

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELEN PAOLA DE SÁ

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil: MINIESTAQUIA, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E BIOQUÍMICA E, ESTIMATIVA DO ENRAIZAMENTO POR ESPECTROSCOPIA NIR

Curitiba

2018

FRANCIELEN PAOLA DE SÁ

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil: MINIESTAQUIA, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E BIOQUÍMICA E, ESTIMATIVA DO ENRAIZAMENTO POR ESPECTROSCOPIA NIR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Katia Christina Zuffellato-Ribas

Coorientador: Dr. Ivar Wendling

CURITIBA

2018

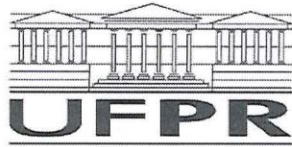
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, DOUGLAS ALEX JANKOSKI CRB 9/1167  
COM OS DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

SA1111 Sá, Francielen Paola de  
*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil: miniestaquia, caracterização  
anatômica e bioquímica e estimativa do enraizamento por  
espectroscopia NIR / Francielen Paola de Sá. - Curitiba, 2018.  
142 f. : il., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia –  
(Produção Vegetal).  
Orientadora: Katia Christina Zuffellato-Ribas  
Coorientador: Ivar Wendling

1. Erva-mate - Cultivo. 2. Erva-mate - Propagação por  
estaquia. 3. Clonagem. 4. Auxina. I. Zuffellato-Ribas, Katia  
Christina. II. Wendling, Ivar. III. Título. IV. Universidade Federal do  
Paraná.

CDU 633.77



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL)

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FRANCIELEN PAOLA DE SA** intitulada: intitulada *Ilex paraguariensis* A.St.-Hill: **MINIESTAQUIA, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E BIOQUÍMICA E, ESTIMATIVA DO ENRAIZAMENTO POR ESPECTROSCOPIA NIR**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2018.

  
KATIA CHRISTINA ZUFFELLATO RIBAS  
Presidente da Banca Examinadora

  
IVAR WENDLING  
Avaliador Externo

  
MARCELO LAZZAROTTO  
Avaliador Externo

  
DAGMA KRATZ  
Avaliador Externo

  
HENRIQUE SOARES KOEHLER  
Avaliador Interno

## AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora Aparecida por me guiar e encher minha vida de bênçãos.

À Deus por me fornecer saúde, sabedoria e me cercar de pessoas maravilhosas.

À minha família por sempre respeitar minhas escolhas e me dar todo amor, incentivo e carinho.

Ao Nando (Fernando Lisovski) por todo seu amor, apoio, dedicação e paciência.

À Lisa, minha *cãopanheira* amada que enche os meus dias de alegria.

À minha orientadora Dra. Katia Christina Zuffellato-Ribas, pela sua orientação, confiança, dedicação, incentivo e amizade. Seus ensinamentos contribuíram muito para minha formação. Sinto-me honrada por ter convivido com uma pessoa tão incrível, admirável e solidária. Não tenho palavras para agradecer e expressar tudo o que você representa para mim.

À pesquisadora Dra. Cristiane Vieira Helm por todo o seu carinho, atenção e compreensão. Sou grata por ter recebido suas orientações, incentivo e todo o auxílio possível. Obrigada por fornecer todos os recursos disponíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Ivar Wendling pelo apoio total e irrestrito ao desenvolvimento desta tese, sempre solícito e paciente no esclarecimento de dúvidas. Agradeço por todos os seus conselhos e sugestões.

Ao pesquisador Dr. Marcelo Lazzarotto pela coorientação e, à Simone Lazzarotto por todo o seu carinho e amizade.

Aos integrantes da banca de qualificação: Yohana de Oliveira Cauduro, Átila Francisco Mógor e Henrique Soares Koehler, por todas as críticas e sugestões.

Ao professor Dr. Bruno Francisco Sant' Anna dos Santos por todas as contribuições.

À minha querida amiga Deborah Cristian Portes por todo seu auxílio, apoio e amizade. Você tornou a minha caminhada muito mais leve e divertida e, certamente, sem a sua ajuda, eu não teria conseguido capturar os milhares espectros NIR.

À Geisa Liandra pela sua amizade e imenso apoio. Tenho você como exemplo de dedicação e perseverança.

À Aline Heberle e Tamires por terem sido sempre tão queridas e prestativas.

À professora Rozimeiry G. Bezerra Gaspar por sua amizade e incentivo.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

À Lucimara Antunes, profissional extremamente competente e prestativa, agradeço por toda sua atenção e carinho em todas as minhas solicitações.

A todos os colegas do programa de pós-graduação em Produção vegetal, em especial à Caroline Frizzo, Crizane Hackbarth, Renata Grunennvaldt e Lury Forero.

As colegas que participaram do inesquecível teatro sobre Germinação Francielli Teleginski, Natalia Marcondes, Jéssica Tomasi, Laudiane Zanella e Heloise Volpe.

Ao GEPE, em especial a Renata Maggioni, Leandro Lato, Leandro Marcolino e Nicolas Schwaner pelas inúmeras sugestões de melhorias, amizade, incentivo, companheirismo e momentos de descontração.

