no presente trabalho, observa-se pelos resultados obtidos que as sementes de erva-mate apresentam em torno de 11% a

12% de conteúdo de água inicial em ambiente natural, suportam dessecação até 5,6% de teor de água e podem ser armazenadas a temperaturas inferiores a zero (-18°C) sem perderem consideravelmente a sua viabilidade por pelo menos três meses.

Assim, as sementes de erva-mate não podem ser consideradas recalcitrantes, pois a este grupo de sementes pertencem aquelas cujo nível crítico de água está acima dos 15%. Da mesma forma, não podem pertencer a classe intermediária, pois neste grupo encontram-se as sementes que toleram dessecação parcial até em torno de 10% de teor de água e são sensíveis a temperaturas inferiores a zero (HONG; ELLIS, 1996, p. 53). Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com as conclusões de Medeiros e Silva (2001, p. 44).

4 CONCLUSÕES

Sementes de erva-mate apresentam tolerância à dessecação e podem ser classificadas como ortodoxas.

5 REFERÊNCIAS

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 2009, 399 p.

CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** [Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais]. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998, 97 p.

CUNHA, G. G.; FERREIRA, A. G. Viabilidade de sementes de erva-mate. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 39, n. 10, p. 974-976, 1987.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour. In: *Coffee*. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 41, n. 230, p.1167-1174, 1990.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. The development of desiccation-tolerance and maximum seed quality during seed maturation in six grain legumes. **Annals of Botany**, v. 59, n. 1, p. 23-29, 1987.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, n. 142, p. 839-854, 2006.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behaviour. (Technical Bulletin n. 1). In: ENGELS, J. M. M.; Toll, J. (Eds.) **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy, 1996, 62 p.

HONG, T.D.; LININGTON, S.; ELLIS, R.H. **Seed storage behaviour: a compendium**. International Plant Genetic Resources Inst. (IPGRI), Rome, Italy, 1996, 115 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2016**. Rio de Janeiro, v. 30, p.1-48, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção Agrícola Municipal – PAM – 2016**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em nov. 2017.

IPGRI-DFSC (International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; and Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark). **The Desiccation and Storage Protocol**. In: SACANDE, M.; JOKER, D.; EHSAN DULLOO, M.; K.A. THOMSEN, K. A. (eds). *Comparative Storage Biology of Tropical Tree Seeds*. Earthprint Rome, Italy, 2004, 363 p.

JOSÉ, A. C.; SILVA, E. A.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes de cinco espécies arbóreas de mata ciliar quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 171-178, 2007.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed., Londrina, ABRATES, 2015, 660 p.

MAYRINCK, R. C.; VAZ, T. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no armazenamento. **CERNE**, Lavras, v. 22, n. 1, p. 85-92, 2016.

MEDEIROS, A. C. S.; SILVA, L. C. Efeitos da secagem na viabilidade das sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 35-46, 2001.

NOGUEIRA, E. S.; WANDERLEY, J. M.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Tolerância de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell. – Meliaceae) à dessecação. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 268, 2001.

NOGUEIRA, N. W.; TORRES, S. B.; FREITAS, R. M. O. F. Teste de tetrazólio em sementes de timbaúba. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 2967-2976, 2014.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, University of Reading, Earley Gate, U.K. v. 1, p. 499-514, 1973.

SACANDÉ, M.; JOKER, D.; DULLOO, M. E.; THOMPSEN, K. A. **Comparative storage biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. 363 p.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. **Produção de mudas de erva-mate.** In: Ivar Wendling; Delmar Santin. (Org.). Propagação e nutrição de erva-mate. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 11-98, 2015. 195 p.

CAPÍTULO 2

Polifenóis totais, bioensaio e histoquímica em sementes frescas, desidratadas e estratificadas de erva-mate

RESUMO

Pesquisas revelam que compostos fenólicos inibem a germinação de sementes por interferirem no metabolismo energético e nos processos biossintéticos dos embriões das sementes. Nesse aspecto, este capítulo objetivou, quantificar os polifenóis totais em sementes de erva-mate: frescas (SF); desidratadas durante setenta dias (SD) e estratificadas em areia durante 180 dias (SE); avaliar o potencial inibidor de germinação dos extratos em água, etanol/água (1:1) e etanol (99%), oriundos das sementes (SF, SD e SE) de erva-mate sobre a germinação e crescimento de plântulas de alface e verificar a presença de polifenóis em sementes frescas de erva-mate através de métodos histoquímicos. Para isso, utilizou-se a reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico para construção da curva de calibração. Após a obtenção da curva de calibração, foram utilizados os dados da equação da reta para calcular a quantidade de polifenóis totais. No bioensaio utilizaram-se extratos provenientes de sementes de erva-mate sobre a germinação de alface e na análise histoquímica, efetuaram-se secções em sementes de erva-mate, as quais foram coradas com corantes específicos. Concluiu-se que, em sementes frescas de erva-mate há uma maior concentração de compostos fenólicos, sendo reduzida nas sementes desidratadas e quase nula em sementes estratificadas. Os compostos fenólicos presentes nos extratos provenientes de sementes de erva-mate interferem na germinação das sementes e no desenvolvimento radicular das plântulas de alface. Na análise histoquímica das sementes de erva-mate foi evidenciada a presença de barreira rugosa lignificada entre o endocarpo e o tegumento.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Antioxidantes. Lignina.

CHAPTER 2

Total polyphenols, bioassay and histochemistry in fresh, dehydrated and stratified of yerba mate seeds

ABSTRACT

Research has shown that phenolic compounds inhibit up to 50% of germination by interfering with energy metabolism and biosynthetic processes of seed embryos. In this aspect, this chapter aimed to quantify the total polyphenols in yerba mate seeds: fresh (SF); dehydrated for seventy days (SD) and stratified in sand for 180 days (SE); (1: 1) and ethanol (99%), from the seeds (SF, SD and SE) of yerba mate on the germination and growth of lettuce seedlings and to verify the presence of polyphenols in fresh yerba mate seeds by histochemical methods. For this, the oxidation reaction with Folin-Ciocalteu reagent and gallic acid was used to construct the calibration curve. After obtaining the calibration curve, the data of the equation of the line were used to calculate the amount of total polyphenols. In the bioassay extracts were obtained from yerba mate seeds on lettuce germination and on histochemical analysis, sections were done on yerba mate seeds, which were stained with specific dyes. It was concluded that in fresh seeds of yerba mate there is a higher concentration of phenolic compounds, being reduced in dehydrated seeds and almost null in stratified seeds. The phenolic compounds present in extracts from yerba mate seeds interfere with seed germination and root development of lettuce seedlings. In the histochemical analysis of yerba mate seeds, the presence of a lignified rugged barrier between the endocarp and the tegument was evidenced.

Keywords: *Ilex paraguariensis*. Antioxidants; Lignin.

1. INTRODUÇÃO

Nativa da América do Sul, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St Hil.), ainda é tradicionalmente consumida em forma de bebida (chimarrão, tererê e chá mate). Entretanto, a espécie é explorada também para fins estéticos, fitoterápicos e culinários (FREITAS et al., 2011, p. 103). Devido à diversidade de usos, a espécie tem atraído os mercados mundiais interessados pela descoberta de novos produtos, derivados da espécie, elevando em 11%, em 2016 a sua exportação para países como o Uruguai, Chile, Alemanha, França e Estados Unidos da América (MDIC, 2016).

A Europa, Estados Unidos, Síria e Japão importam folhas de erva-mate e as transformam em extrato vegetal, para utilização em formulações fitoterápicas (RIL et al., 2011 p. 333) em função das características químicas presentes nessa matéria-prima (CARDUCCI et al., 2000 p.1172). Bebidas à base de erva-mate, apresentam propriedades antioxidantes devido aos ácidos fenólicos presentes em altas concentrações. Assim, a ingestão de um extrato aquoso de erva-mate poderia suprir quantidades significativas de compostos antioxidantes, aumentando as defesas do organismo humano contra o ataque de radicais livres (SANTOS et al., 2014, p. 78).

Para abastecer o mercado nacional e internacional são necessárias mudas com qualidade genética, fisiológica e sanitária a fim de gerar plantas produtivas e com elevado padrão da matéria-prima. Contudo, a produção de mudas seminais de erva-mate, ainda é um grande entrave, principalmente pela baixa, desuniforme e lenta germinação de suas sementes.

Sementes do gênero *Ilex*, na época da dispersão possuem embriões imaturos, necessitando de longo período de estratificação para que as sementes se tornem passíveis de germinarem (CATAPAN, 1998; CUQUEL et al., 1994; FOWLER; STURION, 2000). No processo de estratificação conserva-se a umidade das sementes, ao mesmo tempo em que se abaixa a tensão de oxigênio e eleva-se a de CO₂, proporcionando as condições adequadas de temperatura e umidade, formando um ambiente ideal para o desenvolvimento integral do embrião (CUNHA; FERREIRA, 1987, p. 975).

Embora a estratificação promova o desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate, este processo é muito longo, em torno de seis meses. Métodos mais práticos e expeditos são necessários para que a produção de mudas seminais seja mais rápida, fácil e eficiente. Para isso, são necessárias pesquisas que elucidem os

mecanismos de desenvolvimento que ocorrem no interior da semente durante a estratificação para então propor soluções que sobreponham a estratificação.

Há ainda uma série de questões que envolvem os mecanismos morfofisiológicos da dormência das sementes de erva-mate que ainda não foram investigados. Entre eles, a possibilidade de inibidores da germinação, como os compostos fenólicos.

Nesse sentido, estudos realizados por Medeiros et al., (1997, p. 418 - 419), apontaram diferenças significativas entre os conteúdos fenólicos, extraídos das sementes de erva-mate provenientes de Iguatemi - MS e Guarapuava - PR, pelo método de Hartree. Nas espécies *Ilex rotunda* Thunb. e *I. latifolia* Thunb., Tezuka et al., (2013, p. 354), verificaram a presença de polifenóis nas estruturas do embrião e do endosperma.

Maciel et al. (1992, p. 3) trabalhando com sementes florestais, concluíram que a inibição promovida pelos fenóis é variável de acordo com sua localização na semente. Já Diapp (1984, p. 119) levanta a hipótese da existência de inibidores da germinação na semente de erva-mate, conforme já havia se referido Wareing (1965, p. 915), que afirma que a dormência de sementes, genericamente, é função da proporção entre promotores e inibidores endógenos.

Para Menezes et al. (2009, p. 38), a presença de compostos fenólicos no tegumento pode controlar a entrada de oxigênio no interior da semente, pois estes fixam o O₂ que a semente está absorvendo, impedindo a chegada deste no seu interior. Além disso, Tokuhisa et al. (2007, p. 181) mencionam que substâncias de diferentes categorias químicas podem ser encontradas em sementes de várias espécies, interferindo no processo germinativo.

Ademais, Bewley e Black (1994, p. 73) sugerem que o contato com um substrato úmido reduz a influência dos inibidores de germinação devido a sua lixiviação. Assim, supõe-se que ao longo do processo de estratificação das sementes de erva-mate ocorra a lixiviação dos inibidores da germinação ou ainda, que alguns métodos de secagem possam promover a volatilização destes compostos, como sugerido por Fadimu et al. (2014, p. 60), considerando uma das alternativas ao longo período de estratificação.

Presentes nas estruturas das sementes, alguns compostos químicos determinam o vigor das plântulas durante o processo de germinação, uma vez que podem ser mobilizados dos tecidos de reserva e utilizados como combustível

energético (CORTE et al., 2008, p. 642), já outros podem inibir ou retardar a germinação das sementes. Nessa perspectiva, estudos histoquímicos são importantes ferramentas na elucidação da composição e organização celular. Porém, há poucos estudos referentes aos aspectos histoquímicos de sementes florestais e sua correlação com o processo de germinação (OLIVEIRA et al., 2012).

Na detecção de inibidores da germinação, o bioensaio utilizando sementes de alface, tem sido apontado como um método eficiente (PEREIRA et al., 2002, p. 308), uma vez que, sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) são indicadores eficientes, empregados para a detecção do efeito fitotóxico, pela sensibilidade a vários aleloquímicos (AUMONDE et al., 2013, p. 3182).

Diante disso, objetivou-se quantificar os polifenóis totais em sementes de erva-mate: frescas (SF); desidratadas durante setenta dias (SD) e estratificadas em areia durante 180 dias (SE); avaliar o potencial inibidor de germinação dos extratos em água, etanol/água (1:1) e etanol (99%), oriundos das sementes (SF, SD e SE) de erva-mate sobre a germinação e crescimento de plântulas de alface e verificar a presença de polifenóis em sementes frescas de erva-mate através de métodos histoquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Florestas (Colombo – PR), nos seguintes laboratórios: **Laboratório de Tecnologia de Produtos Florestais Não-Madeiráveis**: quantificação do teor total de compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu adaptado de Frizon et al. (2015, p. 796), para sementes de erva-mate. **Laboratório de Patologia Florestal**: análise histoquímica das sementes de erva-mate. **Laboratório de Sementes Florestais**: bioensaio. **Laboratório de Propagação de Espécies Florestais**: estratificação das sementes em estufa.

2.2 Obtenção das sementes e caracterização das amostras

Frutos de erva-mate da safra 2016/2017 provenientes de Colombo-PR (25°20' S e 49°14' W, 950 m) e Ivaí-PR (25°1'8.64 "S e 50°49'13.29", 750 m), foram obtidos

de 15 árvores matrizes, obedecendo a distância mínima de 100 metros entre elas. Os frutos maduros (roxo-avermelhados) foram despolpados por meio de maceração em água corrente. Em seguida, as sementes permaneceram sobre peneiras durante 24 horas para a perda do excesso de água do processo de despolpa. Logo após as sementes foram acondicionadas em vidros hermeticamente fechados em câmara com temperatura de 10°C e umidade relativa de 25%.

As sementes foram separadas em dois lotes: (1) Ivaí e (2) Colombo para a realização dos testes propostos.

2.2.1 Amostra 1: sementes de erva-mate frescas (SF)³

Sementes provenientes da despolpa dos frutos de erva-mate, foram acondicionadas em vidros hermeticamente fechados em câmara com temperatura de 10°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 25% ($\pm 5^\circ\text{C}$) por 30 dias.

2.2.2 Amostra 2: sementes desidratadas durante 70 dias (SD)

Sementes de erva-mate foram colocadas em fina camada dentro de bandeja plástica aberta e depositadas em prateleira com livre circulação de ar na câmara em condições de 10°C de temperatura e 25% de umidade relativa (UR) durante 70 dias. Aos setenta dias o teor de água destas sementes foi de 5,7%.

2.2.3 Amostra 3: sementes estratificadas em areia durante 180 dias (SE)

O método de estratificação foi adaptado de Zanon (1988, p. 6 - 7) e consistiu na distribuição de uma camada de sementes entre duas camadas de areia. Para isso, utilizaram-se caixas pretas de polietileno com fundo perfurado, nas dimensões 12cm x 15cm x 30cm (profundidade, largura, comprimento). Como substrato, a areia grossa foi colocada no fundo de cada caixa até 4 cm e sobre ela uma fina camada de sementes de erva-mate (30 g), acondicionadas em envelope de sombrite. Recobrimo

³ Sementes desta amostra (Amostra 1) foram armazenadas hermeticamente a 10°C e 25% de UR, durante trinta dias. Após esse período realizaram-se as análises. Tais amostras, neste trabalho, foram denominadas de "Sementes Frescas".

o envelope de sombrite, outra camada de 4 cm de areia. As caixas foram acondicionadas em estufa com irrigação automatizada e sem controle de temperatura, durante seis meses.

Todos os procedimentos abaixo descritos foram igualmente executados para os três tipos de amostras: Sementes Frescas (SF); Sementes Desidratadas durante 70 dias (SD) e Sementes Estratificadas em areia durante 180 dias (SE).

2.3 Preparo da amostra

Para a análise dos compostos fenólicos, as sementes de erva-mate (denominadas amostras), foram trituradas em liquidificador de bancada e em seguida foram preparados os extratos.

2.4 Preparo dos extratos

Cinco gramas de sementes (anteriormente trituradas) de cada amostra, foram depositadas em tubos de centrifugação tipo *Falcon*. Em seguida, foram adicionados separadamente 25mL de cada solvente: (etanol 100%; etanol+água (1:1) e água (80°C)). Em seguida, os tubos *Falcon* foram envoltos individualmente em papel alumínio e ultrasonicados a 30°C durante 30 minutos e depositados em ambiente escuro, em temperatura ambiente, durante 24 horas. Após, os extratos foram filtrados e avolumados em balões volumétricos para 25 mL, com seus respectivos solventes. Cada extrato foi preparado em duplicata.

2.5 Solução tampão de carbonato de sódio (15%)

Quinze gramas de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram dissolvidos em água ultrapura e avolumados com a mesma água, em balão, para 100 mL. Após, essa solução foi filtrada em funil com papel de filtração rápida, para um frasco. Em seguida, reservada em temperatura ambiente.

2.6 Solução ácido-gálico

Pesou-se 0,1 gramas de ácido gálico ($C_7H_6O_5$) e dissolveu-se em água ultrapura. Em seguida avolumou-se com a mesma água, em balão, para 100 mL.

2.7 Solução branco

Utilizou-se essa solução na calibração do espectrofotômetro, antes da leitura das amostras, cuja função é zerar o equipamento de qualquer resíduo fenólico que possa estar aderido às paredes das cubetas. Assim, para o preparo, pipetaram-se 10 mL da solução tampão e adicionaram-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteu. Em seguida o balão foi avolumado para 50 mL com água ultrapura.

2.8 Solução para determinação de compostos fenólicos nas sementes

Em balão de 10mL foram adicionados 100 μ L da amostra, 500 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e 200 μ L de Carbonato de sódio (15%) e avolumado com água ultrapura. Em seguida os balões foram agitados em vórtex durante 1 minuto e permaneceram no escuro durante duas horas para que ocorra o tempo da reação. Esta solução foi preparada em triplicata para cada amostra.

2.9 Curva de calibração

Em balões volumétricos de 10mL foram adicionadas alíquotas da solução padrão de ácido gálico, de modo a se obter soluções com diferentes concentrações, conforme a Tabela 2, juntamente com 500 μ L do reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida foram adicionados 2mL de solução tampão, em seguida o balão foi avolumado com água ultrapura e agitado por 1 minuto.

TABELA 2. CURVA PADRÃO DO ÁCIDO GÁLICO

Solução padrão (C ₇ H ₆ O ₅) (μL)	Folin Ciocalteu (μL)	Solução Tampão (Na ₂ CO ₃) (mL)
150	500	2,00
200	500	2,00
300	500	2,00
400	500	2,00
500	500	2,00
600	500	2,00
700	500	2,00
800	500	2,00
900	500	2,00
1000	500	2,00

FONTE: O autor (2018).

As soluções contendo as diferentes concentrações de ácido gálico foram deixadas em repouso ao abrigo da luz por duas horas e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-vis (SHIMADZU UV-1800) a 760nm, adaptado de Horžić et. al., (2009, p. 442).

2.10 Polifenóis totais

A determinação da concentração de polifenóis totais nos extratos aquosos de erva-mate elaborados foi realizada por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu (FRIZON et al., 2015, p. 796), o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis. As leituras em triplicata da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (UV-vis (SHIMADZU UV-1800)) em comprimento de onda de 760 nm, conforme o método adaptado de Horžić et. al., (2009, p. 442). Utilizou-se como padrão o ácido gálico, nas concentrações de 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 mg.L⁻¹ para construir a curva de calibração. Após a obtenção da curva de calibração, foram utilizados os dados da equação da reta para calcular a quantidade de polifenóis totais, os quais foram expressos em mg.L⁻¹ equivalente em ácido gálico.