Aos funcionários da Embrapa Florestas: Dayanne Andrade, Fabrício Hansel, Tiélidy de Lima, Simone Sopchaki, Daiane Kestring, Marianne Bernardes, Caroline Bühner, Guilherme Schnell e Schühli, Patrícia Zanoni, Álvaro Figueredo, Juliana Degenhardt Goldbach por fornecerem seu tempo para o esclarecimento de dúvidas e pela disponibilização de materiais e/ou equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de propagação de espécies florestais da Embrapa Florestas: Joel Veiga, Vero dos Santos, Décio Adams, Leonides Tanner pela colaboração e pelos momentos de descontração.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (Curitiba-PR) por disponibilizar o liofilizador, em especial ao Alex, que foi extremamente atencioso comigo e cuidadoso com as minhas amostras.

À minha orientadora de mestrado Dra. Ana da Silva Lédo que sempre foi altamente dedicada e preocupada com a formação de seus orientados. Seus conselhos, dicas e ensinamentos para sempre serão lembrados.

À Capes pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Embrapa Florestas pela disponibilização de insumos e equipamentos.

À Empresa Baldo pela disponibilização do material vegetal utilizado.

## RESUMO

*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., espécie arbórea, popularmente conhecida como erva-mate, nativa da América do Sul, apresenta relevância socioeconômica, principalmente na região sul do Brasil. A propagação seminal da espécie possui limitações devido a dormência embrionária e tegumentar, que acarreta na baixa (inferior a 20%), lenta e desuniforme (de 100 a 360 dias) germinação. Os entraves relacionados a produção de mudas via sementes podem ser superados com a utilização de técnicas de propagação vegetativa. Nesse contexto, a presente tese teve como objetivos gerais otimizar o protocolo da miniestquia e relacionar os principais fatores que influenciam o enraizamento adventício da erva-mate. Para tanto, o trabalho foi dividido em quatro capítulos. O primeiro abordou o efeito de diferentes concentrações do ácido indol butírico (IBA) no enraizamento das miniestacas de erva-mate. No segundo capítulo avaliou-se o enraizamento adventício de seis clones de erva-mate, coletados em quatro estações do ano e, a capacidade rizogênica destes clones foi correlacionada com os níveis endógenos de açúcares totais (AT), proteínas totais (PT) e ácido indol acético (IAA) livre. No terceiro capítulo, verificou-se o enraizamento de dois padrões de miniestacas, coletados das porções apical e basal de brotações de minicepas de erva-mate. Além disso, o enraizamento foi correlacionado com a composição bioquímica (peroxidase-POD, polifenoloxidase-PPO e compostos fenólicos-CF) e com as características anatômicas dos propágulos. Por fim, o quarto capítulo baseou-se no desenvolvimento de um método não destrutivo para predição do enraizamento, utilizando a espectroscopia por infravermelho próximo (NIR). Verificou-se aumento de 38% no índice de enraizamento com a suplementação de 8000 mg L<sup>-1</sup> de IBA, havendo um aumento linear crescente do enraizamento em relação às concentrações do regulador vegetal. Os clones de erva-mate apresentaram potencial rizogênico distinto, sendo que aqueles coletados na primavera mostraram satisfatórias taxas de enraizamento (acima de 80%) e os maiores níveis de AT, PT e IAA (133 mg g<sup>-1</sup>, 46,6 mg g<sup>-1</sup> e 526,6 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente). Com relação ao estudo do enraizamento dos dois padrões de miniestacas (apical e basal), ambos os materiais analisados apresentaram o mesmo potencial rizogênico (cerca de 42,7% de enraizamento). Durante a análise dos compostos bioquímicos, verificou-se o aumento na produção de POD e o consumo de PPO e CF durante o enraizamento. Os padrões de miniestacas foram anatomicamente idênticos e, apesar da presença de um anel de esclerênquima, este não atuou como barreira para emissão das raízes adventícias. Com relação ao uso da técnica NIR, o modelo desenvolvido foi adequado para estimar o enraizamento das miniestacas de erva-mate, com satisfatório coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e desvio da razão de performance (RPD), 0,68 e 1,75, respectivamente. De maneira geral, conclui-se que o enraizamento de miniestacas de erva-mate é genótipo-dependente; a estação do ano mais favorável para coleta dos propágulos é a primavera; compostos bioquímicos (AT, PT e IAA) estão correlacionados com a formação e desenvolvimento de raízes adventícias; recomenda-se o uso do regulador vegetal (IBA) para propágulos que apresentam baixos índices de enraizamento (inferior a 50%); o anel de esclerênquima não atua como uma barreira anatômica; o modelo NIR é adequado para estimar do enraizamento de miniestacas de erva-mate, porém o mesmo deve ser aprimorado em estudos futuros a fim de agilizar e facilitar a predição de propágulos mais responsivos ao enraizamento.

**Palavras-chave:** Clonagem. Erva-mate. Propagação vegetativa. Auxina.

## ABSTRACT

*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., a tree species, popularly known as yerba mate, native to South America, has socioeconomic relevance, mainly in southern Brazil. The seminal propagation of the species presents limitations due to embryonic and tegument dormancy, which causes low (less than 20%), slow and desuniform (100 to 360 days) germination. The obstacles related to the production of seedlings can be overcome with the application of vegetative propagation techniques. In this context, the present thesis had as general aims to optimize the protocol of mini-cuttings technique and to relate the main factors that influence the adventitious rooting of yerba mate. So, the work was divided into four chapters. The first chapter approached the effect of different concentrations of indole butyric acid (IBA) on the rooting of yerba mate mini-cuttings. In the second chapter we evaluated the adventitious rooting of six clones of yerba mate collected at four seasons of the year. The rhizogenic capacity of these clones was correlated with the endogenous levels of total sugars (AT), total proteins (PT) and free indole acetic acid (IAA). On third chapter, we verified the rooting of two types of mini-cuttings, collected from the apical and basal portions of mini-stumps. In addition, rooting was correlated with the biochemical composition (peroxidase-POD, polyphenoloxidase-PPO and phenolic compounds-CF) and with the anatomical characteristics of the propagules. Finally, the fourth chapter was based on the development of a non-destructive method for the prediction of rooting potential using near infrared (NIR) spectroscopy. There was an increase of 38% in the rooting index with the supplementation IBA at 8000 mg L<sup>-1</sup>, with a linear increase in rooting in relation to the concentrations of the plant regulator. The yerba mate clones showed difference at the rhizogenic potential, and for those collected in the spring the rooting showed superior results (above 80%) and the highest levels of AT, PT and IAA (133 mg g<sup>-1</sup>, 46.6 mg g<sup>-1</sup> and 526.6 mg g<sup>-1</sup>, respectively). Regarding the study of the rooting of the two types of mini-cuttings, both presented the same rhizogenic potential (about 42.7% of rooting). During the analysis of the biochemical compounds, there was an increase in the production of POD and the consumption of PPO and CF during rooting. The two types of mini-cuttings (apical and basal) were anatomically identical and, despite the presence of a sclerenchyma ring, this did not act as a barrier for adventitious root. In relation to the use of the NIR technique, the developed model was adequate to estimate the rooting of the yerba mate mini-cuttings, with a satisfactory coefficient of determination (R<sup>2</sup>) and ratio of performance to deviation, 0.68 e 1.75, respectively. In general, we concluded that the rooting of yerba mate mini-cuttings is genotype-dependent; the most favorable time of year for collecting the propagules is spring; biochemical compounds are correlated with the formation and development of adventitious roots; it is recommended to use the plant regulator (IBA) for propagules with low rooting rates (less than 50%); the ring of sclerenchyma does not act as an anatomical barrier; the NIR model is efficient for estimating the rooting of yerba mate mini-cuttings, but it should be improved in future studies in order to accelerate and facilitate the prediction of propagules more responsive to rooting.

**Keywords:** Cloning. Yerba mate. Vegetative propagation. Auxin.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Temperaturas mínimas, máximas e médias (°C) em estufa (Colombo-PR) entre os meses de junho/2014 a maio/2015....	43
FIGURA 2 -	Porcentagem de enraizamento em miniestacas de erva-mate coletadas nas quatro estações do ano (2014-2015).....	46
FIGURA 3 -	Porcentagem de enraizamento de miniestacas de erva-mate submetidas a diferentes concentrações de IBA.....	47
FIGURA 4 -	Número de raízes por miniestaca de erva-mate submetidas a diferentes concentrações de IBA e estações do ano (2014-2015) .....	48
FIGURA 5 -	Comprimento das três maiores raízes em miniestacas de erva-mate submetidas a diferentes concentrações de IBA e estações do ano (2014-2015).....	49
FIGURA 6 -	Porcentagem de calogênese em miniestacas de erva-mate submetidas a diferentes concentrações de IBA e estações do ano (2014-2015).....	50
FIGURA 7 -	Porcentagem de retenção foliar em miniestacas de erva-mate coletadas em diferentes estações do ano (2014-2015)..	51
FIGURA 8 -	Porcentagem de mortalidade em miniestacas de erva-mate coletadas em quatro estações do ano (2014-2015).....	52
FIGURA 9 -	Porcentagem de mortalidade de miniestacas de erva-mate submetidas a diferentes concentrações de IBA.....	53
FIGURA 10 -	Valores médios mensais de temperatura em Colombo-PR e São Mateus do Sul-PR (março/2015 a fevereiro/2016).....	63
FIGURA 11 -	Variação decrescente do potencial rizogênico de clones de <i>Ilex paraguariensis</i> em função da época do ano (2015/2016). A. Porcentagem de enraizamento (E), B. Número de raízes/miniestaca (NR) C. Comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca (CMR).....	68
FIGURA 12 -	A. Teor de açúcares totais (AT), B. Proteínas totais (PT), C. Ácido indol acético em miniestacas de <i>Ilex paraguariensis</i> em função da função da época do ano (2015/2016) e do genótipo.....	69
FIGURA 13 -	Padrões de miniestacas utilizadas: miniestaca apical (M1) e basal (M2) .....	85
FIGURA 14 -	Compostos bioquímicos em dois padrões de miniestacas (M1 e M2) provenientes de quatro clones de <i>Ilex paraguariensis</i> no momento da instalação do experimento (T <sub>0</sub> ) e após 90 dias (T <sub>90</sub> ). A. Atividade da enzima peroxidase (POD); B. Atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), C. Teor de compostos fenólicos (CF).....	93

FIGURA 15 - Seções transversais da base caulinar de miniestacas de erva-mate. A. Visão geral em T <sub>0</sub> ; B. Detalhe dos grãos de amido e drusa. Reação positiva da cutícula ao teste com Sudam III.....	96
FIGURA 16 - Base caulinar e seções transversais de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	98
FIGURA 17 - A. Minijardim clonal de erva-mate em sistema semi-hidropônico; B. Miniestaca; C. Aquisição espectral utilizando equipamento portátil NIR na superfície adaxial das folhas.....	112
FIGURA 18 - Espectro de refletância NIR de folhas de dez clones de erva-mate coletadas em três estações do ano. As regiões em destaque correspondem as moléculas químicas relacionadas com o enraizamento.....	115
FIGURA 19 - Coeficiente de regressão obtido em um modelo PLS para estimar o enraizamento de miniestacas de erva mate utilizando espectro de refletância NIR.....	116
FIGURA 20 - Dados de enraizamento mensurado x predito pelo modelo de mínimos quadrados parciais (PLS) para miniestacas de erva-mate.....	117