2.11 Cálculos para quantificação dos teores de polifenóis totais

2.11.1 Equação da reta

Após a obtenção da curva de calibração, foram utilizados os dados da equação da reta para calcular a quantidade de polifenóis totais, os quais foram expressos em mg.L^{-1} equivalente em ácido gálico.

2.11.2 Valor em gramas da amostra que terá no volume do extrato

$$X_1 (\text{g}) = (0,1) * (5) / (25).$$

2.11.3 Compostos fenólicos totais equivalentes em ácido gálico

$$Y_1 (\text{mg}) = (10) * (\text{concentração ajustada pela equação da curva de calibração}) / 1000.$$

2.11.4 Compostos fenólicos totais, equivalente em ácido gálico em mg.L^{-1}

$$Z_1 (\text{mg.L}^{-1}) = Y_1 / X_1$$

2.12 Análise histoquímica

Nas análises histoquímicas foram utilizadas 100 sementes frescas de erva-mate, as quais foram previamente hidratadas em água durante 24 horas, a 35°C . Após, foram realizados cortes à mão livre com auxílio de lâmina de barbear e, posteriormente, procedeu-se o tratamento das secções com diferentes corantes específicos, sendo: Safranina e Azul de Astra, uma dupla coloração para parede celulósica (azul) e parede lignificada ou suberificada (vermelho); Cloreto de ferro III, Vanilina Clorídrica e Floroglucina Ácida para compostos fenólicos (marrom), segundo metodologias propostas por Ventrella et al. (2013, p. 31 - 35). As secções foram montadas em lâminas semipermanentes e o material foi observado em microscópio óptico (Carl Zeiss AxioLab. A1) e fotografado com câmera digital (Sony Cyber Shot Lens G).

2.13 Bioensaio

Para o bioensaio, foram utilizadas sementes de alface crespa *Grand Rapids*, adquiridas no comércio local e extratos elaborados a partir de sementes frescas (SE), desidratadas (SD) e estratificadas (SE) de erva-mate em solventes (etanol, etanol + água e água) conforme descrito anteriormente. Considerou-se extrato bruto com 100% de concentração, o conteúdo líquido do balão de 25mL, cuja concentração não

foi utilizada por causar inibição total da germinação de sementes de alface, observada em pré-teste. A partir disso, optou-se em diluir as soluções para 50% de concentração. O pH dos extratos foi determinado com peagâmetro GENAKA (PG 1800), seguindo instruções do fabricante, assim como o potencial osmótico que foi medido em todos os extratos. O efeito destas concentrações foi comparado com o de água destilada, considerada como testemunha (concentração 0%).

A porcentagem de germinação foi calculada pela fórmula proposta por Labouriau e Valadares (1976, p. 272): $\%G = NG \times 100\% / NT$, onde: NG é o número de sementes germinadas e NT o número de sementes colocadas para germinar. Já o índice de velocidade de germinação foi calculado por: $IVG = G1/N1 + G2/N2 + G3/N3... + Gn/Nn$, onde IVG = índice de velocidade de germinação; G1 = número de sementes germinadas na leitura 1; N1 = número de dias transcorridos a partir da semeadura (HOFFMANN et al., 2007, p. 13).

O teste de germinação foi conduzido em caixas plásticas do tipo gerbox, com quatro repetições de 50 sementes, as quais foram umedecidas com as diferentes soluções, com volume de 2,5 vezes o peso de dois papéis filtro. Os gerbox foram acondicionados em câmara de germinação (BOD), com temperatura a 25°C no escuro, durante sete dias. A avaliação foi realizada com as contagens diárias sempre no mesmo horário, de 12 em 12 horas, a partir da emissão da radícula com comprimento de no mínimo 2,0 mm de comprimento (MACIAS et al., 2000, p. 2519). Dentre os vários critérios adotados para caracterizar a germinação, a emissão da radícula com comprimento de no mínimo 2,0 mm (MACIAS et al., 2000, p. 2519), é adotada em vários estudos referentes às sementes de alface (SOUZA et al., 2005, p. 32; FERREIRA et al., 2007, p. 1055; GUSMAN et al., 2008, p. 120; COELHO et al., 2011, p. 3183; PAULA et al., 2015, p. 446), pois, segundo Hartmann et al., (2001, p. 347) esta é a primeira evidência da germinação.

Aos sete dias após a instalação do teste, foi realizada a avaliação das plântulas, classificando-as em normais ou anormais e com auxílio de uma régua foi mensurado o comprimento (cm) do hipocótilo e da radícula.

Foi utilizado o delineamento em esquema fatorial (3 x 2 x 3), compreendendo respectivamente a procedência, os extratos e as amostras, totalizando 18 tratamentos com quatro repetições de 50 sementes cada.

2.14 Análise estatística dos dados

As variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett, e as variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste F tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação das absorbâncias obtidas através do preparo da solução padrão de ácido gálico avaliado em diferentes concentrações, conforme o item 2.9 (Tabela 2), resultou na curva analítica de compostos fenólicos totais (Figura 9).

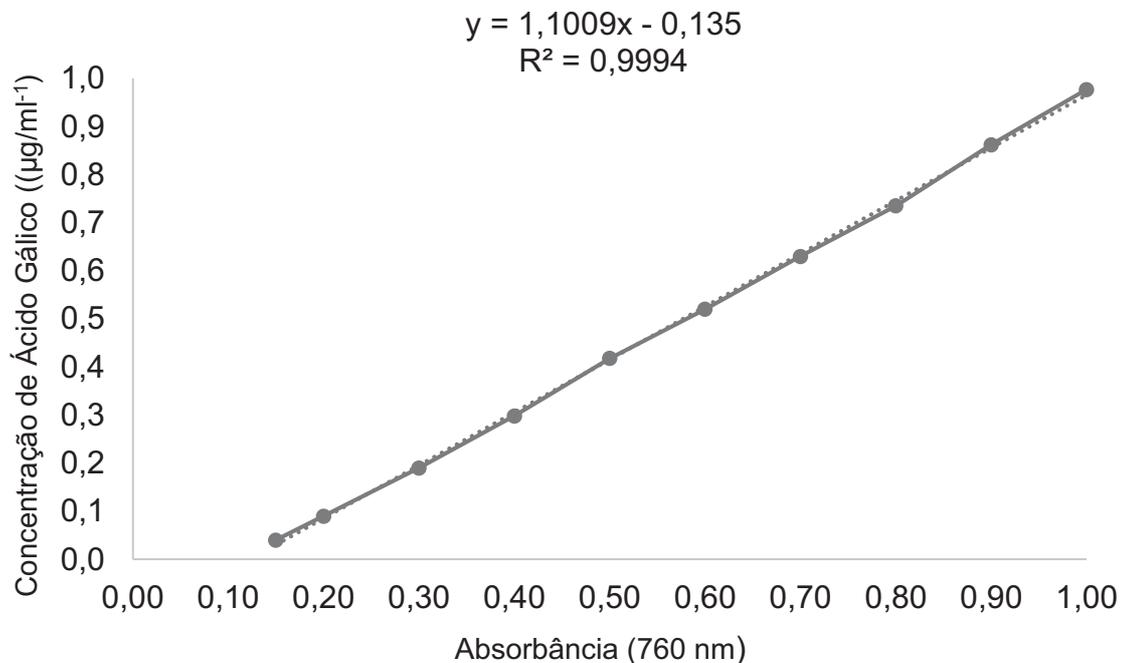


FIGURA 9. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO PELO MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU.

FONTE: O autor (2017).

3.1 Polifenóis totais

Os extratos obtidos com de etanol (Tabela 3), apresentaram os maiores valores de concentração de compostos fenólicos totais variando entre 0,2165 mg.g⁻¹ (amostra SF); 0,0647 mg.g⁻¹ (amostra SD) a 0,0281 mg.g⁻¹ (amostra SE), nas sementes de Ivaí - PR e entre 0,2084 mg.g⁻¹ (amostra SF); 0,0472 mg.g⁻¹ (amostra SD) e 0,0232 mg.g⁻¹

¹, (amostra SE), nas de Colombo - PR. Por outro lado, os extratos de água e etanol e somente água apresentaram os menores valores de concentração de polifenóis totais. Contudo, de acordo com a análise de variância, não houve efeito significativo entre as procedências se compararmos o extrato etanólico e extrato aquoso. Já o extrato etanol + água apresentou diferença significativa entre as procedências na amostra SF, mas não apresentou diferença significativa nas amostras SE e SD.

TABELA 3. TEORES DE POLIFENÓIS TOTAIS (MG.G-1), REFERENTES A TRÊS DIFERENTES EXTRATOS ELABORADOS COM SEMENTES DE ERVA-MATE FRESCAS (SF), DESIDRATADAS DURANTE 70 DIAS (SD) E ESTRATIFICADAS POR 180 DIAS (SE), ORIUNDAS DE IVAÍ E COLOMBO (PR)

Amostras	Tratamentos Procedências	Extrato etanólico	Etanol + Água (1:1)	Extrato aquoso	CV%
SF	Colombo	0,2084 A a	0,1870 B a	0,1883 B a	12,2
	Ivaí	0,2165 A a	0,1488 C b	0,1520 B b	19,2
	CV%	17,4	13,6	12,4	-
SD	Colombo	0,0472 A a	0,0374 B b	0,0549 A a	16,3
	Ivaí	0,0647 A a	0,0560 B a	0,0626 A a	15,6
	CV%	12,3	18,5	18,8	-
SE	Colombo	0,0232 A a	0,0175 B b	0,0146 C b	14,1
	Ivaí	0,0281 A a	0,0195 B b	0,0136 C c	11,5
	CV%	13,3	17,2	16,3	-

CV%: Coeficiente de variação; Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (linhas) e minúsculas (colunas) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

FONTE: O autor (2018).

Observou-se também que em sementes frescas (SF) os teores de polifenóis totais nos diferentes extratos foi maior em relação às demais amostras, sugerindo assim, que com a aplicação do método de secagem (amostra SD) e com o processo de estratificação (amostra SE), a concentração de polifenóis nas sementes de erva-mate foi reduzida.

Vieira et al. (2000, p. 58), avaliou sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), nas quais foi observado que em condições de câmara fria e seca (10°C e 50% UR) houve redução na concentração de polifenóis totais. Da mesma forma, em sementes de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), Oliveira et al. (2011, p. 700) observou a diminuição de compostos fenólicos devido à sua oxidação, durante o armazenamento das sementes em câmara fria (10° C e 50% de UR).

Estudos realizados com sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze., *Myroxylon balsamum* (L.) Harms., *Piptadenia macrocarpa* Benth., *Joannesia princeps* Vell. e *Dalbergia nigra* Vell., mostraram a existência de sensíveis diferenças entre as quantidades de constituintes fenólicos (MACIEL; ANDRADE, 1996, p. 26). Nesse sentido, evidenciou-se que a presença de compostos fenólicos de distintas categorias

químicas, dentro das sementes, foi variável de acordo com sua localização e sua atuação pode ser observada em diversos processos biológicos (MACIEL et al., 1992, p. 7 - 8). Em alguns casos ainda, poderá haver supressão da germinação das sementes (LODHI, 1979, p. 1087-1088). Logo, diversas partes constituintes da semente podem conter inibidores que afetam a germinação (TOOLE et al., 1956, p. 306; BASKIN e BASKIN, 1998, p. 30).

3.2 Histoquímica

As análises histoquímicas permitiram detectar que existem barreiras lignificadas e rugosas entre o endocarpo e o tegumento (Figura 10 A), assim como, a presença de compostos fenólicos (Figura 10 B), depositados nas sementes de erva-mate na região do tegumento. Tais resultados reforçam a hipótese de que substâncias químicas, tais como polifenóis, presentes nas sementes de erva-mate, podem inibir o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente reduzir a germinação.

Em espécies como o mamão (*Carica papaya* L.), o umedecimento do substrato de germinação com solução preparada a partir da sarcotesta de sementes de mamão afetou a germinação das sementes de alface (TOKUHISA et al., 2007, p. 187). Da mesma forma, o extrato preparado a partir do espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.), contribuiu na baixa germinação de sementes de alface, provavelmente devido a presença de cafeína (PEREIRA, et al., 2002, p. 310).

Segundo estudos realizados por Neves et al., (2013, p. 126), os extratos aquosos do eixo embrionário e cotilédones de cutieira (*Joannesia princeps* Vell.), afetaram significativamente a germinação de sementes de alface.

Logo, para a erva-mate, sugerem-se novos estudos para esclarecer qual a função dos compostos fenólicos nas estruturas das sementes.

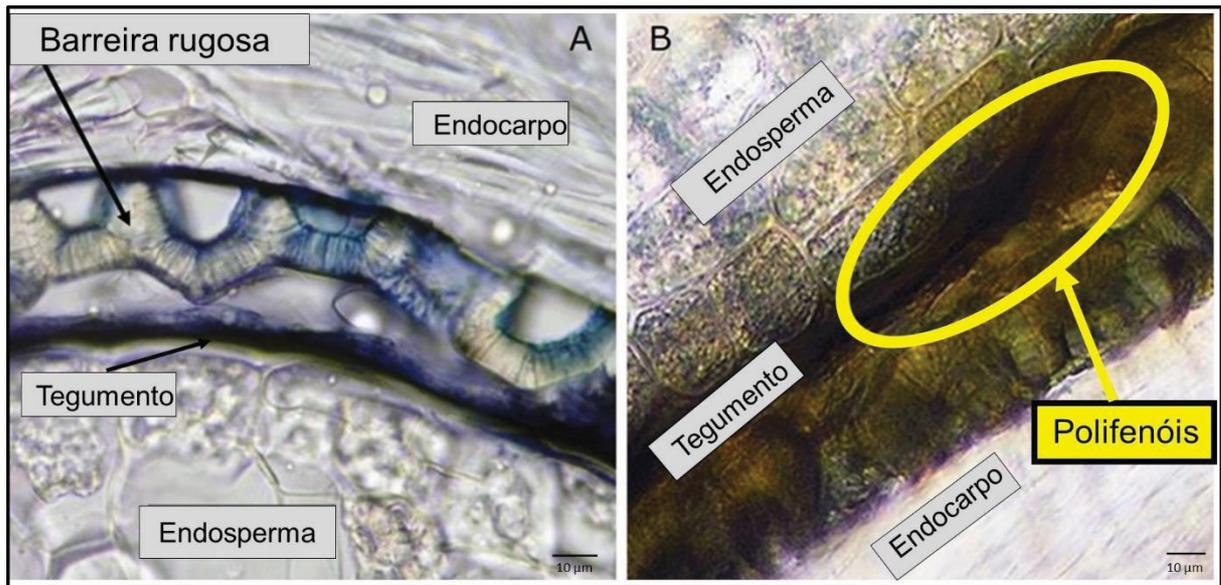


FIGURA 10. CORTE HISTOLÓGICO TRANSVERSAL EM SEMENTES DE ERVA-MATE, INDICANDO: (A) BARREIRA RUGOSA LIGNIFICADA; (B) PRESENÇA DE POLIFENÓIS. FOTO: SILVA, C. B. (2017), AUMENTO 150X.

FONTE: O autor (2017).

3.3 Bioensaio

Os resultados obtidos no bioensaio de germinação da alface estão apresentados na Tabela 4, 5 e 6 que ilustra o efeito fitotóxico dos extratos obtidos das sementes de erva-mate sobre a porcentagem e velocidade da germinação das sementes.

Ao observar os resultados do teste (IVG) índice de velocidade de germinação (Tabela 4), verifica-se o atraso na germinação das sementes de alface, quando comparadas com o controle. Dessa forma, presume-se que o vigor das sementes de alface foi enfraquecido quando em contato com os extratos provenientes das sementes de erva-mate, os quais podem ter provocando redução na uniformidade de germinação. Esse fato pode ser consequente do efeito negativo do extrato sobre a mobilização dos componentes nutritivos para a radícula e hipocótilo (HOFFMANN, et al., 2007, p.15; AUMONDE, et al., 2013, p. 3186).

TABELA 4. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE ALFACE SUBMETIDAS A TRÊS DIFERENTES EXTRATOS, ELABORADOS COM SEMENTES DE ERVA-MATE FRESCAS (SF), DESIDRATADAS DURANTE 70 DIAS (SD) E ESTRATIFICADAS POR 180 DIAS (SE), PROVENIENTES DE IVAÍ E COLOMBO (PR) E ÁGUA DESTILADA COMO CONTROLE

Procedências	Tratamentos Amostras	Extrato etanólico (*ns)	Etanol + água (1:1) (*ns)	Extrato aquoso (*ns)	Controle
Ivaí	SF	6,28	7,17	8,50	13,32 A a
	SD	6,52	7,40	8,66	13,56 A a
	SE	6,72	7,74	8,78	13,92 A a
Colombo	SF	6,50	7,11	8,02	13,30 A a
	SD	6,67	7,36	8,11	13,64 A a
	SE	6,80	7,90	8,54	13,88 A a

(*ns): não significativo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor (2017).

Extratos elaborados a partir das sementes de erva-mate inibiram a germinação de sementes de alface (Tabela 5). Em experimento realizado com extratos procedentes de frutos maduros de erva-mate sobre a germinação e crescimento do milho híbrido, Miró et al., (1998, p. 267), relata que frutos de erva-mate e seus extratos não afetam a germinação e a emergência das plântulas de milho. No estudo de Aquila (2000, p. 57), os extratos provenientes de folhas, ramos e frutos de erva-mate, foram mais efetivos na inibição do crescimento do que na inibição da germinação das sementes de alface.

TABELA 5. PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DAS SEMENTES DE ALFACE SUBMETIDAS A TRÊS DIFERENTES EXTRATOS, ELABORADOS A PARTIR DE SEMENTES DE ERVA-MATE FRESCAS (SF); DESIDRATADAS DURANTE 70 DIAS (SD) E ESTRATIFICADAS POR 180 DIAS (SE), PROVENIENTES DE IVAÍ E COLOMBO (PR) E ÁGUA COMO CONTROLE (C)

Procedências	Tratamentos Amostras	Extrato etanólico	Etanol + água (1:1)	Extrato aquoso	Controle
Ivaí	SF	22,0 B b	14,0 C c	40,0 A b	82,0 A a
	SD	26,0 B b	28,0 B b	42,0 A b	84,0 A a
	SE	34,0 C a	34,0 B a	50,0 B a	86,0 A a
Colombo	SF	24,0 B b	20,0 B b	44,0 A c	83,0 A a
	SD	32,0 B a	22,0 C a	54,0 A b	85,0 A a
	SE	34,0 B a	24,0 C a	56,0 A a	88,0 A a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor (2017).

Em outras espécies, como o juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), Coelho et al., (2011, p. 109) verificaram que extratos obtidos de suas sementes apresentaram efeito alelopático, reduzindo em 13% a germinação de sementes de alface. Da mesma forma, extratos obtidos de sementes de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.), causaram alta porcentagem de mortalidade das sementes e também reduziram em 13% a

germinação de sementes de alface (OLIVEIRA, et al., 2012, p. 482). Silva e Aquila (2006a, p. 64) também constataram atraso na germinação das sementes de alface em bioensaios realizados com extratos foliares de espécies nativas, como *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltld.

Nesse sentido, apesar de Ferreira e Borghetti (2004, p. 63) relatarem que o efeito alelopático não se dá, frequentemente, sobre a porcentagem de germinação final, no presente estudo os diferentes extratos elaborados a partir de sementes de erva-mate afetaram o percentual de germinação das sementes de alface.

Os resultados referentes ao comprimento da parte aérea e das raízes da alface, mensurados ao final do teste de germinação, estão apresentados na Tabela 6. Nesta análise foi possível observar que o crescimento do hipocótilo não foi influenciado pela ação inibitória dos extratos.