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de enraizamento (E), número de raízes (NR), comprimento médio das três maiores raízes (CMR), porcentagem de retenção foliar (RF), brotações desenvolvidas (BD), mortalidade (M) e sobrevivência (S) em miniestacas de erva-mate coletadas nas quatro estações do ano e submetidas a diferentes concentrações de IBA.....	45
TABELA 2 - Características do material vegetal utilizado para o estabelecimento do minijardim clonal.....	62
TABELA 3 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de enraizamento (E), número de raízes (NR), comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca (CMR), teor de açúcares totais (AT), proteínas totais (PT) e ácido indol acético (IAA) de clones de erva-mate em função da época do ano (2015/2016)..	67
TABELA 4 - Resumo da matriz de correlação de Pearson entre a porcentagem de enraizamento (E), número de raízes/miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca (CMR), teor de açúcares totais (AT), ácido indol acético (IAA) e proteínas totais (PT) de miniestacas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	70
TABELA 5 - Resultados das análises de variância para a porcentagem de enraizamento (E), número de raízes/miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca (CMR), número de brotações desenvolvidas (NBD), porcentagem de retenção foliar (RF), calogênese (C), mortalidade (M) e sobrevivência (S) em dois padrões de miniestacas provenientes de quatro clones de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	91
TABELA 6 - Porcentagem de enraizamento (E), número de raízes/miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca em cm (CMR), Número de brotações desenvolvidas (NBD), porcentagem de retenção foliar (RF), calogênese (C), mortalidade (M) e sobrevivência (S) em dois padrões de miniestacas provenientes de quatro clones de <i>Ilex paraguariensis</i> *.....	91
TABELA 7 - Resultado da análise de variância para a atividade da enzima peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e teor de compostos fenólicos (CF) em dois padrões de miniestacas provenientes de quatro clones de <i>Ilex paraguariensis</i> no momento da instalação do experimento (T <sub>0</sub> ) e após 90 dias	

	(T <sub>90</sub> ).....	93
TABELA 8 -	Resumo da matriz de correlação de Person entre a porcentagem de enraizamento (E), número de raízes/miniéstaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes/miniéstaca (CMR), atividade da enzima peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e teor de compostos fenólicos em miniéstacas de <i>Ilex paraguariensis</i> no momento da instalação do experimento (T <sub>0</sub> ) e após 90 dias (T <sub>90</sub> ).....	94
TABELA 9	Porcentagem média de enraizamento de miniéstacas coletadas em três estações do ano provenientes de dez clones de erva-mate.....	114
TABELA 10	Resultado da análise estatística dos grupos de calibração e predição para os índices de enraizamento em miniéstacas de erva-mate.....	116

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1	HISTÓRICO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIALIDADES DA ERVA-MATE.....	17
2.2	FORMAS DE PROPAGAÇÃO.....	20
2.2.1	Propagação seminal.....	20
2.2.2	Propagação vegetativa via estaquia.....	21
2.2.3	Propagação vegetativa via miniestaquia.....	23
2.3	FATORES QUE AFETAM O ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO.....	25
2.3.1	Balanço hormonal.....	25
2.3.2	Maturação/Juvenilidade.....	28
2.3.3	Época do ano.....	30
2.3.4	Anatomia.....	31
2.3.5	Compostos bioquímicos.....	33
2.4	NIR ( <i>NEAR INFRARED SPECTROSCOPY</i> – ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO PRÓXIMO).....	36
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I. MINIESTAQUIA DE ERVA-MATE EM QUATRO ESTAÇÕES DO ANO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA</b> .....	39
3.1	INTRODUÇÃO.....	41
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.4	CONCLUSÕES.....	53
3.5	REFERÊNCIAS.....	54
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II. MINIESTAQUIA DE <i>Ilex paraguariensis</i>: EFEITO DA SAZONALIDADE, GENÓTIPO, TEOR HORMONAL E BIOQUÍMICO</b> .....	58
4.1	INTRODUÇÃO.....	60
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.2.1	Miniestaquia.....	62
4.2.2	Composição bioquímica.....	64
4.2.2.1	Preparo das amostras.....	64

4.2.2.2	Análise hormonal.....	64
4.2.2.3	Quantificação de proteínas totais (PT).....	65
4.2.2.4	Quantificação dos açúcares totais (AT).....	66
4.2.3	Delineamento e análise estatística.....	66
4.3	RESULTADOS.....	67
4.4	DISCUSSÃO.....	70
4.5	CONCLUSÕES.....	74
4.6	REFERÊNCIAS.....	75
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III. <i>Ilex paraguariensis</i>: PADRÕES DE MINIESTACAS x DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS E ANATÔMICAS.....</b>	<b>81</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	83
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
5.2.1	Origem e manutenção do minijardim clonal.....	84
5.2.2	Coleta das brotações e confecção dos propágulos.....	85
5.2.3	Miniestaquia.....	86
5.2.4	Análises bioquímicas.....	86
5.2.4.1	Condições de transporte e armazenamento.....	86
5.2.4.2	Determinação dos compostos fenólicos (CF) .....	86
5.2.4.3	Determinação de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO).....	87
5.2.5	Delineamento experimental e análise estatística.....	88
5.2.6	Análises anatômicas.....	89
5.3	RESULTADOS.....	90
5.3.1	Miniestaquia.....	90
5.3.2	Análises bioquímicas.....	92
5.3.3	Correlação entre os fatores analisados.....	94
5.3.4	Análises Anatômicas .....	94
5.4	DISCUSSÃO.....	99
5.5	CONCLUSÕES.....	102
5.6	REFERÊNCIAS.....	104
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO IV. PRIMEIRO MÉTODO PARA ESTIMAR O ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE ERVA MATE VIA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR).....</b>	<b>108</b>
6.1	INTRODUÇÃO.....	110

6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	111
6.2.1	Material vegetal.....	111
6.2.2	Miniestaquia de erva-mate.....	112
6.2.3	Aquisição espectral.....	113
6.2.3.1	Calibração, validação e seleção do modelo.....	113
6.3	RESULTADOS.....	114
6.4	DISCUSSÃO.....	117
6.5	CONCLUSÃO.....	120
6.6	REFERÊNCIAS.....	121
7	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	126
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES FUTURAS.....</b>	127
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	129

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), arbórea endêmica da América do sul, é amplamente consumida como bebida estimulante, principalmente no sul do Brasil, Paraguai e Argentina (BRANCO et al., 2013). Porém, a espécie vem apresentando notoriedade no mercado internacional, em virtude dos inúmeros constituintes químicos que lhe conferem propriedades medicinais (antioxidantes, diuréticas, estimulantes, hepatoprotetoras, dentre outras) (MAZUR et al., 2014a), além do potencial uso na indústria cosmética, farmacológica e alimentícia.

A principal forma de estabelecimento de ervais no Brasil ocorre a partir de mudas propagadas via seminal, sem critérios de seleção de matrizes, resultando em plantios desuniformes, com baixa produtividade e qualidade, refletindo em um produto final com baixo valor agregado e de difícil comercialização (SANTIN et al., 2015). De acordo com esses autores, ervais estabelecidos com mudas propagadas por sementes, são menos produtivas e apresentam maior quantidade de galhos grossos, em relação as mudas propagadas via miniestaquia.

Aliado a isso, a reprodução sexuada da erva-mate apresenta limitações, em virtude da dormência embrionária e tegumentar das sementes (FOWLER; STURION; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007), restringindo e retardando o período de produção de mudas. Diante dos entraves acerca da propagação seminal da erva-mate, técnicas de propagação vegetativa podem ser uma alternativa viável.

A propagação vegetativa é uma modalidade da reprodução assexuada que permite a multiplicação de indivíduos geneticamente idênticos, garante a manutenção das características da planta-matriz selecionada, refletindo em plantios uniformes com elevada produtividade (ALFENAS, 2004).

A miniestaquia é uma das técnicas de clonagem que possibilita o aproveitamento do potencial juvenil dos propágulos e, a multiplicação de espécies que apresentam alguma dificuldade de enraizamento e/ou limitações quanto a propagação seminal (FERRIANI et al., 2010). Esta técnica é uma das mais utilizadas na propagação de espécies florestais em escala comercial, principalmente do gênero *Eucalyptus* (OLIVEIRA et al., 2015). Dentre as vantagens da miniestaquia, em relação a estaquia convencional, destacam-se o melhor controle nutricional, hídrico e fitossanitário das plantas matrizes; redução dos custos com transporte e coleta das

brotações e, redução da área necessária para a formação do minijardim (ALFENAS et al.; 2009; XAVIER et al.; 2009).

A formação de um sistema radicial é umas das principais etapas da propagação vegetativa. Esse processo é complexo pois é influenciado por inúmeros fatores endógenos como balanço hormonal, teor de compostos bioquímicos, nível de cofatores e de inibidores da rizogênese; fatores exógenos como condições ambientais as quais as plantas-matrizes e os propágulos estão submetidos; além de atributos relacionados à planta fornecedora de propágulos como idade, características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas.

Uma das problemáticas inerentes à propagação vegetativa é o tempo necessário para indução de raízes adventícias, sendo que para erva-mate faz-se necessário de 60 a 90 dias para o desenvolvimento do sistema radicial, além da incerteza de um resultado satisfatório. Devido à grande demanda de tempo e insumos (substratos, mão de obra, espaço físico) para obtenção de um material vegetal enraizado e vigoroso, faz-se necessária a criação de alternativas que visem agilizar e facilitar a predição de genótipos superiores com maior potencial ao enraizamento. Uma alternativa é a utilização da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), técnica de natureza não destrutiva, que possibilita a rápida análise de um grande número de amostras com a mínima manipulação das mesmas (KOIZIMI et al., 2011; MUÑIZ et al, 2012).