TABELA 6. AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO DE TRÊS DIFERENTES EXTRATOS, ELABORADOS COM SEMENTES DE ERVA-MATE FRESCAS (SF), DESIDRATADAS DURANTE 70 DIAS (SD) E ESTRATIFICADAS POR 180 DIAS (SE), PROVENIENTES DE IVAÍ E COLOMBO (PR) E ÁGUA COMO CONTROLE (C), NO COMPRIMENTO (CM) DO HIPOCÓTILO (H) E RADÍCULA (R) DAS PLÂNTULAS DE ALFACE E PERCENTUAL (%) DE PLÂNTULAS ANORMAIS (PA)

Procedência s	Tratamento s	Extrato etanólico			Etanol + água (1:1)			Extrato aquoso			Controle		
		H (ns)	R	PA ^(ns)	H (ns)	R	PA ^(ns)	H (ns)	R	PA ^(ns)	H (ns)	R	PA ^(ns)
	<u>Amostras</u>												
Ivaí	SF	3,5	0,8 B c	88,0	3,5	0,8 B c	82,0	3,6	0,8 B c	79,0	3,3	3,1 A a	6,0
	SD	2,7	1,4 B b	80,0	2,7	1,5 B b	79,0	2,8	1,5 B b	74,0	3,3	3,2 A a	3,0
	SE	3,2	2,5 B a	78,0	3,3	2,6 B a	75,0	3,3	2,7 B a	70,0	3,4	3,3 A a	2,0
Colombo	SF	3,3	0,8 B c	87,0	3,4	0,8 B c	81,0	3,4	0,8 B c	77,0	3,6	3,9 A a	5,0
	SD	2,3	1,5 B b	79,0	2,3	1,5 B b	78,0	2,4	1,5 B b	75,0	3,6	3,9 A a	4,0
	SE	3,0	2,6 B a	77,0	3,2	2,6 B a	76,0	3,3	2,7 B a	71,0	3,6	3,9 A a	3,0

(ns): não significativo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (na coluna) e pela mesma letra maiúscula (na linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
FONTE: O autor (2017).

Por outro lado, os extratos que continham sementes frescas (SF) em sua composição inibiram o desenvolvimento radicular, se compararmos ao controle. Além desse efeito inibitório, observou-se ainda, o alto índice (cerca de 88%) de plântulas deformadas, com raízes necrosadas (Figura 11).

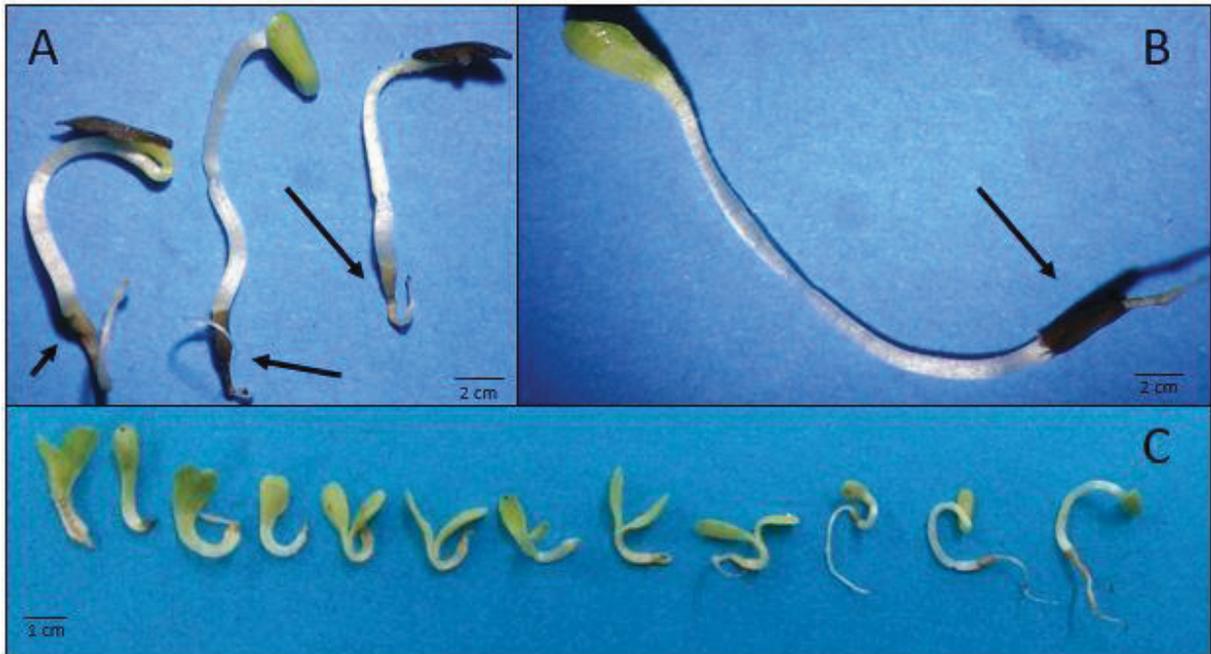


FIGURA 11. PLÂNTULAS DE ALFACE SUBMETIDAS AO EXTRATO DE SEMENTES FRESCAS DE ERVA-MATE: A E B: SETAS INDICAM RAÍZES NECROSADAS; C: PLÂNTULAS DEFORMADAS. AUMENTO 40X.

FONTE: O autor (2017).

Segundo Pires e Oliveira (2001, p. 163) as raízes da alface são mais sensíveis às ações fitotóxicas, de tal forma, que podem tornar-se parâmetros de comparação para apontar o potencial inibitório dos extratos aplicados sobre as sementes. Outrossim, o aparecimento de plântulas de alface anormais, com raízes primárias atrofiadas e defeituosas, com ausência de raiz secundária e necrose radicular também foi observado por Borella et al., (2009, p. 262), quando estas foram submetidas aos extratos mais concentrados de *Persea americana* Mill. Do mesmo modo, Formagio et al., (2010 p. 352), relatam que substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns.

A avaliação do potencial osmótico dos extratos foi essencial, pois valores extremos desse potencial podem atuar sobre as sementes e/ou plântulas e mascarar o efeito alelopático (FERREIRA e AQUILA, 2000 p. 178). O potencial osmótico obtido para os extratos elaborados a partir das sementes de erva-mate foi de -0,28 MPa. Segundo Gatti (2003, p. 96), soluções com potenciais osmóticos próximos a -0,2 MPa não interferem significativamente na germinação das sementes de alface.

Os extratos tiveram o pH aferido e apresentaram baixa variação de valores e baixa acidez atingindo entre 6,21 a 6,25. Dados na literatura indicam que tanto a germinação como o crescimento das plântulas são afetados quando o pH é extremamente alcalino ou extremamente ácido (ROY, 1986, p. 63), com efeitos

deletérios observados em condições de pH abaixo de 4 e superior a 10 (EBERLEIN, 1987, p. 799).

A ação dos extratos foi desassociada de qualquer efeito do potencial osmótico e do pH, indicando, portanto, atividade alelopática.

Nesse aspecto, os resultados obtidos evidenciam que extratos de sementes de erva-mate são capazes de interferir no metabolismo da raiz da alface. Tais informações poderão ser úteis para futuras pesquisas, objetivando elucidar quais são os componentes presentes nos extratos e se eles podem influenciar na germinação das sementes de erva-mate.

4. CONCLUSÕES

Evidencia-se, na análise histoquímica das sementes de erva-mate a presença de barreira rugosa lignificada e a presença de compostos fenólicos na região do tegumento.

Constata-se que em sementes frescas de erva-mate há uma maior concentração de compostos fenólicos, sendo esta, reduzida nas sementes desidratadas e quase nula em sementes estratificadas;

Compostos fenólicos, presentes nas sementes de erva-mate reduzem a germinação das sementes de alface.

5. REFERÊNCIAS

AUMONDE, T. Z.; MARTINAZZO, E. G.; PEDÓ, T.; BORELLA, J.; AMARANTE, L.; VILLELA, F. A.; MORAES, D. M. Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface submetidas ao extrato de *Philodendron bipinnatifidum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3181-3192, 2013.

AQUILA, M.E.A. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia, Série Botânica**, n. 53, p. 51 - 66, 2000.

BASKIN, C.; BASKIN, J. **Seeds: ecology biogeography and evolution of dormancy and germination**. Academic Press, San Diego, 1998, 666 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2ª Ed. Plenum Press, New York, NY. 1994.

BORELLA, J., WANDSCHEER, A. C. D., BONATTI, L. C., PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, n.7, p. 260 - 265, 2009.

CARDUCCI, C. N.; DABAS, P. C.; MUSE, J. O. Determination *Ilex paraguariensis* (St. H.), of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in a plant used to prepare tea in South America. **Journal of AOAC International**, Maryland, v. 83, n. 5, p. 1167-1173, 2000.

CATAPAN, M. I. S. Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. [Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais]. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998, 97 p.

COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. E. P. Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro. **Horticultura Brasileira**, n. 29, p. 108-111, 2011.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; VENTRELLA, M. C.; LEITE, I. T. A.; BRAGA, A. J. T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedling early growth. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 641 - 650, 2008.

CUQUEL, F. L.; CARVALHO, M. L. M.; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 415-421, 1994.

CUNHA, G.G.; FERREIRA, A.G. Viabilidade de sementes de erva-mate. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.39, n.10, p.974-976, 1987.

DIAPP, C.J. Espermo-anatomia e período de crescimento do embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Dusenía**, Curitiba, v.14, n.3, p.113-121, 1984.

EBERLEIN, C. V. Germination of *Sorghum alnum* seeds and longevity in soil. **Weed Science**, Cambridge University Press, v. 35, n. 6, p. 796-801, 1987.

FADIMU, O. Y.; IDOWU, O. T. H.; IPINLAYE, S. J. Studies on the dormancy and germination of stony fruits of hog plum (*Spondias mombin*) in response to different pre-soaking seed treatments. **International Research Journal of Biological Sciences**, Madhya Pradesh, v. 3, n. 6, p. 57-62, 2014.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, Edição Especial, p. 175-204. 2000.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FERREIRA, M. C.; SOUZA, J. R. P.; FARIA, T. J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. **Ciência Agrotécnica**, n. 31, p. 1054 - 1060, 2007.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

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

FREITAS, G. B. L.; ANDRIOLA, A.; GAUER, A. G.; IENK, L. S. S. Erva-mate, muito mais que uma tradição, um verdadeiro potencial terapêutico. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol. VIII, n. 3, p. 101 - 113, 2011. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/download/15966/9817> Acesso em: nov. 2017.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, O. B.; RIBANI, R. H. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **Food Science and Technology**, Campinas, SP, v. 60, p. 795 - 801, 2015.

GATTI, A. B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003, 148 f.

GUSMAN, G. S.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Scientiarum**, n. 30, p. 119 - 125, 2008.

HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A.; BASTOS, C. F.; WALLAU, G. L. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieff enbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista Ciências Agroveterinárias**, v. 6, n.1, p.11 - 21, 2007.

HORŽIĆ, D.; KOMES, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K. K.; IVEKOVIĆ, D.; KARLOVIĆ, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. **Journal Food Chemistry**, v. 115, p. 441 - 448, 2009.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Aiton). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.

LODHI, M.A.K. Germination decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its autoallelopathy. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 10, p. 1083-1088, 1979.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACIEL, A. S.; ANDRADE, A. M. Quantificação de fenóis totais em sementes de cinco espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, Rio de Janeiro, n. 3, p. 22-27, 1996.

MACIEL, A. S.; BORGES, E. E. L.; BORGES, L. C. G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v.14, n.1, p.1-8, 1992.

MEDEIROS, A. C. de S.; ALVES, V. G.; NOGUEIRA, A. C.; REICHER, F. Determinação de compostos fenólicos em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIAO TECNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...Embrapa Florestas**, Colombo, PR, p. 418-419, 1997.

MENEZES, N. L.; FRANZIN, S. M.; BORTOLOTTI, R. P. Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de Superação. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, v.7, n.1, p. 35- 44, 2009.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS (MDIC). **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet**. Disponível em: < <http://aliceweb.mdic.gov.br>>. Acesso em: nov. 2017.

MIRÓ, C. P.; FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 261 - 270, 1998.

NEVES, J. M. G; SILVA, H. P.; AQUINO, C. F.; BRANDÃO, A. A.; DUARTE, R. F.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; SALES, N. L. P. Determinação de inibidores e superação de dormência em sementes de cutieira. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 3, n. 2, p. 121 - 128, 2013.

OLIVEIRA, A. K.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; DIÓGENES, F. E. P.; MEDEIROS FILHO, S. Alelopatia de extratos de diferentes órgãos de mulungu na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, n. 30, p. 480 - 483, 2012.

OLIVEIRA, J. A.; SILVA, T. T. A.; PINHO, E. V. R. V.; ABREU, L. A. S. Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino, **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 699 - 710, 2011.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C.D.; SILVA, C. B.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M. D. Potencial fitotóxico com enfoque alelopático de **Bauhinia unguolata** L. sobre sementes e plântulas de alface e cebola. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 445 - 452, 2015.

PEREIRA, C. E.; VON PINHO, E. V. R.; OLIVEIRA, D. F.; KIKUTI, A. L. P. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 306-311, 2002.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JUNIOR. RS; CONSTANTIN J. **Plantas daninhas e seu manejo**. Editora Agropecuária, Guaíba, RS, p.145 - 185, 2001.

RIL, F. T.; LOCH, C. R.; VALDUGA, A. T.; MACEDO, S. M. D.; CICHOSKI, A. J. Perfil bioquímico de ratos alimentados com iogurte contendo extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 332-337, 2011.

ROY, M. M. Effects of pH on germination of *Dichrostachys cineria* (L.). Wegth & Arn. **Journal Tree Science**, Solan, Índia, v. 5, n. 1, p. 62-64, 1986.

SANTOS, C. O; TRINDADE, S. C.; SILVEIRA, M. L. R.; SANTOS, R. O.; SAUTTER, C. K. Caracterização, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em diferentes tipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) para chimarrão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 73, n. 1, p. 77 - 86, 2014.

SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 61 - 69, 2006a.

SOUZA, S. A. M; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D.P.; PIANA, C. F. B.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface. Publicações UEPG, **Ciência Biologia e Saúde**, n. 11, p. 29 - 38, 2005.

TEZUKA, T.; YOKOYAMA, H.; TANAKA, H.; SHIOZAKI, S.; ODA, M. Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. **HortScience**, v. 48, p. 352–356, 2013.

TOKUHISA, D.; DIAS, D. C. F. S; ALVARENGA, E. M.; HILST, P. C.; DEMUNER, A. J. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 3, p.161-168, 2007.

TOOLE, E. H.; HENDRICKS, S. B.; BORTHWICK, H.; TOOLE, V. K. Physiology of seed germination. **Annual Review of Plant Physiology**. n. 7, p.299-324, 1956.

VENTRELLA, M. C.; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2013, 40 p.

VIEIRA, A.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; OLIVEIRA J.A.; SANTOS, C.D. Alterações fisiológicas e enzimáticas em sementes dormentes de arroz armazenadas em diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.22, n.2, p.53-61, 2000.

WAREING, P.P. Endogenous inhibitors of seeds germination and dormancy. **Encyclopedia of Plant Physiology**, New York, v. 15, n. 2, p. 909 - 922, 1965.

ZANON, A. Produção de sementes de erva mate. (**Circular Técnica, 16**). Colombo (PR): Embrapa Florestas, 1988. 8p.

CAPÍTULO 3

Associação de fungos em sementes e patogenicidade de *Colletotrichum* sobre folhas e de *Fusarium* em mudas de erva-mate

RESUMO

Neste capítulo objetiva-se avaliar a incidência dos fungos: antes, durante e após a estratificação das sementes de erva-mate, testar a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. sobre folhas de erva-mate e de *Fusarium* spp. em mudas de erva-mate e realizar a identificação morfológica e molecular de isolados de *Fusarium* spp. Para isso, sementes de erva-mate da safra 2015/2016 foram adquiridas de Ivaí – PR, e, frutos de erva-mate da safra 2015/2016 provenientes de experimentos localizados em Colombo - PR, foram despolidos e suas sementes depois de perderem o excesso de água, foram conservadas em recipiente de vidro hermeticamente fechado e mantidas em ambiente com 10°C de temperatura e 25% de umidade relativa. As análises de teor de água, viabilidade e sanidade foram realizadas antes (zero dias), durante (90 dias) e após (180 dias) a partir da instalação do teste de estratificação em areia. Decorrido o tempo de seis meses, as sementes foram submetidas à germinação em substrato comercial em condições de estufa. Foram realizados testes de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em folhas destacadas de erva-mate e de *Fusarium* spp. em mudas de erva-mate com idade de um ano. Também foi realizada a identificação morfológica e molecular de oito isolados de *Fusarium* spp., provenientes dos testes de sanidade das sementes de erva-mate. Observou-se que, o processo de estratificação proporcionou o amolecimento do endocarpo e o desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate, entretanto, a viabilidade teve um decréscimo considerável ao longo do tempo. Fungos saprofíticos foram detectados no teste de sanidade com maior incidência no início da estratificação. Houve incidência de fungos endofíticos como *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. O fungo *Colletotrichum* spp. foi patogênico às folhas jovens de erva-mate. A caracterização molecular identificou a nível de espécie, dois grupos de fungos patogênicos incidentes nas sementes de erva-mate ao longo da estratificação: um deles pertence ao complexo *Gibberella fujikuroi* (cinco isolados) e o outro ao complexo *Fusarium graminearum* (três isolados).

Palavras-chave: Aquifoliaceae. Patologia de sementes. Espécies florestais nativas.

CHAPTER 3

Association of fungi on seeds and pathogenicity of *Colletotrichum* about leaves and *Fusarium* on seedlings of yerba mate

ABSTRACT

In this chapter we aim to evaluate the incidence of fungi: before, during and after the stratification of the yerba mate seeds; to test the pathogenicity of *Colletotrichum* spp. about leaves of yerba mate and *Fusarium* spp. on seedlings of yerba mate and perform the morphological and molecular identification of isolates of *Fusarium* spp. For this purpose, 2015/2016 yerba mate seeds were purchased from Ivaí-PR, and yerba mate fruits from the 2015/2016 harvest from the experiments located in Colombo, PR, were pulped and their seeds were excess water were kept in a hermetically sealed glass container and kept in an environment with 10°C temperature and 25% relative humidity. The analyses of water content, viability and sanity were performed before (zero days), during (90 days) and after (180 days) from the installation of sand stratification test. After six months, the seeds were submitted to germination on commercial substrates under greenhouse conditions. Pathogenicity tests of *Colletotrichum* spp. on leaves of yerba mate and *Fusarium* spp. in yerba mate seedlings at the age of one year. Morphological and molecular identification of eight isolates of *Fusarium* spp. This were also carried out, from the tests of sanity of the yerba mate seeds. It was observed that the stratification process provided the softening of the endocarp and the embryonic development of the yerba mate seeds, however, the viability has decreased considerably over time. Saprophytic fungi were detected in the sanity test with higher incidence at the beginning of the stratification. There was an incidence of endophytic fungi such as *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. and *Colletotrichum* spp. The fungus *Colletotrichum* spp. was pathogenic to young leaves of yerba mate. The molecular characterization identified two groups of pathogenic fungi in the mate strains throughout the stratification: one of them belongs to the *Gibberella fujikuroi* complex (five isolates) and the other to the *Fusarium graminearum* complex (three isolates).

Keywords: Aquifoliaceae. Seed pathology. Native forest species.

1. INTRODUÇÃO

Entre os produtos não madeireiros do extrativismo, a produção nacional de erva-mate extrativa em 2016 foi de 346 953 toneladas e apresentou um crescimento em torno de 1,7% em relação a 2015, alcançando 346.953 toneladas e o segundo maior valor de produção, gerando em torno de R\$ 398,8 milhões (PEVS, 2016, p. 18). Por outro lado, a erva-mate cultivada, em 2016 ocupou uma área de 77.325 hectares, produzindo em torno de 616.213 toneladas, com valor de produção atingindo R\$ 541,1 milhões. Atualmente, quatro estados brasileiros concentram toda a produção nacional de erva-mate, sendo que Paraná, numa área de 30.388 hectares, produziu 227.804 toneladas, obtendo o valor de produção de R\$ 161.073 milhões (IBGE – PAM, 2016).

Em consequência da diversidade de usos, a erva-mate tem despertado o interesse dos mercados mundiais, cuja exportação em 2016, teve um incremento para países como Uruguai (84,4%), Chile (3,7%), Alemanha (2,7%), Estados Unidos da América (3,8%) e França (1,3%) (MDIC, 2016). Caso se mantenha a tendência de crescimento da exportação para o mercado exterior e a aumento da demanda por produtos da erva-mate no mercado mundial (FUNDOMATE, 2017, p. 2), é fundamental que os ervais sejam cultivados com mudas de alta qualidade genética, fisiológica e sanitária a fim de gerar plantas produtivas e com elevado padrão da matéria-prima.

Mesmo adotando os tratamentos silviculturais recomendados, nos viveiros, as mudas podem apresentar doenças transmitidas pelas sementes (POLETTTO et al., 2015, p. 287) nos processos de beneficiamento, ocasionando severa redução na capacidade germinativa das sementes, bem como tombamento das mudas em pós-emergência (MACIEL et al., 2014, p. 506). Assim, para que sejam implantadas estratégias de controle e prevenção, são necessários estudos que busquem o correto reconhecimento do agente causal da doença e para isso, a junção das técnicas morfológicas e moleculares possibilita a obtenção de informações eficientes para a identificação de espécies e de estudos de populações de diversos fungos (POLETTTO et al., 2012, p. 102).

A produção de mudas por meio de sementes ainda ocorre comumente por se tratar de um método com menor custo de produção, maior domínio da tecnologia pelos produtores e estruturas mais baratas em relação à propagação vegetativa (WENDLING; BRONDANI, 2015, p. 12 - 13). Para isso, ainda é utilizada a

estratificação das sementes entre duas camadas de areia (ZANON, 1988, p. 6 - 7). Assim, a estratificação ao longo dos seis meses, permite que ocorra o desenvolvimento embrionário das sementes ao mesmo tempo em que o endocarpo se torna molificado pela ação das hifas fúngicas (KUNIYOSHI, 1983, p. 44), ou seja, ao final do processo de estratificação a semente estará em condições adequadas para ser transferida para o substrato em sementeiras, apresentando o tegumento frágil (partindo-se com a simples pressão das unhas), embrião desenvolvido e provavelmente iniciará germinação depois de 40 dias após a semeadura (MAZUCHOWSKI, 1989, p. 29).

Segundo Medeiros et al. (1997, p. 420), fungos lignocelulíticos podem participar no processo de estratificação das sementes de erva-mate, degradando a estrutura lenhosa do endocarpo. Além disso, o uso de micro-organismos benéficos no controle de fitopatógenos e na promoção do crescimento de plantas são alternativas para espécies florestais.

Muitos fungos podem reduzir a capacidade germinativa de um lote de sementes, causar a morte de plântulas ou transmitir doenças para plantas adultas. Nesse aspecto, é necessário conhecer os agentes, as causas e as consequências decorrentes da contaminação por fungos patogênicos (MACHADO et al., 2006, p. 76). Dentre os poucos estudos referentes à sanidade das sementes dessa espécie, Oliveira et al. (2015, p. 235) constataram que a maior incidência de fungos nas sementes de erva-mate é de *Penicillium* spp. Ademais, Poletto et al. (2015, p. 290), relatam que *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* spp. são os principais patógenos contaminantes de sementes de erva-mate, principalmente no processo de despolpa dos frutos e ao longo da estratificação.

Diante do exposto, este capítulo objetiva avaliar a incidência dos fungos: antes, durante e após a estratificação das sementes de erva-mate, testar a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. sobre folhas de erva-mate e de *Fusarium* spp. em mudas de erva-mate e ainda, realizar a identificação morfológica e molecular de isolados de *Fusarium* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedências das sementes

Amostras de sementes de quinze matrizes de erva-mate da safra 2015/2016 oriundas de plantio localizado em Ivaí - PR, foram recebidas em março de 2016. Frutos maduros de 18 matrizes de erva-mate, provenientes de experimentos, implantados em Colombo – PR, localizados na Embrapa Florestas, foram despulpados sob água corrente e suas sementes foram depositadas em ambiente natural, na sombra, para perda do excesso de água durante 24 horas.

As sementes, tanto de Ivaí, com as de Colombo, foram acondicionadas em vidros hermeticamente fechados, e armazenadas em câmara com temperatura de 10°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 25% ($\pm 5^\circ\text{C}$), no laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas até o início da realização dos testes (30 dias).

2.2 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a 105° C $\pm 3^\circ\text{C}$ por 24h, conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), utilizando a média das seis repetições de 25 sementes, aos 0, 90 e 180 dias após instalação da estratificação das sementes de erva-mate em areia.

2.3 Teste de tetrazólio

Para este teste foram utilizadas 100 sementes, com quatro repetições de 25 sementes aos 0, 90 e 180 dias após a instalação da estratificação. O teste consistiu na metodologia sugerida por Catapan (1998, p. 28 - 29), em que o preparo das sementes foi realizado nas seguintes etapas:

I - Pré-condicionamento: 100 sementes foram imersas em água destilada a temperatura de 30 °C por 24 h; *II - Exposição dos tecidos para coloração:* as sementes foram cortadas longitudinalmente, próximo ao eixo embrionário, com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico, sendo que apenas a parte que abrigava o embrião foi imersa para coloração dos tecidos em solução de TZ; nesta etapa foram descartadas as sementes vazias; *III - Coloração:* as partes das sementes contendo o embrião foram imersas na solução de TZ com concentração de 0,1%, por 24h a 35 °C, no escuro; *IV - Avaliação:* as sementes foram lavadas em água destilada e avaliadas quanto à intensidade da coloração e consistência dos tecidos para se obter sua viabilidade. Consideraram-se viáveis as sementes cujo endosperma e embrião

encontravam-se com a coloração rosa ou vermelho claro e inviáveis as sementes que apresentavam endosperma e embrião de cor púrpura ou de cor branca (conforme Figura 8, p. 41).

2.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate

Para avaliar o desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate, foram utilizados os embriões excisados, oriundos dos testes de tetrazólio, realizados aos 0, 90 e 180 dias a partir da estratificação, os quais foram observados em lupa *Zeiss (AxioCam)* com aumento de 100x e em seguida a classificados em diferentes estádios de desenvolvimento, conforme Figura 5 (página 23).

2.5 Estratificação das sementes em areia

As sementes foram distribuídas entre duas camadas de areia. Para isso, utilizaram-se dez caixas pretas de polietileno com fundo perfurado, nas dimensões 12cm x 15cm x 30cm (profundidade, largura, comprimento), desinfestadas com hipoclorito a 12% durante 24 horas. Em seguida foi realizada a tríplice lavagem em água destilada, sendo a última em água autoclavada. Como substrato, a areia grossa (de 2 a 0,2 mm de diâmetro), foi colocada no fundo de cada caixa até 4 cm e sobre ela uma fina camada de sementes de erva-mate (30 g), acondicionadas em envelope de sombrite, e recobrimo o envelope de sombrite, outra camada de 4 cm de areia.

O experimento foi instalado na Embrapa Florestas – Colombo (PR), onde as caixas foram acondicionadas em viveiro com irrigação automatizada e sem controle de temperatura, durante seis meses (de março a setembro/2016). As coletas das sementes durante o processo de estratificação foram realizadas aos 0, 90 e 180 dias a partir da instalação do experimento.

2.6 Teste de germinação

Seis meses após o início da estratificação, em setembro/2016, as sementes foram retiradas das caixas onde estavam sendo estratificadas e aproximadamente 2000 sementes de erva-mate já estratificadas (de cada procedência), foram semeadas em substrato comercial (composto pela mistura entre casca de pinus moída e

vermiculita), disposto dentro de quatro caixas plásticas (12 cm x 15 cm x 30 cm), acondicionadas em condições de estufa, recebendo irrigação manual pelo menos duas vezes por semana. Cada caixa recebeu aproximadamente 500 sementes estratificadas de erva-mate.

2.7 Teste de sanidade em papel-filtro (PF)

O teste de sanidade foi realizado nas dependências do laboratório de Patologia Florestal – Embrapa Florestas, Colombo (PR).

Para a detecção de fungos epifíticos, utilizou-se o método *Blotter test*, também denominado método do papel de filtro (PF).

Para isso, 100 sementes de erva-mate não desinfestadas, foram retiradas aos 0, 90 e 180 dias após a instalação da estratificação em areia, divididas em cinco repetições de 20 sementes, e, colocadas em gerbox previamente desinfestados com álcool 70% contendo duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água autoclavada. A incubação foi realizada em sala com temperatura controlada a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, com 12 horas de luz e 12 horas de escuro, durante sete dias.

A avaliação foi realizada observando-se as sementes em lupa e as estruturas fúngicas retiradas para confecção de lâminas de cada fungo encontrado e observadas em microscópio óptico para a confirmação da classificação dos fungos a nível de gênero, com o auxílio de chave de identificação (BARNETT; HUNTER, 1982). Os dados da incidência dos fungos foram expressos em porcentagem.

2.8 Detecção de fungos endofíticos

A assepsia das sementes foi realizada conforme metodologia sugerida por Sansberro et al. (2000, p. 54) e adaptada para sementes por Pérez (2016, p. 2), pela qual realizaram-se as seguintes etapas: a) lavagem das sementes em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo; b) imersão em solução de álcool 70% por 1 minuto; c) imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos; d) enxágue por três vezes em água ultrapurificada esterilizada.

Para este teste foram utilizadas sementes aos 0, 90 e 180 dias após instalação da estratificação. Sendo 100 sementes de cada localidade, divididas em vinte repetições de cinco sementes. As sementes desinfestadas foram colocadas sobre

papel filtro para secagem e, então, plaqueadas em placas de petri com meio BDA: (39 g de extrato comercial de batata-dextrose-ágar (HIMEDIA), 1000 mL de água ultrapurificada). O meio de cultura foi suplementado pelos antibióticos cloranfenicol (40 ppm) e ampicilina (80 ppm).

Seguidamente as placas foram vedadas com filme de PVC (*Polyvinyl chloride*) e a incubação ocorreu em sala com temperatura de 20°C ±3°C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias.

A avaliação consistiu na observação das estruturas fúngicas formadas no meio de cultura com auxílio de microscópio estereoscópico (*Carl Zeiss – Discovery. V20*) e, em seguida, foram preparadas lâminas com lactoglicerol azul de metileno para observação em microscópio óptico (*Carl Zeiss – AxioLab. A1*).

A identificação dos fungos em nível de gênero foi realizada seguindo a descrição de Barnett e Hunter (1982) e os dados de incidência foram expressos em percentagem.

2.9 Teste de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. sobre folhas de erva-mate

Dez isolados do gênero *Colletotrichum* spp., sendo, COL1, COL3, COL4, COL5 e COL8 provenientes do teste de sanidade das sementes de Ivaí e COL2, COL6, COL7, COL9 e COL10 oriundos dos testes de sanidade das sementes de erva-mate de Colombo, foram cultivados em meio de cultura BDA durante sete dias, em BOD a 24°C, no escuro, para formação do inóculo.

Folhas maduras de cor verde e jovens de cor avermelhada (Figura 12 - A), oriundas de mudas de erva-mate com um ano de idade cultivadas a partir de sementes, foram destacadas e desinfestadas com álcool 70 % (30 segundos); hipoclorito de sódio 1 % (1 minuto) e lavadas em água ultrapurificada estéril. Em seguida as folhas permaneceram dentro do fluxo laminar sobre folhas de papel-filtro esterilizado afim de perderem o excesso de água advindo da desinfestação.

Posteriormente, na face abaxial das folhas foram efetuados ferimentos, executados com o auxílio de furador, o qual continha na ponta 5 agulhas, correspondendo a uma área de 5 mm de diâmetro (Figura 12 - B).

Culturas puras de dez isolados de *Colletotrichum* spp., previamente crescidas em meio de cultura BDA, formaram o inóculo.

Com auxílio de furador na dimensão de 5 mm de diâmetro foram efetuados furos no meio de cultura contendo o micélio de *Colletotrichum* spp. em crescimento ativo (Figura 12 - C) e em seguida depositados nas folhas de erva-mate previamente perfuradas (Figura 12 - D).

A inoculação foi realizada dentro de caixas do tipo *gerbox*, contendo 3 folhas, dois papéis-filtro esterilizado e umedecido com água estéril (Figura 12 - E). Para cada isolado foram inoculadas 30 folhas de erva-mate (15 jovens e 15 maduras). A testemunha recebeu apenas disco de BDA sem micélio.

Logo em seguida, o material inoculado e a testemunha foram incubados em sala com temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro durante 7 dias (Figura 12 - F). Após esse período, as folhas foram avaliadas individualmente observando os sintomas característicos da doença. O tamanho das lesões foram mensuradas com auxílio de paquímetro digital.

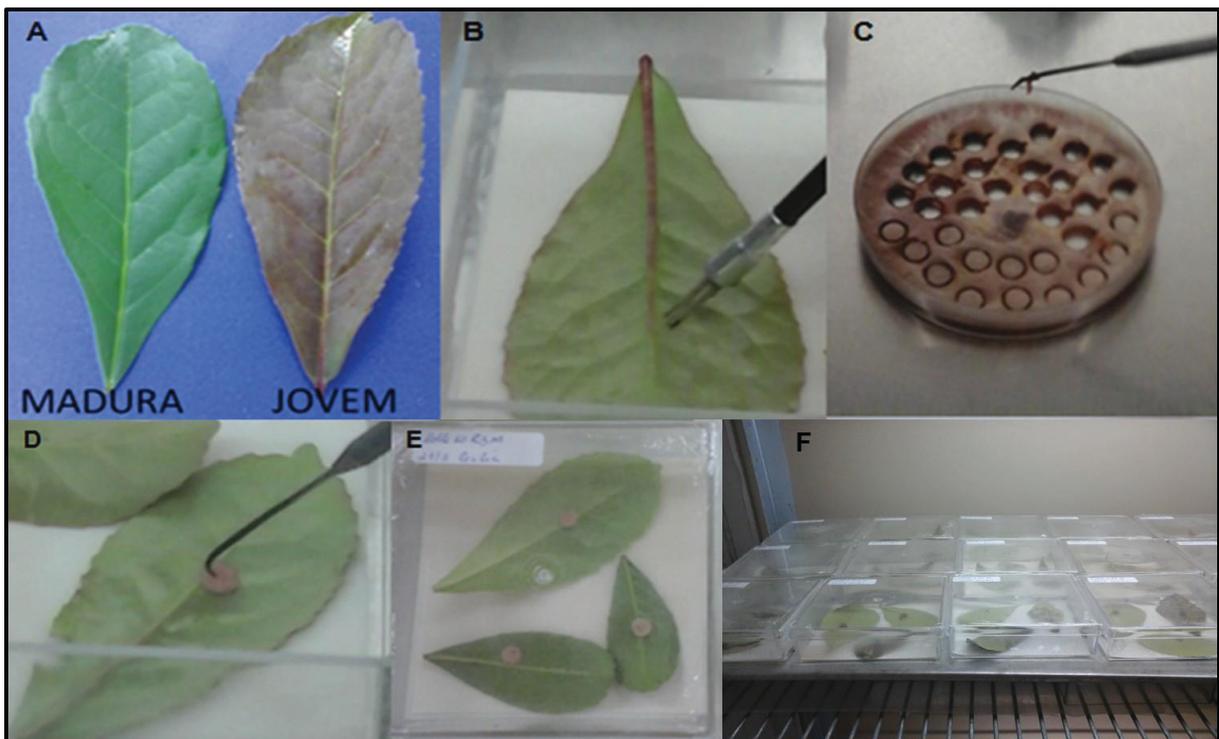


FIGURA 12. TESTE DE PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum* spp. EM FOLHAS DE ERVA-MATE: (A) FOLHAS JOVENS E MADURAS; (B) FERIMENTOS PRÉVIOS; (C) MICÉLIO FÚNGICO EM MEIO BDA; (D) DISCO DO INÓCULO SOBRE FERIMENTO DA FOLHA; (E e F) FOLHAS INOCULADAS.

FONTE: O autor (2017).

Após sete dias, procedeu-se o reisolamento indireto, onde, fragmentos das folhas contendo partes de lesões e partes sadias foram cortados e desinfestados com imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e enxágue em água ultrapurificada estéril.

Posteriormente, estes fragmentos foram colocados em placas de petri com meio de cultura BDA e mantidos em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 24 °C durante 14 dias, com vistas a confirmar a infecção.

2.10 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. em mudas de erva-mate

Oito isolados de *Fusarium* spp., dentre os quais FUS1, FUS5, FUS6, FUS7 e FUS8 oriundos dos testes de sanidade das sementes de erva-mate de Ivaí e FUS2, FUS3 e FUS4 provenientes das sementes de Colombo, foram cultivados em meio de cultura BDA, na BOD a 24 °C durante 14 dias, no escuro. Em seguida, multiplicados em grãos de milho conforme metodologia adaptada de Mezzomo (2017, p. 33), para produção do inóculo.

O experimento foi composto por oito isolados de *Fusarium* spp. e 90 mudas de erva-mate, sendo que cada isolado foi representado por dez repetições (uma repetição é equivalente a uma muda de erva-mate).

Para isso, grãos de milho adquiridos no comércio local, foram embebidos em água de torneira durante 8 horas. Após 160g desses grãos foram colocados em frascos de vidro (200 mL) e autoclavados (40 min a 121°C a 1 atm), duas vezes com intervalo de 24 horas (Figura 13 - A).

Posteriormente, foram transferidos para cada frasco de milho autoclavado, 10 discos (de 5 mm) de meio de cultura BDA com micélio dos oito isolados de *Fusarium* spp., oriundos dos testes de sanidade (Figura 13 - B). A testemunha recebeu apenas discos de meio de cultura BDA sem o patógeno.

Em seguida, os frascos foram incubados a 24°C com 12 horas de fotoperíodo durante 14 dias (Figura 13 - C). Após o crescimento do fungo nos grãos de milho (Figura 13 - D), 80 g do inóculo (milho + patógeno) foram misturados a 1,6 Kg de substrato comercial (Figura 13 - F) e depositados em vasos plásticos com orifícios na parte inferior com capacidade de 1,7 L (Figura 13 - G e H). Da mesma forma procedeu-se para a testemunha (Figura 13 - E).



FIGURA 13. SEQUÊNCIA DO TESTE DE PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp. EM MUDAS DE ERVA-MATE: (A) GRÃOS DE MILHO AUTOCLAVADOS; (B) ISOLADOS DE *Fusarium* spp. ADICIONADO AOS GRÃOS DE MILHO; (C) FRASCOS INCUBADOS EM BOD; (D) INÓCULO DE *Fusarium* spp.; (E) TESTEMUNHA; (F) INÓCULO MISTURADO AO SUBSTRATO; (G E H) ORIFÍCIOS PARA INTRODUÇÃO DAS MUDAS DE ERVA-MATE; (I) RAÍZES DE MUDAS DE ERVA-MATE; (J E K) PLANTIO DAS MUDAS EM SUBSTRATO INOCULADO COM *Fusarium* spp.; (L) DISPOSIÇÃO DAS MUDAS DE ERVA-MATE INOCULADAS COM *Fusarium* spp. EM CASA DE VEGETAÇÃO.
FONTE: O autor (2017).