Sendo assim, o presente trabalho foi desenvolvido objetivando: **i)** recomendar a melhor época de coleta dos propágulos e, verificar a necessidade ou não do uso de reguladores vegetais, por meio da avaliação do enraizamento de miniestacas coletadas em quatro estações do ano e submetidas a diferentes concentrações de ácido indol butírico; **ii)** verificar a influência dos fatores sazonalidade x genótipo no enraizamento de miniestacas de erva-mate e, analisar os níveis endógenos de ácido indol acético, açúcares e proteínas totais destes propágulos; **iii)** otimizar o protocolo de miniestaquia identificando possíveis variações no comportamento rizogênico entre genótipos e tipos de propágulos vegetativos, por meio da avaliação do enraizamento de miniestacas apicais e basais provenientes de quatro genótipos de erva-mate, relacionando com os níveis das enzimas peroxidases, polifenoloxidase e compostos

fenólicos, bem como caracterizando anatomicamente a rizogênese; **iv**) desenvolver um modelo matemático via espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para predição de genótipos mais responsivos ao enraizamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIALIDADES DA ERVA-MATE

A erva mate é uma espécie arbórea, nativa da América do Sul com ocorrência no Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo), Argentina (Corrientes, Misiones), Paraguai (Alto Paraná, Amambay, Caaguazu, Canindeyú, Central, Guairá, Itapua, Misiones, San Pedro) e Uruguai (FERLA; MARCHETTI; SIEBERT, 2005; HECK; MEJIA, 2007) de forma natural ou cultivada (FERLA; MARCHETTI; SIEBERT, 2005).

A erva-mate é nativa da Floresta ombrófila mista (FERLA; MARCHETTI; SIEBERT, 2005), onde cresce espontaneamente em regiões constituídas por matas de *Araucaria angustifolia* (pinheiro do Paraná) (OLIVEIRA; ROTTA, 1983).

A espécie foi descrita pela primeira vez em 1820 pelo botânico francês August de Saint Hilaire baseada em exemplares coletados no Paraná (PASINATO, 2003; SANTOS, 2017). Amostras de plantas foram enviadas ao Museu de História Natural de Paris, onde ocorreu a troca das etiquetas de identificação e a erva brasileira foi considerada idêntica à do Paraguai, sendo denominada *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil (Anuário brasileiro da erva mate, 1999 citado por PASINATO, 2003). Posteriormente o naturalista reconheceu que seria mais adequado tê-la chamado de *Ilex brasiliensis* (SANTOS, 2017).

Há séculos a espécie tem sido consumida mascada ou em infusão, como remédio e bebida estimulante, por habitantes nativos (tribos indígenas) que tomavam a bebida a partir das folhas fragmentadas da erva-mate em uma cuia (porongo cortado) e com o auxílio de um canudo de taquara (BRACESCO et al., 2011).

No início da colonização do Brasil, os jesuítas tentaram proibir o consumo da erva-mate, sob alegação de supostas propriedades afrodisíacas e alucinógenas,

denominando-a como erva do diabo (LINHARES, 1969 citado por PASINATO, 2003). Porém, o uso da bebida se generalizou entre os colonizadores europeus (PASINATO, 2003). Diante da possibilidade de lucro com a comercialização da erva mate, os jesuítas superaram o suposto lado negativo do pecado, liberaram o uso e promoveram seu cultivo (LINHARES, 1969 citado por PASINATO, 2003).

Com a expansão da fronteira agrícola na década de 70, extensas áreas de erva-mate no sul do Brasil foram substituídas pelas culturas de soja e trigo (FERLA; MARCHETTI; SIEBERT, 2005). Porém, com a demanda por matéria-prima pela indústria ervateira, foi necessário o estabelecimento de reflorestamentos para abastecer o mercado.

Para alguns autores, o cultivo da espécie em remanescentes florestais nativos é benéfico, pois além de ser uma alternativa de renda para o produtor rural, também contribui com a preservação da vegetação nativa (SIGNOR, 2013). No entanto, estudos indicam que as práticas realizadas no Sistema Faxinal causam a descaracterização e degradação da vegetação natural, em grande parte devido a extração seletiva de espécies com maior valor econômico, não sendo observada a regularidade e a frequência de tais espécies na área (WATZLAWICK et al., 2011).

Considerada como espécie florestal não madeirável, a erva-mate apresenta importância socioeconômica, ambiental e cultural no Brasil e países limítrofes. O seu cultivo constitui-se como uma alternativa para o fortalecimento da agricultura familiar, tanto na forma de povoamentos puros quanto em consórcio com espécies agrícolas (milho, feijão, soja, arroz) e/ou florestais (*Pinus*, *bracatinga*), contribuindo com a fixação do homem na zona rural, geração de emprego e aumento da renda dos produtores rurais (PES et al., 1995; RODIGHERI, 1997; LOURENÇO et al., 1997). Além disso, o cultivo da erva-mate traz benefícios ambientais, pelo fato de ser uma cultura permanente, reduz o risco de erosão e poluição das águas, favorecendo com a conservação dos solos.

A família Aquifoliaceae, a qual pertence a erva-mate, apresenta três gêneros: *Prinos*, *Nemopanthus* e *Ilex* (THE PLANT LIST, 2013). *Ilex* é o maior gênero da família, compreendendo aproximadamente de 400 a 500 espécies distribuídas principalmente na América e Europa, mas também Oceania e África (GOTTLIEB; GIBERTI; POGGIO,

2005). A maioria das espécies deste gênero são lenhosas, perenes e decíduas, (MARTÍNEZ; PELOTTO; BASUALDO, 1997) e apresentam interesse agrônomo ou ornamental (GOTTLIEB; GIBERTI; POGGIO, 2005). Porém, a espécie *Ilex paraguariensis* é a que apresenta maior notoriedade em virtude da sua importância econômica.

A erva-mate é uma espécie perenifólia, que possui copa densa, fuste curto, folhas verde escuras, duras e oblongas (LORENZI, 2002), altura variável entre 12 a 30 m e expectativa de vida superior à 100 anos (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000). Planta dioica com flores brancas e pequenas dispostas em cacho fusiforme (BACKES; IRGANG, 2002; SOUZA et al., 2015b). O florescimento da planta ocorre de setembro a novembro no Paraná, de setembro a dezembro em Santa Catarina e de setembro a outubro no Rio Grande do Sul, enquanto a frutificação é de dezembro a abril (CARVALHO, 1994). A espécie suporta grande amplitude térmica (de -6 a 22° C) e necessita de um regime de precipitação bem distribuído ao longo do ano e, em quantidade não inferior a 1200 mm (HECK; DE MEJIA, 2007).

De acordo com os últimos dados disponibilizados pelo IBGE (2016), a produção brasileira de erva-mate (folha verde) atingiu cerca de 616.213 toneladas, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 48,2% dessa produção, seguido do Paraná (37,0%), Santa Catarina (14,5%) e Mato Grosso do Sul (0,3%) (ano base 2016). Aproximadamente 80% da produção brasileira é destinada ao consumo interno (REICHERT et al., 2013). Contudo, o consumo da erva-mate tem se expandido em diferentes países (Espanha, Itália, Austrália, França, Japão, Coreia, Rússia, América do Norte) devido ao sabor, propriedades estimulantes e medicinais (MEJÍA et al., 2010; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016).

O consumo da erva-mate vem aumentando mundialmente em virtude dos inúmeros benefícios à saúde (SOUZA et al., 2015a), atribuídos à presença de compostos bioativos como por exemplo:

- Flavonóides: quercitina, rutina, ácido gálico, catequina, epigallocatequina galato (CHANDRA; DE MEJIA, 2004; LIMA et al., 2014);
- Metilxantinas: cafeína e teobromina (BOAVENTURA et al., 2013);
- Compostos fenólicos: ácido clorogênico e cafeico (LIMA et al., 2014).

Tais compostos oferecem propriedades anti-inflamatórias (LIMA et al., 2014), antioxidantes (BOAVENTURA et al., 2013), neuroprotetivas, diuréticas (BRANCO et al., 2013), hepatoprotetivas, (TAMURA et al., 2013), antiobesidade (LIMA et al., 2014), anticelulite (HEXSEL; ORLANDI; PRADO, 2005; MARCHEI et al., 2013), além de serem capazes de reduzir os riscos de doenças cardiovasculares (CARDOZO JUNIOR et al., 2016).

Além do tradicional chimarrão, tererê e chá, a erva-mate também tem sido utilizada na fabricação de cerveja (ARAUJO, 2008) e bebidas gaseificadas (MELLO et al., 2009). No Japão, foi lançado Coca Cola<sup>®</sup>, e na Argentina, a Nativa<sup>®</sup>, ambas com extrato de folhas de erva-mate em sua composição (VIERA, 2009).

A espécie também vem ganhando espaço no mercado dos alimentos funcionais, com potencial uso na fabricação de doces (VIEIRA et al., 2008), gelatina (BERTÉ et al., 2011), pães (FACCIN et al., 2015), barra de cereal (CHIESA; SCHLABITX; SOUZA, 2012), iogurte (PRECI et al., 2011), queijo (FAION, 2010). E, também vem sendo empregada na indústria cosmética, na produção de cremes, sabonetes, hidratantes, óleos corporais, shampoos e condicionadores (AKATU, 2017).

## **2.2 FORMAS DE PROPAGAÇÃO**

### **2.2.1 Propagação seminal**

A propagação via seminal da erva-mate é limitada por apresentar desuniforme (100 a 360 dias) e baixo percentual de germinação (5 a 20%), causada pela dormência embrionária e tegumentar (FOWLER; STURION; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007; STACHEVSKI et al., 2013).

A baixa qualidade fisiológica das sementes é um dos entraves da propagação sexuada da erva-mate. De acordo com Cuquel et al. (1994), os frutos desprendem-se da planta-mãe antes de estarem morfológicamente maduras. Grande parte dos embriões encontram-se no estágio torpedo (2,7%), pós-coração (23,6%), globular (2,6%) e, predominantemente no estágio coração (70,2%) (FOWLER; STURION; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007). Conforme esses autores, somente 0,9% dos frutos

apresentam embrião maduro. A imaturidade embrionária é causada, em parte, devido a existência de compostos, presentes no endosperma, endocarpo e/ou no próprio embrião, os quais interrompem temporariamente o desenvolvimento posterior dos embriões, paralisando-os no estágio coração (FOWLER; STURION; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007).

Além da dormência embrionária, também ocorre a dormência tegumentar (FOWLER; STURION, 2000). As sementes de erva-mate são duras e, conseqüentemente impermeáveis, dificultando a absorção de água e trocas gasosas (FOWLER; STURION; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007). Em condições naturais da floresta, a dormência tegumentar pode ser superada pela ação de fungos saprófitas que promovem a decomposição do tegumento, favorecendo a germinação (GRIGOLETTI JUNIOR et al. 1999; FOWLER; STURION; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007). Em condições artificiais, o processo de estratificação de sementes é um dos métodos mais indicados para induzir a germinação, promovendo a quebra da dormência tegumentar e, fornecendo as condições adequadas para que as sementes completem o processo de maturação (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994).

Além do elevado período necessário para a quebra da dormência das sementes (4 a 6 meses), a produção de mudas via seminal apresenta grande variação genotípica, acarretando o estabelecimento de plantios desuniformes, refletindo negativamente na qualidade e produtividade do produto final (STURION, 1988; WENDLING et al., 2009; DIAS et al., 2012).