Mudas de erva-mate com um ano de idade, cultivadas em tubetes foram desprendidas do seu substrato e suas raízes foram lavadas em água corrente (Figura 13 - I), transplantadas para os vasos contendo o substrato com o inóculo (Figura 13 J e K) e umedecidas com água sempre que necessário até atingir 60% de sua

capacidade de retenção. As mudas inoculadas permaneceram em condições de casa de vegetação por 180 dias (Figura 13 - L).

Quatorze dias após a inoculação começaram as avaliações semanais observando-se, visualmente, o aparecimento de sintomas da doença. Ao final da avaliação (seis meses após a inoculação), as mudas foram arrancadas e suas raízes lavadas em água corrente, desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1% e lavadas com água destilada estéril.

Posteriormente, foi realizado o isolamento indireto, onde porções de raízes foram retiradas da planta e transferidas para placas contendo meio de cultura BDA suplementado com antibióticos (cloranfenicol e ampicilina) e incubados em BOD a 25 °C no escuro durante sete dias. Após, foram elaboradas lâminas do micélio presente nas placas para confirmação do gênero *Fusarium* spp.

2.10.1 Identificação morfológica e molecular de *Fusarium* spp.

As culturas monospóricas foram obtidas seguindo a metodologia descrita por Jarek e Santos (2016, p. 43). Para a obtenção das culturas puras, as colônias obtidas do isolamento foram cultivadas em meio BDA durante 14 dias.

Após, um disco de micélio de 5 mm de cada isolado foi depositado em tubo contendo uma alíquota de 10 mL de água autoclavada. O tubo foi agitado em *vórtex* durante dois minutos. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 1 mL de suspensão de esporos, a qual foi transferida para tubos contendo 9 mL de água estéril, realizando-se “*a posteriori*” uma diluição seriada e as concentrações das suspensões de esporos foram padronizadas para aproximadamente 10^{-3} esporos/mL.

Do último tubo (o qual continha aproximadamente 10^{-3} esporos/mL) foram retiradas por meio de micropipetagem 20 gotas de 4 µl, as quais foram depositadas em placas de petri de acrílico (estéreis) e incubadas de forma invertida em BOD a 24°C durante duas horas.

Depois do tempo decorrido, as placas foram observadas em microscópio para verificar a germinação e o número de conídios. Todas as gotas que continham um único conídio germinado eram marcadas e seu conteúdo transferido para placas de meio de cultura BDA e incubadas em BOD, a 24°C, no escuro durante sete dias.

2.10.2 Caracterização morfológica de *Fusarium* spp.

Para a caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp. a cultura pura foi cultivada em diversos meios de cultura com a finalidade de avaliar características específicas como: **I - meio de cultura SNA (*Syntetic Nutrient Agar*)**: para caracterização do tipo de célula reprodutiva (macroconídios e microconídios) e medir o tamanho das estruturas reprodutivas; **II - meio de cultura SA (*Solo-ágar*)**: para verificar a presença ou ausência de clamidósporos; **III - meio de cultura CLA (*Carnation leaf-piece agar*)**: para analisar a cor e presença ou ausência de esporodóquio; **IV - meio de cultura KCL-Ágar (*Cloreto de Potássio e Ágar*)**: para visualizar tipo de célula conidiogênica (monifialide ou polifialide), disposição dos microconídios sobre a célula conidiogênica (em cadeia ou “falsas cabeças”); **V - meio de cultura BDA (*Batata Dextrose Ágar*)**: para determinar a velocidade de crescimento, tipo de micélio aéreo e cor.

A identificação foi realizada por meio da visualização de lâminas em microscópio *Carl Zeiss Axio Lab. A1* objetiva 40x, comparando as estruturas com a literatura de Leslie e Summerel (2006).

2.10.3 Caracterização molecular de *Fusarium* spp.

A análise molecular foi realizada por meio da amplificação da região fator de alongação 1-alfa. Para a extração de DNA (Ácido desoxirribonucleico) foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification da Promega. As amostras do DNA genômico foram submetidas a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), para amplificação da região do fator de alongação 1-alfa, sendo utilizados os *primers* TEF1 (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') e TEF2 (5' GGARGTACCAGTSATCATGTT 3'). A amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 94 °C por 1 min; 34 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C por 45 s e 72 °C por 1 min; extensão final de 72 °C por 5 min. Os fragmentos foram sequenciados pela empresa *Wemseq biotecnologia* e as sequências foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados *Fusarium-ID*, permitindo a detecção de similaridade com sequências caracterizadas já depositadas.

2.11 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC). As variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto à homogeneidade pelo teste de *Bartlett*, e as variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste F tiveram suas médias comparadas pelo teste de pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de água e viabilidade

Os resultados da análise do teor de água das sementes de erva-mate antes (0 dias), durante (90 dias) e após a estratificação (180 dias), demonstram que a absorção ao longo desse processo foi crescente (Figura 14 e 15). As sementes oriundas de Colombo e de Ivaí apresentavam baixa umidade (11% e 10% de conteúdo de água) antes de serem submetidas à estratificação e ao final desta, o teor de água teve um aumento considerável, passando para 58% e 66%.

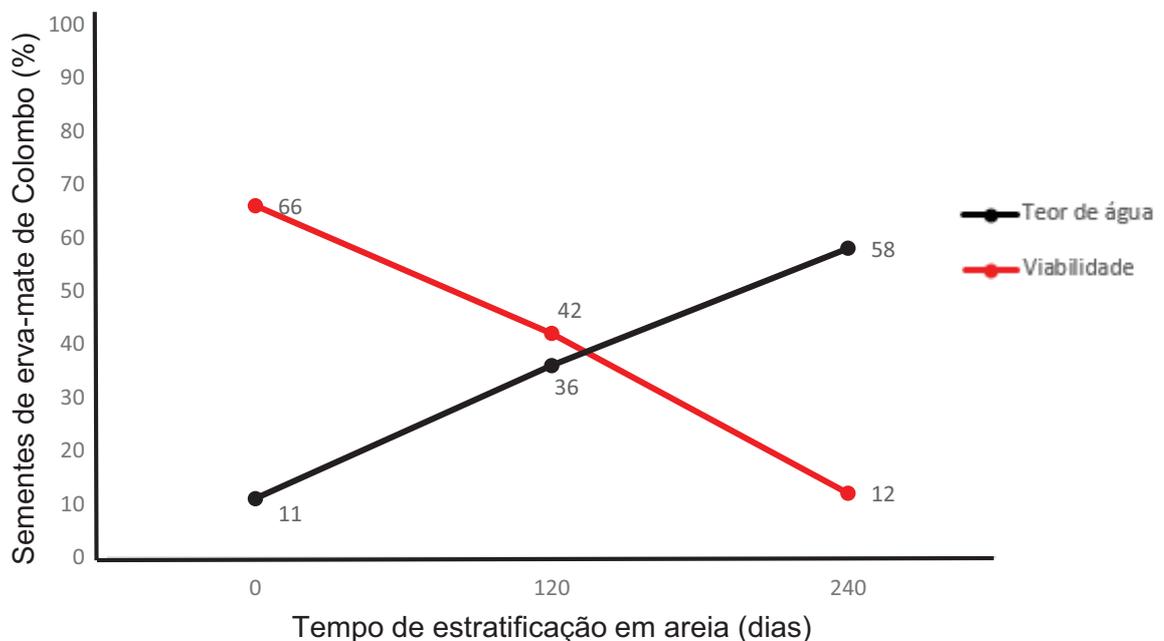


FIGURA 14. PORCENTAGEM DO TEOR DE ÁGUA E VIABILIDADE DAS SEMENTES DE ERVA-MATE ORIUNDAS DE COLOMBO AO LONGO DO PROCESSO DE ESTRATIFICAÇÃO.

FONTE:O autor (2017).

Com relação a viabilidade das sementes (Figura 14 e 15), observa-se que foi reduzida ao longo dos 180 dias de estratificação em areia, tanto nas sementes provenientes de Colombo, quanto nas de Ivaí.

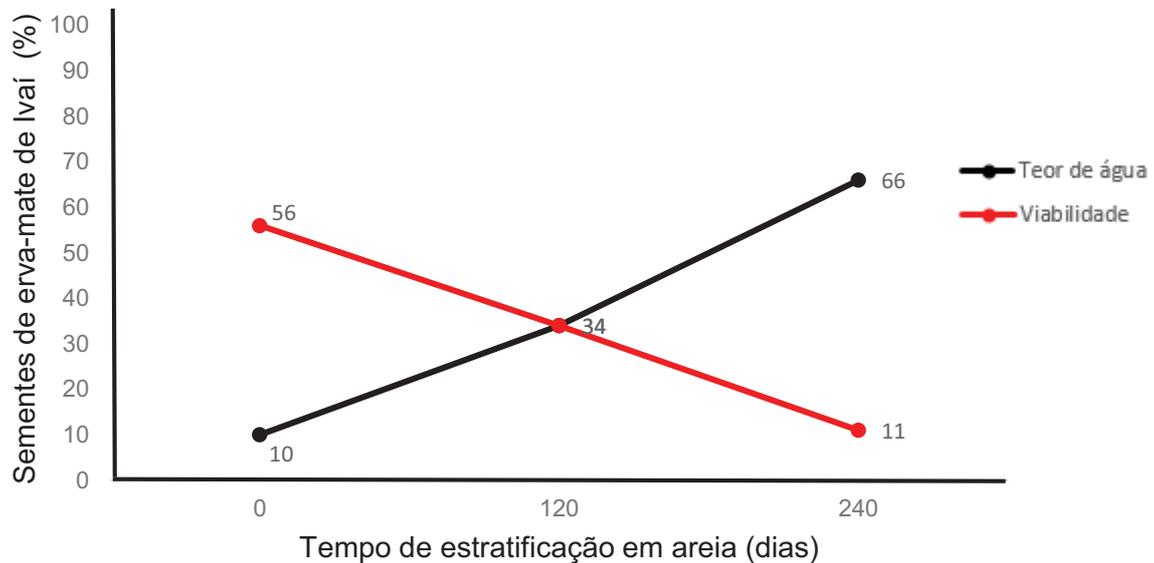


FIGURA 15. TEOR DE ÁGUA E VIABILIDADE EM (%), DAS SEMENTES DE ERVA-MATE ORIUNDAS DE IVAÍ AO LONGO DO PROCESSO DE ESTRATIFICAÇÃO.

FONTE: O autor (2017).

Ao longo dos seis meses de estratificação em areia, as sementes de erva-mate absorveram água gradativamente, a qual reidratou os tecidos e, conseqüentemente, intensificou a respiração, favorecendo as atividades metabólicas que resultaram no fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento por parte do eixo embrionário (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000, p. 311). Nesse sentido, a determinação do teor de água proporcionou observar que no final dos 180 dias desse processo, as sementes chegam a atingir valores acima de 55% de umidade. A atividade fisiológica das sementes está relacionada diretamente ao seu teor de água, assim, valores superiores a 41% propiciam o início do metabolismo para a germinação (MARCOS-FILHO, 2015, p. 234). Entretanto, em erva-mate ao final da estratificação, apesar do teor de água estar superior 41%, as sementes ainda não estavam germinando.

Para a determinação da viabilidade e do vigor da semente, o teste de tetrazólio tem se mostrado uma alternativa promissora, pela sua qualidade e rapidez na obtenção dos resultados (NOGUEIRA et al., 2014, p. 2968). Os resultados obtidos

demonstram que a viabilidade das sementes foi reduzida de 66% a 12% (Colombo) e de 56% a 11%, (Ivaí) ao longo dos 180 dias de estratificação. Desse modo, supõe-se que a redução da viabilidade das sementes no primeiro momento pode ter ocorrido devido a rupturas das membranas celulares, visto que as sementes se encontravam bastante secas e não foram adotados os procedimentos de embebição lenta antes do início da estratificação.

Segundo Peske e Peske (2011, p. 25), apesar da absorção de água pelas sementes ser a primeira etapa do processo de germinação, quando estas estiverem muito secas podem ocorrer rupturas das membranas celulares ocasionadas pela intensa entrada de água nos primeiros momentos, comprometendo a integridade da semente e assim, reduzindo a viabilidade. Além disso, o excesso de água durante o processo de estratificação pode também ter ocasionado a degradação das sementes, impedindo a penetração do oxigênio e por consequência reduzindo todo o processo metabólico (BORGES; RENA, 1993, p. 86), causando o apodrecimento das sementes.

Da mesma forma, devido à necessidade de alta quantidade de sementes dispostas no estratificador, estas, permanecem muito próximas umas das outras e em contato com o substrato úmido durante muito tempo (seis meses), favorecendo assim o ataque de patógenos oportunistas, que aproveitam essas condições de alta umidade para infectar e se multiplicar (SCREMIN-DIAS et al., 2006, p. 20), gerando também nesses casos, a perda da viabilidade das sementes.

3.2 Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate (Figura 16), representado pela mudança de forma, foi semelhante para as duas localidades (Colombo e Ivaí), sendo que antes da estratificação (zero dias) os estádios, globular e coração foram predominantes. Porém, ao longo da estratificação o embrião se desenvolveu progressivamente, passando pelos estádios mais rudimentares ao estágio maduro dentro dos 180 dias.

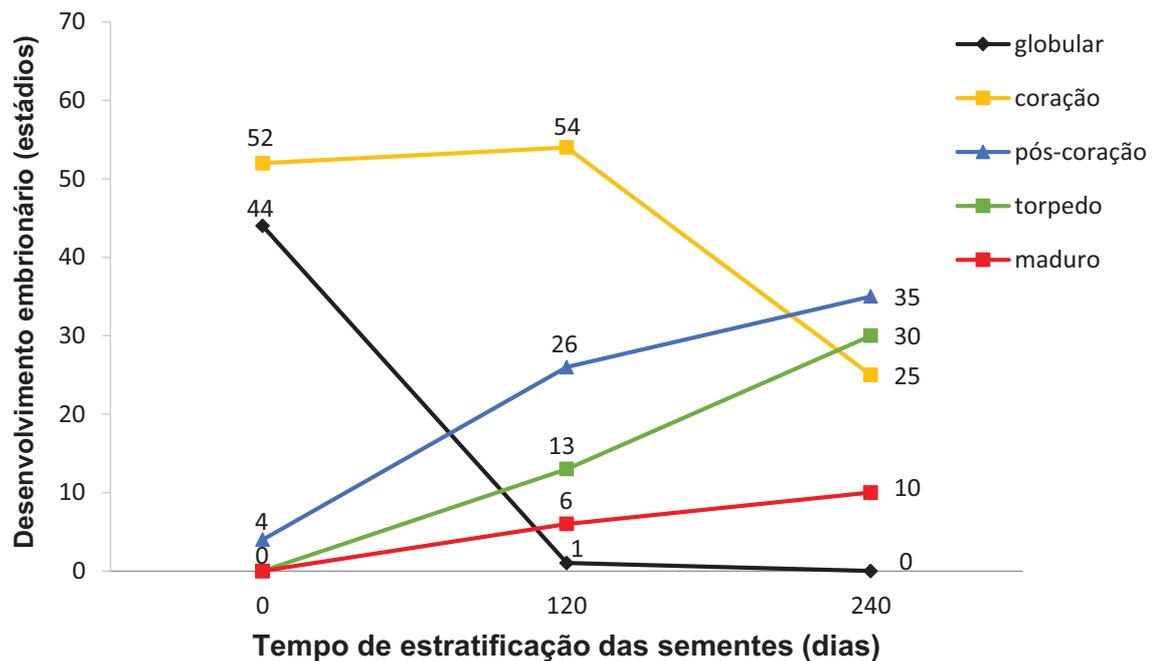


FIGURA 16. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES DE ERVA-MATE ORIUNDAS DE IVAÍ E COLOMBO (PR), AO LONGO DO PROCESSO DE ESTRATIFICAÇÃO.
FONTE: O autor (2017).

Além da viabilidade, o teste tetrazólio foi utilizado para observar o desenvolvimento embrionário das sementes ao longo do processo de estratificação, uma vez que após a análise da viabilidade os embriões foram excisados e avaliados quanto ao seu estágio de desenvolvimento, apresentando predominantemente os estágios, globular e coração em torno de 50% e 52%. Já ao final dos 180 dias, cerca de 8% a 10% dos embriões encontravam-se maduros.

Porém, resultados diferentes foram obtidos nas sementes de erva-mate provenientes de Mato Grosso do Sul armazenadas durante 30 dias em câmara fria (sem estratificação), onde Duboc e França (2016, p. 7), constataram que o seu desenvolvimento embrionário era composto por 32,5% no estágio coração, 16,7% no estágio pós-coração, 28,4% estágio torpedo e apenas 0,5% maduros.

Ademais, Catapan (1998, p. 61) encontrou, em três períodos de estratificação em areia (135, 179 e 221 dias), 28%, 30% e 8% de embriões na fase de coração, respectivamente, e 72, 68 e 90% na fase pós-coração, e apenas 2% na fase de torpedo após 179 e 221 dias de estratificação.

Estudos realizados por Medeiros e Silva (2001, p. 42) concluíram que, quanto maior o período de armazenamento em câmara seca, maior o número de embriões

em fase de pós-coração. Chegando a 34,9% de embriões viáveis (pós-coração), após 7 semanas de armazenamento em câmara seca e 200 dias de estratificação em areia úmida.

Ainda nesse sentido, percebe-se que há grande variabilidade genética entre as matrizes de erva-mate (FOWLER et al., 2011, p. 157) e as condições edafoclimáticas podem influenciar diretamente no desenvolvimento embrionário das sementes. Fowler et al. (2007, p. 108), pesquisando o desenvolvimento embrionário de sementes de erva-mate de diferentes locais de procedências do Sul, encontraram diferenças no desenvolvimento embrionário nas oriundas do Paraná, as quais apresentavam embriões mais desenvolvidos do que aquelas provindas do Rio Grande do Sul, provavelmente em decorrência das temperaturas médias anuais mais altas e maior insolação.

Da mesma forma, Daniel (2009, p. 74), relatou que as sementes dos ervais nativos da região Centro-Oeste germinam mais rapidamente do que as dos estados da região Sul, havendo a possibilidade de eliminar o processo de estratificação.

Nesse sentido, pesquisas referentes à expressão dos genes nos diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, como sugeridas por Fowler et al. (2011, p. 157), são necessárias e possuem grande importância científica no intuito de compreender os mecanismos que regulam a dormência prematura das sementes de erva-mate.

3.3 Estratificação e teste de germinação

Aproximadamente 2.000 sementes de erva-mate, de cada procedência (Ivaí e Colombo), depois de estratificadas em areia durante seis meses, foram misturadas ao substrato comercial. Estas, porém, germinaram somente após três meses, ou seja, entre o início da estratificação até o início da germinação, passaram-se 270 dias. Apesar desse longo tempo, os resultados não foram satisfatórios, pois houve apenas 2,8% de germinação das sementes oriundas de Ivaí e 4,48% de germinação das sementes provenientes de Colombo, sinalizando que a taxa média de germinação das sementes de erva-mate foi muito baixa, devido, provavelmente, à degradação das sementes por ação biótica ou abiótica. Além disso, a germinação é desuniforme em virtude do desigual estágio de desenvolvimento dos embriões antes de serem submetidos à estratificação.

Além dos fatores responsáveis pela baixa germinação anteriormente citados, percebeu-se que devido ao desuniforme desenvolvimento embrionário algumas sementes tendem a germinar durante o processo de estratificação e, quando removidas para o substrato no final da estratificação suas estruturas como radícula ou o eixo hipocótilo-radícula são danificadas e, conseqüentemente, essas sementes germinadas não continuam o seu desenvolvimento quando transferidas para o substrato.

Em consequência da alta densidade, sementes infectadas por fungos podem contaminar sementes sadias, reduzindo também o percentual de sementes efetivamente germinadas, situação também relatada por Poletto et al. (2015, p. 286).

3.4 Teste de sanidade em papel-filtro (PF)

A incidência de fungos sobre as sementes de erva-mate ao longo do processo de estratificação (Tabela 7), detectados por meio do papel filtro (PF), não diferiu entre os gêneros encontrados nas duas procedências (Ivaí e Colombo).

Dentre os gêneros fúngicos, observou-se que *Trichoderma* spp., incidiu entre 18% e 21% sobre as sementes de erva-mate ao longo do processo de estratificação.

Fungos como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., incidiram sobre as sementes antes e durante a estratificação. Nas sementes oriundas de Ivaí, *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Graphium* spp., *Nigrospora* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., e *Rhizopus* spp. também foram encontrados, mas em menor percentual de incidência.

Nas sementes oriundas de Colombo os fungos *Colletotrichum* spp. (90 dias) e *Fusarium* spp. (aos 180 dias) incidiram, respectivamente, 1,5% e 1,0% respectivamente.

Observou-se, pelo teste de sanidade PF realizado com sementes de erva-mate oriundas de Colombo que antes da estratificação (zero dia), haviam predominantemente associados às sementes, três fungos: (*Aspergillus* spp. - 15%; *Penicillium* spp. - 12,5% e *Trichoderma* spp. - 16%), mas ao longo dos 180 dias, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. tiveram sua incidência reduzida, enquanto que *Trichoderma* sp. no final da estratificação teve sua incidência elevada em 21%.

Outros fungos, como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., como *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Graphium* spp., *Nigrospora* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., e *Rhizopus* spp. também foram encontrados, mas em menor percentual de incidência.

Além destes, *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., e *Trichoderma* spp., incidiram sobre as sementes ao longo do processo de estratificação, sendo estes, na maioria, de origem endofítica. O gênero *Trichoderma* foi encontrado em maior quantidade nos dois tipos de testes de sanidade (PF e BDA), apresentando, respectivamente, ao final dos 180 dias de estratificação, 21% e 3% de incidência.

Avaliando sementes de erva-mate, Oliveira et al. (2015, p. 233) apontaram baixa incidência de *Trichoderma* spp., apenas 4% no lote de Rio Grande do Sul. Já Grigoletti Junior et al. (1999, p. 34), observaram que houve 24,6% de frequência do fungo *Trichoderma* spp. nos testes de sanidade com sementes estratificadas de erva-mate.

TABELA 7. INCIDÊNCIA DE FUNGOS (%) EPIFÍTICOS EM SEMENTES DE ERVA-MATE, ORIUNDAS DE IVAÍ E COLOMBO, SUBMETIDAS A TRÊS PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO (0, 90 E 180 DIAS), DETECTADOS PELO MÉTODO PAPEL-FILTRO (PF)

Ivaí	Período de estratificação (dias)		
	0	90	180
<i>Aspergillus</i> spp.	12,0 a*	7,5 b	0,0 c
<i>Alternaria</i> spp.	1,0 a	0,0 a	0,0 a
<i>Colletotrichum</i> spp.	0,0 a	0,0 a	2,5 a
<i>Curvularia</i> spp.	2,0 a	1,0 a	0,0 a
<i>Fusarium</i> spp.	0,0 a	0,0 a	1,0 a
<i>Graphium</i> spp.	6,5 b	8,0 b	10,0 a
<i>Nigrospora</i> spp.	0,0 b	5,5 a	0,0 b
<i>Penicillium</i> spp.	10,5 a	4,0 b	0,0 c
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	8,0 a	3,0 b	0,0 c
<i>Phomopsis</i> spp.	0,0 a	2,0 a	1,5 a
<i>Rhizopus</i> spp.	5,0 a	2,0 a	0,0 a
<i>Trichoderma</i> spp.	14,0 b	12,0 b	18,0 a
Colombo	Período de estratificação (dias)		
	0	90	180
<i>Aspergillus</i> spp.	15,0 a*	3,0 b	1,5 b
<i>Alternaria</i> spp.	1,0 a	0,0 a	0,0 a
<i>Colletotrichum</i> spp.	0,0 a	1,5 a	0,0 a
<i>Curvularia</i> spp.	0,0 a	5,0 a	0,0 a
<i>Fusarium</i> spp.	0,0 a	0,0 a	1,0 a
<i>Graphium</i> spp.	8,0 a	3,0 b	5,5 a
<i>Nigrospora</i> spp.	4,0 a	0,0 a	0,0 a
<i>Penicillium</i> spp.	12,5 a	6,5 b	0,0 c
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	1,0 a	0,0 a	0,0 a
<i>Phomopsis</i> spp.	0,0 a	1,5 a	0,0 a
<i>Rhizopus</i> spp.	3,0 a	1,0 b	0,0 c
<i>Trichoderma</i> spp.	16,0 c	11,0 b	21,0 a

* Letra diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

FONTE: O autor (2017).

3.5 Detecção de fungos endofíticos

Por se tratar de um teste mais específico, onde foram utilizados processos mais rigorosos de desinfestação das sementes, os fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Trichoderma* (Tabela 8), detectados pelo método em meio de cultura BDA, foram caracterizados como endofíticos.

Nas sementes oriundas de Ivaí, o fungo do gênero *Colletotrichum* incidiu 1% sobre as sementes nos três períodos analisados. Já *Fusarium* spp., foi detectado no início da estratificação (1%), elevando sua incidência ao final da estratificação em 3%.

Do mesmo modo, nas sementes de Colombo, o fungo do gênero *Colletotrichum* incidiu 1% sobre as sementes nos três períodos analisados. Com relação a *Fusarium* spp., foi observado 1% de incidência aos 0 e 90 dias.

O fungo pertencente ao gênero *Trichoderma* foi encontrado nas sementes provenientes de Ivaí no início e final da estratificação. Já nas sementes de Colombo, aos 90 e 180 dias após o início da estratificação.

TABELA 8. INCIDÊNCIA DE FUNGOS (%) ENDOFÍTICOS EM SEMENTES DE ERVA-MATE, PROVENIENTES DE IVAÍ E COLOMBO, DETECTADOS PELO MÉTODO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA)

Ivaí	Período de estratificação (dias)		
	0	90	180
<i>Colletotrichum</i> spp.	1,0 a	1,0 a	1,0 a
<i>Fusarium</i> spp.	1,0 a	0,0 a	3,0 a
<i>Trichoderma</i> spp.	1,0 b	0,0 b	2,0 a
Colombo	Período de estratificação (dias)		
	0	90	180
<i>Colletotrichum</i> spp.	1,0 a	1,0 a	1,0 a
<i>Fusarium</i> spp.	1,0 a	1,0 a	0,0 a
<i>Trichoderma</i> spp.	0,0 b	1,0 b	2,0 a

* Letra diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

FONTE: O autor (2017).

Na análise da sanidade de sementes de erva-mate, submetidas a diferentes períodos de estratificação, Souza et al. (2017, p. 70), também relataram a incidência de *Penicillium* spp., mas com incidência menor (7,5%), do que o encontrado nesse trabalho (10,5%). Este mesmo autor ainda relata que o gênero *Fusarium* obteve altos índices de incidência em zero e 90 dias após instalação do teste.

No presente trabalho, apesar das baixas incidências dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*, estes, podem causar danos na germinação, ou serem

transmitidos pelas sementes para as plântulas no viveiro, interferindo no estabelecimento das mudas de erva-mate.

3.6 Teste de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. sobre folhas de erva-mate

O teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., mostrou que todos os dez isolados são patogênicos apenas às folhas jovens (Tabela 9).

Assim, apenas nas folhas jovens os sintomas formaram lesões escuras e circulares, porém, não se verificou a presença de sinais do fungo. Já em folhas maduras não se verificou nem o aparecimento de sintomas (Figura 17).

Esse resultado corrobora com os obtidos por Gomes et al. (2001, p. 152), no qual os autores relataram ausência de folhas adultas com lesões, a exemplo do que é observado no campo. Quanto aos meios de penetração desse fungo nos tecidos das plantas, Mafacioli (2007, p. 49) também verificou que isolados de *Colletotrichum* sp. foram patogênicos em folhas de pupunheira e cajueiro quando inoculados com ferimentos no tecido.

Fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* possuem grande importância em relação às sementes em geral, pois segundo Meyer e Klepker (2007, p. 31), caso ocorra transmissibilidade, as plântulas originadas de sementes infectadas podem apresentar necrose dos cotilédones e do hipocótilo, causando o tombamento. Além disso, a alta incidência desse fungo pode causar o apodrecimento de sementes no solo antes da emergência (HENNING et al., 2005, p. 8).

TABELA 9. PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. SOBRE AS FOLHAS DE ERVA-MATE

Isolado	Folha madura Patogenicidade*	Folha jovem Patogenicidade*
COL1	-	+
COL2	-	+++
COL3	-	++
COL4	-	++
COL5	-	+
COL6	-	+
COL7	-	+
COL8	-	+
COL9	-	+
COL10	-	++
Testemunha	-	-

* (+) pouco patogênico; (++) moderadamente patogênico; (+++) extremamente patogênico; (-) Não patogênico.

FONTE: O autor (2017).



FIGURA 17. PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM FOLHAS MADURAS (A) E JOVENS (B) DE ERVA-MATE, INOCULADAS COM FERIMENTO.

FONTE: O autor (2017).

Percebe-se que a presença de ferimentos facilita a penetração e posterior colonização do patógeno nos tecidos mais jovens, dessa forma, as folhas maduras sem ferimentos não tendem a apresentar esse tipo de doença. Nesse aspecto, verifica-se que as sementes também representam fonte de inóculo desse patógeno caso possam transmiti-lo às plântulas nas sementeiras.

No entanto, os sintomas podem se desenvolver mais tarde durante o estabelecimento das mudas e o fungo disseminado para o campo no momento do transplante, contaminando áreas livres de patógenos (POLETTO et al., 2015, p. 288). Por isso, é necessário que haja o controle da qualidade sanitária das sementes de erva-mate, visto que os isolados de *Colletotrichum* spp. neste trabalho são patogênicos.

3.7 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. em mudas de erva-mate

Após seis meses da instalação do teste de patogenicidade, as mudas inoculadas com os isolados FUS1, FUS2, FUS3, FUS4, FUS5, FUS6 e FUS8 apresentaram plantas mortas, as quais foram avaliadas por meio de isolamento indireto das raízes, confirmando o gênero fúngico *Fusarium* spp. fechando assim o postulado de Koch.

Os resultados apresentado na Tabela 10, mostram que todos os oito isolados de *Fusarium* spp., encontrados nos testes de sanidade das sementes de erva-mate, foram patogênicos às mudas de erva-mate. Algumas espécies do gênero *Fusarium* causam inibição na germinação de certas sementes, e, mesmo que germinem,

apresentam crescimento do fungo sobre cotilédones e folhas primárias, além de necrose na radícula (RODRIGUES; MENEZES, 2002, p. 534). Para Mafacioli (2007, p. 8), é possível que as sementes sejam fontes de inóculo destes patógenos para mudas no viveiro.

Fungos do gênero *Fusarium* são patógenos economicamente importantes para os cereais, podendo causar perdas substanciais em produtividade e na qualidade de sementes, tendo potencial para sobreviver no solo por meio de estruturas de resistência e, ainda, em estruturas internas das sementes, como o embrião (BRODERS et al. 2007, p. 1155).

TABELA 10. PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. SOBRE AS MUDAS DE ERVA-MATE

Isolado	Patogênico*
FUS1	+
FUS2	++
FUS3	++
FUS4	+++
FUS5	+
FUS6	+
FUS7	+
FUS8	+
Testemunha	-

* (+) pouco patogênico; (++) moderadamente patogênico; (+++) extremamente patogênico; (-) Não patogênico.

FONTE: O autor (2017).

Os sintomas reflexos observados no presente trabalho em relação a ação patogênica de fungos do gênero *Fusarium*, tais como: murcha (Figura 18 - A), amarelecimento e necrose (Figura 18 - B), queda das folhas e até a morte da planta (Figura 18 - C), assemelham-se aos relatados por Polleto et al. (2012, p. 96). Da mesma forma, Mezzomo (2017, p. 79), também verificou os sintomas reflexos na parte aérea das mudas de erva-mate inoculadas em substrato contendo fungo *Fusarium* spp.

O desenvolvimento das mudas inoculadas, em relação a testemunha foi bastante afetado (Figura 19 - A). O reduzido crescimento das raízes das mudas inoculadas em relação a testemunha foi bem evidente ao final dos 180 dias da instalação do experimento. Pois, foi possível verificar que as raízes da testemunha, quando retiradas do substrato, estavam bem desenvolvidas, com coloração clara e sem necrose. Já as mudas inoculadas com *Fusarium* spp., apresentavam-se pouco desenvolvidas, atrofiadas e com as pontas necrosadas. (Figura 19 - B)



FIGURA 18. SINTOMAS PRIMÁRIOS OBSERVADOS NA PARTE AÉREA DAS MUDAS DE ERVA-MATE TRANSPLANTADAS EM SUBSTRATO INOCULADO COM *Fusarium* spp.: (A) MURCHA NOS PERÍODOS MAIS QUENTES DO DIA; (B) NECROSE; (C) NECROSE SEGUIDA DE MORTE.
FONTE: O autor (2017).

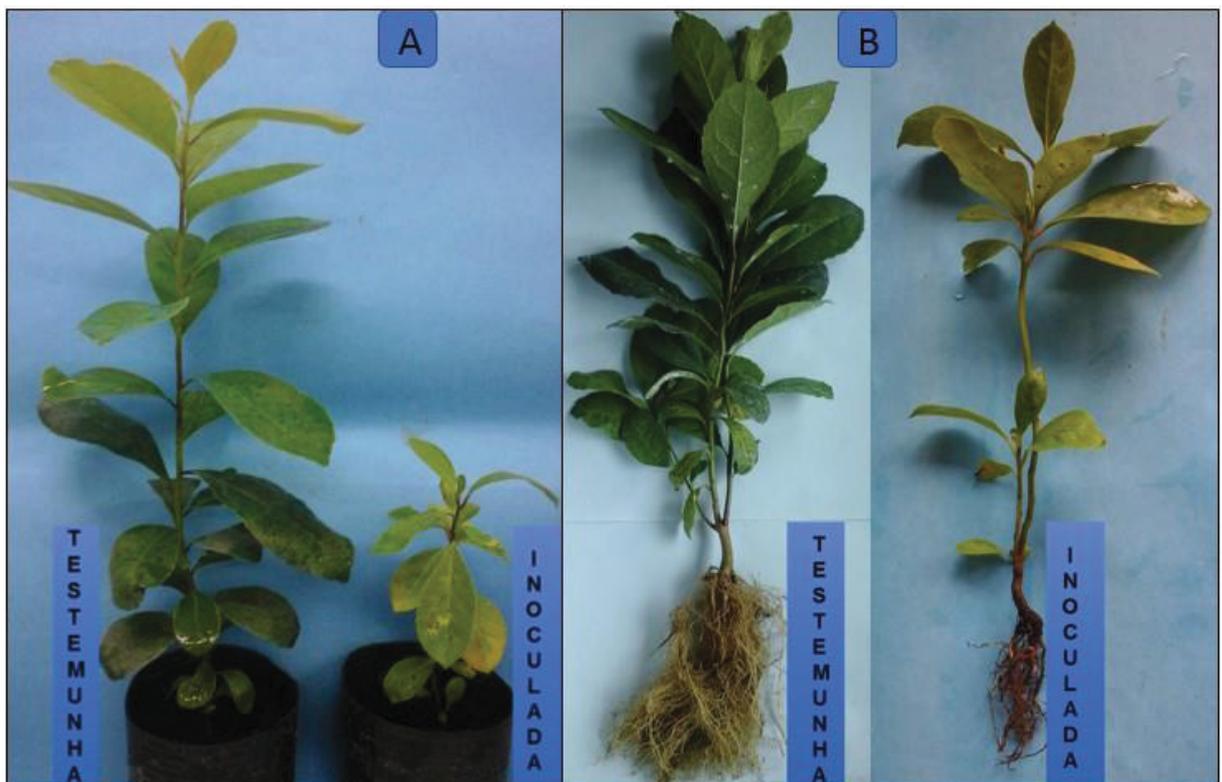


FIGURA 19. ASPECTOS DAS MUDAS DE ERVA-MATE APÓS 180 DIAS DE INOCULAÇÃO COM *Fusarium* spp.: (A) ALTERAÇÕES NO TAMANHO DA MUDA; (B) ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES.
FONTE: O autor (2017).

Além dos sintomas observados na parte aérea, as mudas mortas quando retiradas do substrato continham suas raízes pouco desenvolvidas e escuras (Figura 19 - B), corroborando com os resultados obtidos por Mezzomo (2017, p. 78 - 80) e

com Grigoletti Júnior e Auer (2001, p. 572), os quais informam que o gênero *Fusarium* é o principal patógeno associado à podridão de raízes.

3.7.1 Caracterização morfológica de *Fusarium* spp.

Primeiramente os isolados foram reunidos em dois grupos pelas características de pigmentação da colônia em meio BDA. Sendo que, cinco isolados: FUS1, FUS5, FUS6, FUS7, FUS8 apresentaram coloração violeta (Figura 20), microconídios fusiformes encontradas em mono e polifialide. Macroconídios com três a cinco septos curvados, com uma célula basal pedicelada e a apical ligeiramente curva. Presença de hifas delgadas (Figura 21), facilmente confundidas com clamidósporos. Produção abundante de esporodóquio de cor laranja em meio de cultura CLA (Figura 22) e clamidósporos ausentes.

A pigmentação dos demais três isolados FUS2, FUS3 e FUS4, foi vermelho-carmim (Figura 20). Microconídios ausentes. Os macroconídios abundantes, produzidos em esporodóquio de cor laranja (Figura 22), sendo relativamente delgados, pouco curvados, quase lineares, geralmente de seis a nove septos com uma célula apical curva e a basal em forma de pé. Presença de clamidósporo hialino a castanho claro (Figura 23), solitário ou em cadeias, intercalar ou terminal. Formação de escleródios em meio de cultura BDA.

A pigmentação das colônias não é um parâmetro confiável para identificação morfológica das espécies do gênero *Fusarium*, pois o pH do meio de cultura pode influenciar na coloração do micélio (SUMMERELL et al., 2003, p. 122), e dessa forma induzir a uma falsa conclusão.

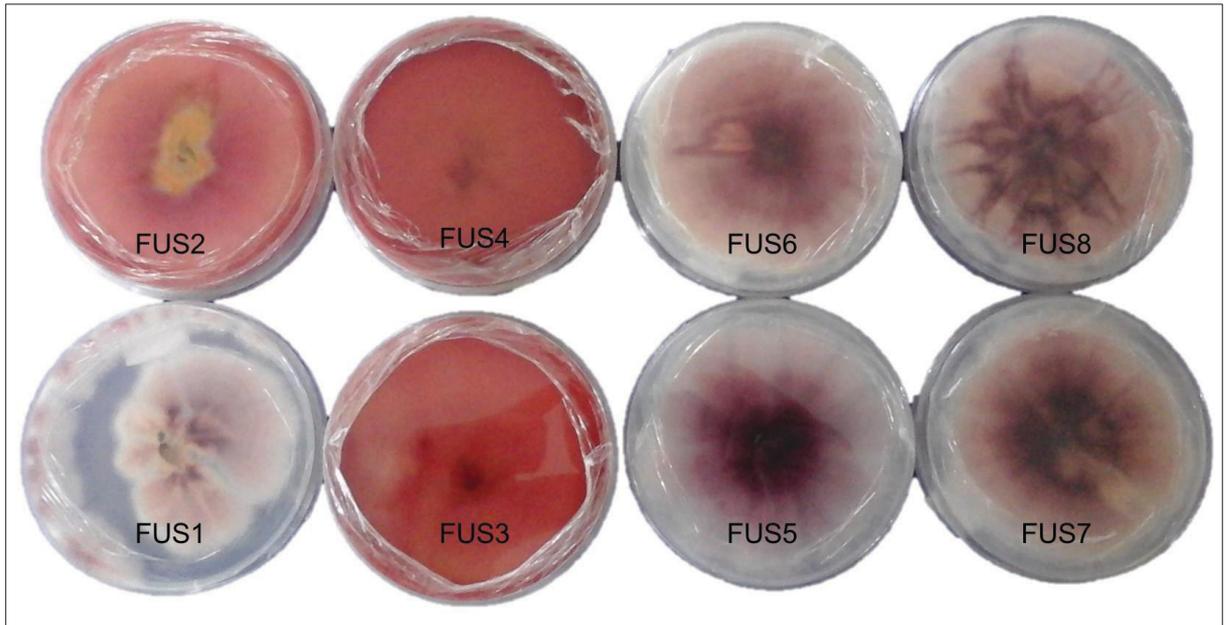


FIGURA 20. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS OITO ISOLADOS DE *Fusarium* spp., ILUSTRANDO A COLORAÇÃO DAS COLÔNIAS EM MEIO DE CULTURA BDA.
FONTE: O autor (2017).



FIGURA 21. HIFAS DELGADAS.
FONTE: O autor (2017).



FIGURA 22. ESPORODÓQUIO DE COR LARANJA, PRODUZIDO EM MEIO DE CULTURA CLA (*Carnation leaf-piece agar*).
FONTE: O autor (2017).

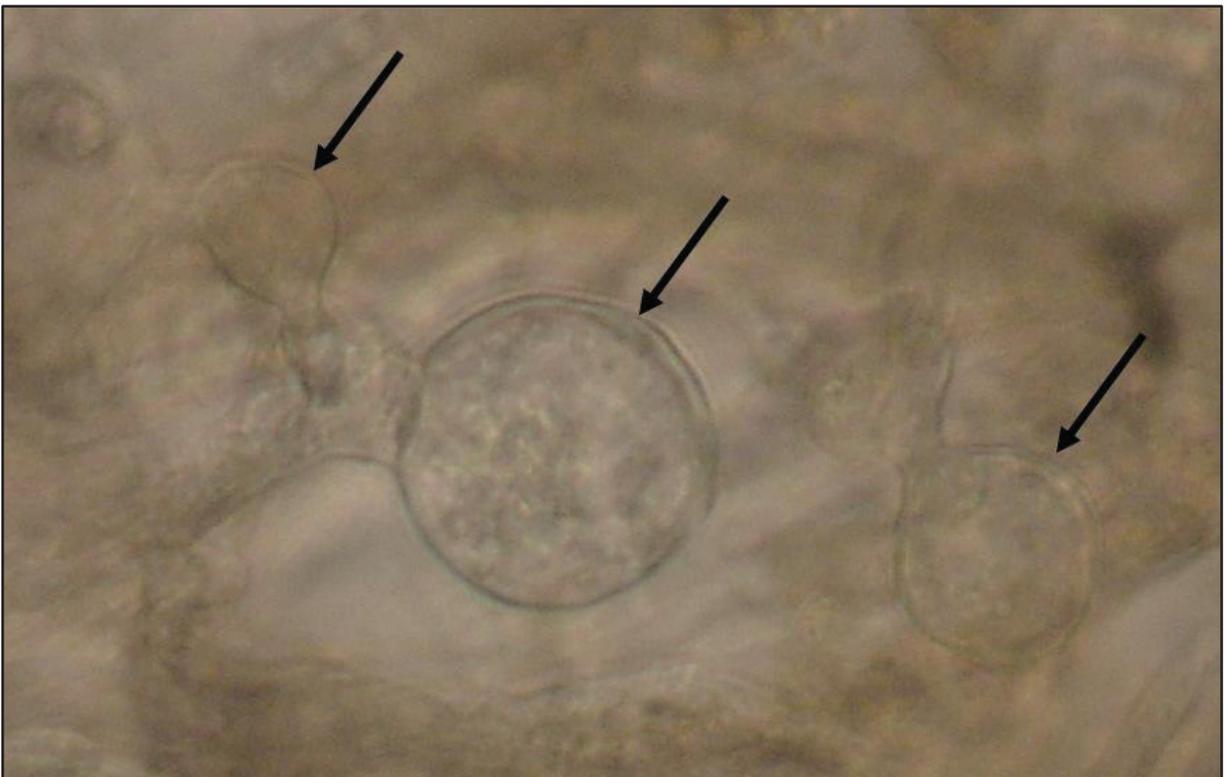


FIGURA 23. CLAMIDÓSPOROS (INDICADOS PELAS SETAS). **FONTE:** O autor (2017).

Na observação morfológica também foram observadas possíveis formações de escleródios em meio de cultura BDA, corroborando com os resultados de trabalhos relatados por Aoki e O'Donnell (1999, p. 602), nos quais os autores observaram a formação de clamidósporos agregados, formando uma estrutura semelhante a escleródios, porém escleródios funcionais nunca foram observados.

3.7.2 Identificação molecular de *Fusarium* spp.

As identificações morfológicas e moleculares dos fungos, são complementares para confirmar a espécie (Tabela 11).

TABELA 11. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Fusarium* spp. PROVENIENTE DE SEMENTES DE ERVA-MATE, CULTIVADOS EM MEIO DE FOLHA DE CRAVO AGAR (FCA) E COMPLEXOS DE ESPÉCIES DE *Fusarium* DE ERVA-MATE IDENTIFICADOS POR MEIO DA REGIÃO FATOR DE ELONGAÇÃO 1 – ALFA (EF-1A) , UTILIZANDO-SE O BANCO DE dados *Fusarium*-ID.

ISOLADOS	MICRO CONÍDIOS	MACRO CONÍDIOS	CLAMIDÓS-POROS	ID (%)	ESPÉCIE
FUS1 FUS5 FUS6 FUS7 FUS8	Falsas cabeças em mono e polifíalide com microconídios obovóide/ovais com 0 a 1 septos	Produção abundante de esporodóquio. Macroconídios de 3 a 5 septos curvados com uma célula basal pedicelada e a apical ligeiramente curva.	Ausentes	94,7% a 97,9%	Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>
FUS2 FUS3 FUS4	Ausentes	Macroconídios produzidos em esporodóquio. São relativamente delgados, pouco curvados, quase lineares, possuem de 6 a 9 septos com uma célula apical curva e a basal em forma de pé. Formação de escleródios	Presentes	97,1%	Complexo <i>Fusarium graminearum</i>

FONTE: O autor (2017).

A identificação dos isolados de *Fusarium* spp. a nível de espécies, foi possível através das técnicas moleculares e ocorreu por meio da amplificação da região fator de alongação 1-alfa.

Com o alinhamento das sequências obtidas com aquelas já depositadas no banco de dados *Fusarium*-ID, verificou-se que os isolados avaliados pertencem a dois

diferentes complexos de espécies, sendo que cinco correspondem ao complexo *Gibberella fujikuroi* e três ao complexo *Fusarium graminearum*.

Considerando-se a possibilidade dos fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum* sp. e aqueles do complexo *Gibberella fujikuroi* e do complexo *Fusarium graminearum* influenciarem no potencial germinativo das sementes de erva-mate e na qualidade fitossanitária das mudas, recomendam-se novos estudos para aprofundar o conhecimento da ação deste fungo nessa espécie.

4. CONCLUSÕES

A viabilidade das sementes de erva-mate é reduzida ao longo dos 180 dias de estratificação em areia;

O desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate, representado pela mudança de forma, decorre progressivamente ao longo dos 180 dias de estratificação, passando pelos estádios mais rudimentares ao estágio maduro.

A germinação das sementes de erva-mate é desuniforme em virtude do desigual estágio de desenvolvimento dos embriões antes de serem submetidos à estratificação.

Os fungos epifíticos com maior percentual de incidência sobre as sementes de erva-mate ao longo do processo de estratificação são:

(Tempo 0): *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp.;

(Tempo 90 dias): *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Nigrospora* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp.;

(Tempo 180 dias): *Trichoderma* spp., *Phomopsis* spp., *Graphium* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp.

Fungos endofíticos como *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. incidem sobre as sementes de erva-mate durante a estratificação.

O fungo *Colletotrichum* spp. é patogênico às folhas jovens de erva-mate.

O fungo *Fusarium* spp. é patogênico às mudas de erva-mate.

De acordo com a identificação molecular, dos oito isolados de *Fusarium* spp., cinco pertencem ao complexo *Gibberella fujikuroi* e três ao complexo *Fusarium graminearum*.

5. REFERÊNCIAS

- AOKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp., formerly recognized as the Group 1 population of *R. graminearum*. **Mycologia**. Lawrence, v. 91, n. 4, p. 597 - 609, 1999.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1982, 241 p.
- BORGES, E. E. de L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 83 - 135, 1993.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 2009, 399 p.
- BRODERS, K. D. et al. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 3, p. 1155-1160, 2007.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. JABOTICABAL: FUNEP, 2000. 588 p.
- CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** [Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais]. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998, 97 p.
- DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados, MS. UFGD/ UEMS, 2009. 288 p.
- DUBOC, E.; FRANÇA, R. S. S. S. R. Resultados preliminares sobre a qualidade de sementes de erva-mate coletados no estado de Mato Grosso do Sul em 2015. **Cadernos Agroecológicos**, v. 11, p. 1-10, 2016.
- FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; CROCE, D. M.; BUSSMANN, I. F. F. Variabilidade genética e o desenvolvimento embrionário de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 21, n. 2, p. 157, 2011.
- FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, n.54, p.105-108, 2007.

FUNDOMATE. **Informativo do Fundomate**. Porto Alegre, n. 24 a 26, 2017, 7 p. Disponível em: < <http://www.agricultura.rs.gov.br/informativo-do-fundomate-591353893b752>>. Acesso em: dez/2017.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; WIELEWSKI, P.; VALLE, G. M. Patogenicidade de *Colletotrichum acutatum* em folhas destacadas de erva-mate. **Boletim de Pesquisas Florestais**, n. 43, p. 151-154, 2001.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Podridão de raízes em erva-mate (*Ilex parajariensis* A. St. Hill) causada por *Fusarium* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 572, 2001.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; ZANON, A.; AUER, C. G.; FOWLER, J. A. P. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes, na emergência de plântulas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p.31-39, 1999.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. Manual de identificação de doenças de soja. (**Documentos, 256**), Embrapa Soja, Londrina, 2005, 72 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. (PEVS). **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2016**. Rio de Janeiro, v. 30, p.1-48, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção Agrícola Municipal – PAM – 2016**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em nov. 2017.

JAREK, T. M.; SANTOS, A. F. Método para obtenção de culturas monospóricas de *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. com micropipetagem. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 49º, 2016, Maceió. **Anais...Maceió: SBF**, 2016.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. [Dissertação Mestrado em Engenharia Florestal], UFPR, Curitiba. 1983.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. First Edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2006, 388 p.

MACIEL, C.; GONZATTO, W.; CLAIR, M.; MARLOVE, F. B.; ARAÚJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* engelm. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 505 - 512, 2014. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622014000300013>

MACHADO, J. C.; WAQUIL, J. M.; SANTOS, J. P.; REICHENBACH, J. W. Tratamento de sementes no controle de fitopatógenos e pragas. In: Sementes: inovações

tecnológicas no cenário nacional. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.232, p.76-87, maio/jun. 2006.

MAFACIOLI, R. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos à pupunheira e outros hospedeiros**. [Tese em Agronomia]. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, 2007, 94 p.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2. ed. ABRATES, Londrina, PR. 2015, 660 p.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)**. Curitiba: EMATER-PR, 1989. 104 p.

MEDEIROS, A. C. de S.; AMAZONAS, M. A. L. A.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; URBEN, A. F. Identificação de fungo lignocelulolítico em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: I CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; II REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1997, Curitiba, PR. **Anais...** 1997. p. 420.

MEDEIROS, A. C. de S.; SILVA, L. C. da. Efeitos da secagem na viabilidade das sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 35-46, 2001.

MEYER, M. C.; KLEPKER, D. Manejo da antracnose em soja. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40º., 2007, Maringá. **Anais...** Maringá: Fitopatologia Brasileira, v. 32 (Suplemento), p. 31-34, 2007.

MEZZOMO, R. **Caracterização e identificação de *Fusarium* spp. associado a *Ilex paraguariensis* no Rio Grande do Sul**. (Tese em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017, 107 p.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS (MDIC). **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet**. Disponível em: < <http://alicesweb.mdic.gov.br>>. Acesso em: nov. 2017.

NOGUEIRA, N. W.; TORRES, S. B.; FREITAS, R. M. O. F. Teste de tetrazólio em sementes de timbaúba. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 2967-2976, 2014.

OLIVEIRA, E.; MACIEL, C. G.; CAMPAGNOLO, K. QUALIDADE SANITÁRIA DE SEMENTES DE ERVA-MATE. **Unoesc & Ciência - ACET** Joaçaba, SC, v. 6, n. 2, p. 233-240, jul./dez. 2015.

PÉREZ, M. L.; COLLAVINO, M. M.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; GALDEANO, E. Diversity of endophytic fungal and bacterial communities in *Ilex paraguariensis* grown under field conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 1 - 15, 2016.

PESKE, S. T.; PESKE, F. B. Absorção de água sob estresse. **Revista SEED News**. Pelotas, RS, n. 3, p. 22 - 27, 2011.

PEVS - **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura** - Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs>>. Acesso em nov./2017.

POLETTO, I.; LUPATINI, M.; MUNIZ, M. F. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores de podridão-de-raízes da erva-mate. **Revista Floresta**, Curitiba, PR, v. 42, n. 1, p. 95 - 104, 2012.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; POLETTO, T. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 281 - 291, 2015.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 5, p. 532 - 537, 2002.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; BERNARDIS, A.; LUNA, C.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L. A. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by in vitro culture of nodal segments. **Biocell**, n. 24, p. 53 - 63, 2000.

SCREMIN-DIAS, E.; KALIFE, C.; HOLSBACK MENEGUCCI, Z. R.; SOUZA, P. R. **Manual de produção de mudas de espécies florestais nativas**. Editora UFMS, Campo Grande, MS, 2006, 59 p.

SOUZA, G. F.; OLIVEIRA, L. M.; CASA, R. T.; SOUZA, A. C.; PUCHALE, L. Z.; AGOSTINETO, L. Sanidade de sementes de erva-mate durante o processo de estratificação. In: Congresso Sul-Americano da Erva-Mate, 7. Simpósio Internacional de Erva-Mate e Saúde, 3. Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira, 1. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, p. 68-72, 2017. **Anais...** Erechim, URI, p. 68-72, 2017.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, n. 87, p. 117 - 128, 2003.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. Produção de mudas de erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. Ed (s). **Propagação e nutrição de erva-mate**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. v. 1. 195 p. 2015.

ZANON, A. Produção de sementes de erva mate. (**Circular Técnica, 16**). Curitiba, Embrapa Florestas, 1988. 8p.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Pelos experimentos realizados neste trabalho, foi possível averiguar que as sementes de *Ilex paraguariensis* possuem comportamento fisiológico do tipo ortodoxo. Tais resultados, foram de suma importância para fins de armazenamento das sementes.

Nas análises histoquímicas realizadas em sementes de erva-mate, observou-se a presença de polifenóis, bem como uma estrutura rugosa localizada entre o endocarpo e o endosperma. O presente trabalho relata, de forma inédita, essa estrutura, a qual foi denominada “barreira rugosa lignificada”. Acredita-se que essa barreira, pela sua composição (lignina), dificulta a expansão das células embrionárias e os compostos fenólicos pela sua ação, inibem a germinação.

No bioensaio, a redução na uniformidade de germinação das sementes de alface refere-se ao potencial efeito inibitório dos extratos elaborados a partir das sementes de erva-mate na mobilização dos componentes nutritivos para a radícula e hipocótilo, uma vez que a ação dos extratos foi desassociada de qualquer efeito do potencial osmótico e do pH, indicando, portanto, atividade alelopática.

Nesse aspecto, os resultados obtidos evidenciam que os extratos de sementes de erva-mate são capazes de interferir no metabolismo da alface, principalmente em relação à germinação e ao crescimento da raiz. Tais informações poderão ser úteis para futuras pesquisas objetivando elucidar quais são os componentes presentes nos extratos e se estes são evidentemente os responsáveis pela inibição da germinação de sementes de erva-mate.

Foi possível observar que sobre as sementes de erva-mate incidem fungos saprofítico, bem como potenciais fitopatógenos como *Fusarium* spp.

As informações resultantes desse trabalho de dissertação são muito importantes para futuras pesquisas, pois reúnem as abordagens químicas, físicas e biológicas que interferem na germinação das sementes de erva-mate e sugerem a continuação dos estudos referentes a germinação das sementes de erva-mate que é lenta e irregular, constituindo um problema que ainda não foi solucionado e apontado como um dos motivos pelos quais ainda há dificuldades na produção das mudas.

7 REFERÊNCIAS GERAIS

AIMI, S. C.; ARAUJO, M. M.; MUNIZ, M. F. B.; WALKER, C. TESTE DE SANIDADE E GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 1361-1370, 2016.

AOKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp., formerly recognized as the Group 1 population of *R. graminearum*. **Mycologia**. Lawrence, v. 91, n. 4, p. 597 - 609, 1999.

AQUILA, M.E.A. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia, Série Botânica**, n. 53, p. 51 - 66, 2000.

AUMONDE, T. Z.; MARTINAZZO, E. G.; PEDÓ, T.; BORELLA, J.; AMARANTE, L.; VILLELA, F. A.; MORAES, D. M. Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface submetidas ao extrato de *Philodendron bipinnatifidum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3181-3192, 2013.

AYUB, D.M.; MARIATH, J.E; COCUCCHI, A. E. Ontogenia do fruto de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. In: REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1. **Anais....** Porto Alegre, p. 132-138, 1992.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. 1.ed. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, 2002, 320 p.

BARBEDO, C. J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botânica Brasílica**. São Paulo, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1982, 241 p.

BARTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523-5527, 2011.

BASKIN, C.; BASKIN, J. **Seeds: ecology biogeography and evolution of dormancy and germination**. Academic Press, San Diego, 1998, 666 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. **Springer-Verlag**, New York. 1982.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2ª Ed. Plenum Press, New York, NY. 1994.

BORELLA, J., WANDSCHEER, A. C. D., BONATTI, L. C., PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, n.7, p. 260 - 265, 2009.

BORGES, E. E. de L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 83 - 135, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 200p.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 2009, 399 p.

BRODERS, K. D. et al. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 3, p. 1155-1160, 2007.

BROTTO, M. L.; VIEIRA, T.; SANTOS, E. P. Flórua do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Paraná, Brasil: Aquifoliaceae. **Estudos de Biologia**, v.29, n. 67, p. 129-135, 2007.

CARDUCCI, C. N.; DABAS, P. C.; MUSE, J. O. Determination *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.), of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in a plant used to prepare tea in South America. **Journal of AOAC International**, Maryland, v. 83, n. 5, p. 1167-1173, 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. JABOTICABAL: FUNEP, 2000. 588 p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras**, vol. 2. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 627p.

CATAPAN, M. I. S. Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. [Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais]. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998, 97 p.

COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. E. P. Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro. **Horticultura Brasileira**, n. 29, p. 108-111, 2011.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; VENTRELLA, M. C.; LEITE, I. T. A.; BRAGA, A. J. T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedling early growth. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 641 - 650, 2008.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M.; ANCHORDOGUY, T. J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. **Criobiology**, v. 27, p. 219 - 231, 1998.

CUNHA, G. G.; FERREIRA, A. G. Viabilidade das sementes de erva-mate. **Ciência e Cultura**, Porto Alegre, v. 10, n. 39, p. 974-976, 1987.

CUQUEL, F. L.; CARVALHO, M. L. M.; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 415-421, 1994.

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados, MS. UFGD/ UEMS, 2009. 288 p.

DIAPP, C.J. Espermo-anatomia e período de crescimento do embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Dusenya**, Curitiba, v.14, n.3, p.113-121, 1984.

DIAS, D. C. F. S. Dormência em sementes: mecanismos de sobrevivência das espécies. **Revista Seed News**. Pelotas, RS, jul/ago, ano IX, n.4, 2005.

DIAZ, V. S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguaçu**. [Dissertação de Mestrado]. ESALQ/USP. Piracicaba, 2013. 89 p.

DUBOC, E.; FRANÇA, R. S. S. S. R. Resultados preliminares sobre a qualidade de sementes de erva-mate coletados no estado de Mato Grosso do Sul em 2015. **Cadernos Agroecológicos**, v. 11, p. 1-10, 2016.

EBERLEIN, C. V. Germination of *Sorghum alnum* seeds and longevity in soil. **Weed Science**, Cambridge University Press, v. 35, n. 6, p. 796-801, 1987.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour. In: *Coffee*. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 41, n. 230, p.1167-1174, 1990.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. The development of desiccation-tolerance and maximum seed quality during seed maturation in six grain legumes. **Annals of Botany**, v. 59, n. 1, p. 23-29, 1987.

FADIMU, O. Y.; IDOWU, O. T. H.; IPINLAYE, S. J. Studies on the dormancy and germination of stony fruits of hog plum (*Spondias mombin*) in response to different pre-soaking seed treatments. **International Research Journal of Biological Sciences**, Madhya Pradesh, v. 3, n. 6, p. 57-62, 2014.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, n. 142, p. 839-854, 2006.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, Edição Especial, p. 175-204. 2000.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

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

FERREIRA, A.G.; HU, C.Y. Influência da luz na embriogênese tardia de *Ilex*, cultura "in vitro". In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34. Porto Alegre. **Anais...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, p. 441-449, 1984.

FERREIRA, M. C.; SOUZA, J. R. P.; FARIA, T. J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. **Ciência Agrotécnica**, n. 31, p. 1054 - 1060, 2007.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

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

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; CROCE, D. M.; BUSSMANN, I. F. F. Variabilidade genética e o desenvolvimento embrionário de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 21, n. 2, p. 157, 2011.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, n.54, p.105-108, 2007.

FREITAS, G. B. L.; ANDRIOLA, A.; GAUER, A. G.; IENK, L. S. S. Erva-mate, muito mais que uma tradição, um verdadeiro potencial terapêutico. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol. VIII, n. 3, p. 101 - 113, 2011. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/download/15966/9817> Acesso em: nov. 2017.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, O. B.; RIBANI, R. H. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **Food Science and Technology**, Campinas, SP, v. 60, p. 795 - 801, 2015.

FUNDOMATE. Informativo do Fundomate. Porto Alegre, n. 24 a 26, 2017, 7 p. Disponível em: < <http://www.agricultura.rs.gov.br/informativo-do-fundomate-591353893b752>>. Acesso em: dez/2017.

GATTI, A. B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003, 148 f.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; WIELEWSKI, P.; VALLE, G. M. Patogenicidade de *Colletotrichum acutatum* em folhas destacadas de erva-mate. **Boletim de Pesquisas Florestais**, n. 43, p. 151-154, 2001.

GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. **American Journal of Botany**., v. 92, n.2, p. 352-369, 2005.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Podridão de raízes em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill) causada por *Fusarium* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 572, 2001.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; ZANON, A.; AUER, C. G.; FOWLER, J. A. P. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes, na emergência de plântulas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p.31-39, 1999.

GROOT, S. P. C.; SOEDA, Y.; STOOPEN, G.; KONINGS, M. C. J. M.; GEEST, A. H. M. van der. Gene expression during loss and regaining of stress tolerance at seed priming and drying. In: NICOLÁS, G.; BRADFORD, K. J.; CÔME, D.; PRITCHARD, H. D. (Ed.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003. p. 279 - 287.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R. Aquifoliaceae. In: WANDERLEY, M. G. L; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. (Org.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. 1ªed. São Paulo: HUCITEC/FAPESP, v. 2, p. 31-37, 2002.

GUSMAN, G. S.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Scientiarum**, n. 30, p. 119 - 125, 2008.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. Manual de identificação de doenças de soja. (**Documentos, 256**), Embrapa Soja, Londrina, 2005, 72 p.

HEUSER, E. D. **Embriogênese em *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aspectos do suspensor e endosperma**. Tese de Doutorado em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1990, 145 p.

HEUSER, E. D.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A. *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. La Plata, v. 29, n. 1-2, p. 39-48, 1993.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; NIJSSE, J. What do we know about desiccation tolerance mechanism? In: NICOLÁS, G.; BRADFORD, K. J.; CÔME, D.; PRITCHARD, H. D. (Ed.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003. p. 259 - 270.

HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A.; BASTOS, C. F.; WALLAU, G. L. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieff enbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista Ciências Agroveterinárias**, v. 6, n.1, p.11 - 21, 2007.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behaviour. (Technical Bulletin n. 1). In: ENGELS, J. M. M.; Toll, J. (Eds.) **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy, 1996, 62 p.

HONG, T.D.; LININGTON, S.; ELLIS, R.H. **Seed storage behaviour: a compendium**. International Plant Genetic Resources Inst. (IPGRI), Rome, Italy, 1996, 115 p.

HORŽIĆ, D.; KOMES, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K. K.; IVEKOVIĆ, D.; KARLOVIĆ, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. **Journal Food Chemistry**, v. 115, p. 441 - 448, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000300026>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. (PEVS). **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2016**. Rio de Janeiro, v. 30, p.1-48, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção Agrícola Municipal – PAM – 2016**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em nov. 2017.

IPGRI-DFSC (International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; and Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark). **The Desiccation and Storage Protocol**. In: SACANDE, M.; JOKER, D.; EHSAN DULLOO, M.; K.A. THOMSEN, K. A. (eds). Comparative Storage Biology of Tropical Tree Seeds. Earthprint Rome, Italy, 2004, 363 p.

JAREK, T. M.; SANTOS, A. F. Método para obtenção de culturas monospóricas de *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. com micropipetagem. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 49º, 2016, Maceió. **Anais...Maceió**: SBF, 2016.

JOSÉ, A. C.; SILVA, E. A.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes de cinco espécies arbóreas de mata ciliar quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 171-178, 2007.

KOHOMA S.; MALUF A. M.; BILIA D. A. C.; BARBEDO C. J. SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *Eugenia brasiliensis* LAM. (GRUMIXAMEIRA). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, n. 1, p. 72 - 78, 2006.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. [Dissertação Mestrado em Engenharia Florestal], UFPR, Curitiba. 1983.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Aiton). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.

LADEIRA, A. M.; Z Aidan, L. B. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. *Ageratum conyzoides* L. (Compositae): germinação, floração e ocorrência de derivados fenólicos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Hoehnea**, v.15, p.53-62, 1987.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; MACIEL, C. G.; LONGH, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região Sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, 2012.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. First Edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2006, 388 p.

LODHI, M.A.K. Germination decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its autoallelopathy. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 10, p. 1083-1088, 1979.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MONTANHA, J. A.; HEIZMANN, B. M.; ATHAYDE, M. L.; TAKETA, A. T. C.; PIRES, V. S.; GUILLAUME, D. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 49, p. 359-363, 1997.

MACHADO, J. C.; WAQUIL, J. M.; SANTOS, J. P.; REICHENBACH, J. W. Tratamento de sementes no controle de fitopatógenos e pragas. In: Sementes: inovações tecnológicas no cenário nacional. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.232, p.76-87, maio/jun. 2006.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACIEL, A. S.; ANDRADE, A. M. Quantificação de fenóis totais em sementes de cinco espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, Rio de Janeiro, n. 3, p. 22-27, 1996.

MACIEL, A. S.; BORGES, E. E. L.; BORGES, L. C. G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v.14, n.1, p.1-8, 1992.

MACIEL, C.; GONZATTO, W.; CLAIR, M.; MARLOVE, F. B.; ARAÚJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* engelm. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 505 - 512, 2014. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622014000300013>

MAFACIOLI, R. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos à pupunheira e outros**

hospedeiros. [Tese em Agronomia]. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, 2007, 94 p.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2. ed. ABRATES, Londrina, PR. 2015, 660 p.

MAYRINCK, R. C.; VAZ, T. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no armazenamento. **CERNE**, Lavras, v. 22, n. 1, p. 85-92, 2016.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. Curitiba, EMATER. 1991. 104 p.

MEDEIROS, A. C. de S.; ALVES, V. G.; NOGUEIRA, A. C.; REICHER, F. Determinação de compostos fenólicos em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIAO TECNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...Embrapa Florestas**, Colombo, PR, p. 418-419, 1997.

MEDEIROS, A. C. de S.; AMAZONAS, M. A. L. A; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; URBEN, A. F. Identificação de fungo lignocelulolítico em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: I CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE; II REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1997, Curitiba, PR. **Anais...** 1997. p. 420.

MEDEIROS, A. C. de S.; SILVA, L. C. da. Efeitos da secagem na viabilidade das sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 35-46, 2001.

MEDEIROS, A. C. S. Aspectos de dormência em sementes de espécies arbóreas. **Circular técnica 55**. Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2001, 12 p.

MEDEIROS, A. C. S. Dormência em sementes de erva-mate. **Documentos, 16**. Embrapa Florestas, Curitiba, 1998, 25 p.

MEDEIROS, A. C. S.; SILVA, L. C. Efeitos da secagem na viabilidade das sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 35-46, 2001.

MELLO, V. D. C. **Morfologia e germinação da semente de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. [Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias]. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 1980. 49 p.

MENEZES, N. L.; FRANZIN, S. M.; BORTOLOTTI, R. P. Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de Superação. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, v.7, n.1, p. 35- 44, 2009.

MENNA, A. B. Proposta para ação extensionista na cultura da erva-mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E., de A.; TARASCONI, L. C. (Org.). **Erva-mate: biologia e cultura no cone sul**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p. 235-239, 1995.

METIVIER, J.R. Dormência e germinação. In: FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo, EPU/EDUSP, v.2, cap.12, p. 343-392, 1986.

MEYER, M. C.; KLEPKER, D. Manejo da antracnose em soja. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40º., 2007, Maringá. **Anais...** Maringá: Fitopatologia Brasileira, v. 32 (Suplemento), p. 31-34, 2007.

MEZZOMO, R. **Caracterização e identificação de *Fusarium* spp. associado a *Ilex paraguariensis* no Rio Grande do Sul**. (Tese em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017, 107 p.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS (MDIC). **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet**. Disponível em: < <http://aliceweb.mdic.gov.br>>. Acesso em: nov. 2017.

MIRESKI, M. C.; VIEIRA, E. S. N.; WENDLING, I.; BÜHRER, C. B.; NOGUEIRA, A. C. Desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Informativo Abrates**, Londrina, PR, v. 27, n. 2. p. 251, 2017.

MIRÓ, C. P.; FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 261 - 270, 1998.

NEVES, J. M. G; SILVA, H. P.; AQUINO, C. F.; BRANDÃO, A. A.; DUARTE, R. F.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; SALES, N. L. P. Determinação de inibidores e superação de dormência em sementes de cutieira. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 3, n. 2, p. 121 - 128, 2013.

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

NOGUEIRA, E. S.; WANDERLEY, J. M.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Tolerância de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell. – Meliaceae) à dessecação. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 268, 2001.

NOGUEIRA, N. W.; TORRES, S. B.; FREITAS, R. M. O. F. Teste de tetrazólio em sementes de timbaúba. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 2967-2976, 2014.

OLIVEIRA, A. K.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; DIÓGENES, F. E. P.; MEDEIROS FILHO, S. Alelopatia de extratos de diferentes órgãos de mulungu na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, n. 30, p. 480 - 483, 2012.

OLIVEIRA, E.; MACIEL, C. G.; CAMPAGNOLO, K. QUALIDADE SANITÁRIA DE SEMENTES DE ERVA-MATE. **Unoesc & Ciência** - ACET Joaçaba, SC, v. 6, n. 2, p. 233-240, jul./dez. 2015.

OLIVEIRA, J. A.; SILVA, T. T. A.; PINHO, E V. R. V.; ABREU, L. A. S. Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino, **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 699 - 710, 2011.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. 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).

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C.D.; SILVA, C. B.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M. D. Potencial fitotóxico com enfoque alelopático de **Bauhinia unguolata** L. sobre sementes e plântulas de alface e cebola. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 445 - 452, 2015.

PEREIRA, C. E.; VON PINHO, E. V. R.; OLIVEIRA, D. F.; KIKUTI, A. L. P. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 306-311, 2002.

PÉREZ, M. L; COLLAVINO, M. M.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; GALDEANO, E. Diversity of endophytic fungal and bacterial communities in *Ilex paraguariensis* grown under field conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 1 - 15, 2016.

PESKE, S. T.; PESKE, F. B. Absorção de água sob estresse. **Revista SEED News**. Pelotas, RS, n. 3, p. 22 - 27, 2011.

PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G. R. M. **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos**. 3ª edição. Pelotas: Editora Pelotas, 2012. 573 p.

PEVS - Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs>>. Acesso em nov./2017.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JUNIOR. RS; CONSTANTIN J. **Plantas daninhas e seu manejo**. Editora Agropecuária, Guaíba, RS, p.145 - 185, 2001.

POLETTO, I.; LUPATINI, M.; MUNIZ, M. F. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores de podridão-de-raízes da erva-mate. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 42, n. 1, p. 95 - 104, 2012.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; POLETTO, T. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 281 - 291, 2015.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

RIL, F. T.; LOCH, C. R.; VALDUGA, A. T.; MACEDO, S. M. D.; CICHOSKI, A. J. Perfil bioquímico de ratos alimentados com iogurte contendo extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 332-337, 2011.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, University of Reading, Earley Gate, U.K. v. 1, p. 499-514, 1973.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 5, p. 532 - 537, 2002.

ROY, M. M. Effects of pH on germination of *Dichrostachys cineria* (L.). Wegth & Arn. **Journal Tree Science**, Solan, Índia, v. 5, n. 1, p. 62-64, 1986.

SACANDÉ, M.; JOKER, D.; DULLOO, M. E.; THOMPSEN, K. A. **Comparative storage biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. 363 p.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; BERNARDIS, A.; LUNA, C.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L. A. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by in vitro culture of nodal segments. **Biocell**, n. 24, p. 53 – 63, 2000.

SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D. Doenças em mudas e tipos de associações entre fungos e sementes florestais. In: SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. (Ed.). **Patologia de Sementes Florestais**. Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2015, 236 p.

SANTOS, C. O; TRINDADE, S. C.; SILVEIRA, M. L. R.; SANTOS, R. O.; SAUTTER, C. K. Caracterização, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em diferentes tipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) para chimarrão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 73, n. 1, p. 77 - 86, 2014.

SCREMIN-DIAS, E.; KALIFE, C.; HOLSBACK MENEGUCCI, Z. R.; SOUZA, P. R. **Manual de produção de mudas de espécies florestais nativas**. Editora UFMS, Campo Grande, MS, 2006, 59 p.

SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 61 - 69, 2006a.

SIMEÃO, R. M.; STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V.; FERNANDES, J. S. C.; NEIVERTH, D. D.; ULBRICH, A. L. Avaliação genética em erva-mate pelo procedimento BLUP individual multivariado sob interação genótipo x ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1589 - 1596, 2002.

SINDIMATERS – Sindicato da Indústria do Mate no Estado do Rio Grande do Sul. **Dados estatísticos Erva-Mate**. Porto Alegre, RS. 2016. Disponível em: <<http://sindimaters.com.br/pagina.php?cont=estatisticas.php&sel=9>> Acesso em nov. 2017.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHIMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial system. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, p. 63-121, 1991.

SOUSA, V. A.; AGUIAR, A. V.; SPOLADORE, J. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 39, p. 315-323, 2015.

SOUZA, G. F.; OLIVEIRA, L. M.; CASA, R. T.; SOUZA, A. C.; PUCHALE, L. Z.; AGOSTINETO, L. Sanidade de sementes de erva-mate durante o processo de estratificação. In: Congresso Sul-Americano da Erva-Mate, 7. Simpósio Internacional de Erva-Mate e Saúde, 3. Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira, 1. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, p. 68-72, 2017. **Anais...** Erechim, URI, p. 68-72, 2017.

SOUZA, S. A. M; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D.P.; PIANA, C. F. B.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface. *Publicações UEPG, Ciência Biologia e Saúde*, n. 11, p. 29 - 38, 2005.

SPICHIGER, R.; SAVOLAINEN, V.; MANEN, JEAN-FRANÇOIS. **Systematic affinities of Aquifoliaceae and Icacinaceae from molecular data analysis.** *Candollea*. Geneve. v. 48, n. 2, p. 459-464. 1993.

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

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, n. 87, p. 117 - 128, 2003.

TEZUKA, T.; YOKOYAMA, H.; TANAKA, H.; SHIOZAKI, S.; ODA, M. Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. **HortScience**, v. 48, p. 352–356, 2013.

TOKUHISA, D.; DIAS, D. C. F. S; ALVARENGA, E. M.; HILST, P. C.; DEMUNER, A. J. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 3, p.161-168, 2007.

TOKUHISA, D.; SANTOS DIAS, D. C. F.; ALVARENGA, E. M.; HILST, P. C.; DEMUNER, A. J. Phenolic compound inhibitors in papaya seeds (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 180-188, 2007.

TOOLE, E. H.; HENDRICKS, S. B.; BORTHWICK, H.; TOOLE, V. K. Physiology of seed germination. **Annual Review of Plant Physiology**. n. 7, p.299-324, 1956.

VENTRELLA, M. C.; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes.** Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2013, 40 p.

VIEIRA, A.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; OLIVEIRA J.A.; SANTOS, C.D. Alterações fisiológicas e enzimáticas em sementes dormentes de arroz armazenadas em diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.22, n.2, p.53-61, 2000.

VIVIAN, R.; SILVA, A. A.; GIMENES JÚNIOR, M.; FAGAN, E. B.; RUIZ, S. T.; LABONIA, V. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência: breve revisão. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 695 - 706, 2008.

WAREING, P.P. Endogenous inhibitors of seeds germination and dormancy. **Encyclopedia of Plant Physiology**, New York, v. 15, n. 2, p. 909 - 922, 1965.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. Produção de mudas de erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. Ed (s). **Propagação e nutrição de erva-mate**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. v. 1. p. 11-98, 2015. 195 p.

WENDT, S. N.; SOUSA, V. A.; QUOIRIN, M.; SEBBENN, A. M.; MAZZA, M. C.; STURION, J. A. Caracterização genética de procedências e progênies de *Ilex paraguariensis* St. Hil. utilizando marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, n. 73, p. 47 - 53, 2007.

YANG, Y.; ZHANG, D.; LI, Z.; JIN, X.; DONG, J. Immature Embryo Germination and Its Micropropagation of *Ilex crenata* Thunb. **HortScience**, v. 50, p.733-737, 2015.

ZAMPIER, A. C. **Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. [Dissertação de Mestrado]. UFPR, Curitiba, 2001.

ZANON, A. Produção de sementes de erva mate. (**Circular Técnica, 16**). Colombo (PR): Embrapa Florestas, 1988. 8p.