Sendo assim, diante dos entraves relacionados à propagação e a produção de mudas via seminal, a propagação vegetativa apresenta-se como um método alternativo para tais limitações.

### 2.2.2 Propagação vegetativa via estaquia

A técnica da estaquia consiste na produção de mudas a partir de qualquer segmento destacável da planta matriz (raiz, caule, folha, gema) que, em condição favorável, induz a formação de raízes adventícias (FACHINELO et al., 2005). Esse processo somente é possível em virtude da totipotencialidade das células vegetais, as

quais possuem toda informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (KERBAUY, 2004).

A propagação vegetativa permite o estabelecimento de plantios provenientes de genótipos superiores, com características genéticas idênticas à planta matriz (clone), possibilitando a homogeneidade da produção e, dependendo do propágulo utilizado, permite a antecipação do florescimento (HARTMANN et al., 2011). Além disso, garante a qualidade, quantidade e uniformidade dos produtos e subprodutos oriundos destes plantios, contribuindo com a padronização da matéria prima e a qualidade do produto final (BACCARIN et al., 2015), propriedades desejáveis, principalmente em espécies com potencial uso medicinal, como é o caso da erva-mate.

Uma das etapas fundamentais na propagação vegetativa é a formação do sistema adventício de raízes (COSTA et al., 2013). Esse processo consiste na formação de raízes a partir tecidos/órgãos que não são provenientes da radícula embrionária (CASSON; LINDSEY, 2003), ou seja, a raiz adventícia é induzida em local diferente do curso usual de formação das raízes embrionárias (XAVIER et al., 2009).

A estaquia apresenta certas limitações quanto ao enraizamento em plantas com elevada maturação (WENDLING; DUTRA, 2010), falta de métodos eficientes de rejuvenescimento de material adulto e técnicas de manejo do ambiente de propagação (WENDLING et al., 2007).

Alguns estudos relatam a respeito do enraizamento adventício de estacas de erva-mate. Iritani et al. (1986) verificaram o efeito positivo do uso de reguladores vegetais sobre o enraizamento das estacas. Estes autores analisaram o efeito de diferentes tipos de auxinas (ácido indol acético-IAA e ácido indol butírico-IBA) e épocas de coleta (inverno e verão) e, verificaram que a coleta realizada no verão e a aplicação de 3000 mg.L<sup>-1</sup> de IBA proporcionaram o maior enraizamento (cerca de 75%) em relação à testemunha e ao tratamento com IAA na mesma concentração (2,01 e 33% de enraizamento, respectivamente). Contudo Fabiane et al. (2010) verificaram que concentrações inferiores a 2000 mg L<sup>-1</sup> de IBA, não promoveram a formação de raízes em estacas de erva-mate, observando 100% de mortalidade dos propágulos vegetativos.

Bitencourt et al. (2009) avaliaram o enraizamento de erva-mate a partir de estacas provenientes de brotações rejuvenescidas, e verificaram que estacas provenientes de rebrota foram superiores ao de estacas oriundas de brotações do ano, com enraizamento de 65,5 e 8,5%, respectivamente. Stuepp et al. (2017) analisaram a influência da idade das plantas matrizes no enraizamento de estacas caulinares, e verificaram que aquelas coletadas de matrizes de 12 anos possuem maior aptidão à emissão de raízes, em relação às oriundas de matrizes de 80 anos.

O sucesso da propagação via estaquia é variável pois depende das características intrínsecas ao tipo de propágulo utilizado, bem como da influência de fatores ambientais e/ou aplicação de reguladores vegetais (COSTA et al., 2013; ZHANG et al., 2017).

### 2.2.3 Propagação vegetativa via miniestaquia

A miniestaquia é uma técnica de propagação vegetativa cujo princípio é o aproveitamento do potencial juvenil dos propágulos para indução do enraizamento, podendo ser considerada uma especialização da estaquia convencional (FERRIANI; ZUFFELLATO-RIBAS; WENDLING, 2010).

O desenvolvimento da técnica teve início na década de 1990 com o gênero *Eucalyptus* (HIGASHI; SILVEIRA, 2000), e consiste na utilização de brotações de plantas matrizes, denominadas minicepas, propagadas pelo processo de estaquia ou via seminal, das quais efetua-se constantemente a poda dos ápices (quebra da dominância apical), a fim de estimular a emissão de brotações que são coletadas, estaqueadas e mantidas em casa de vegetação, dando origem a novas mudas (WENDLING; DUTRA, 2008). O conjunto das minicepas denomina-se minijardim clonal (WENDLING, 1999).

O período de permanência das miniestacas na casa de vegetação depende da espécie, época de coleta e estado nutricional dos propágulos. No caso da erva-mate, este período varia de 60 (BRONDANI et al., 2007) a 90 dias (BITENCOURT et al., 2009). Após a formação do sistema radicial, as mudas são transferidas para aclimação em casa de sombra e, posteriormente, para rustificação, a pleno sol. O

período de aclimação e de rustificação da erva-mate é de 30 dias em cada ambiente (BRONDANI et al., 2007).

A propagação via miniestaquia pode representar uma alternativa promissora para espécies lenhosas que possuem dificuldade de enraizamento do material adulto e/ou cujas sementes representam fator limitante (FERRIANI et al., 2010).

O estabelecimento de minijardins apresenta vantagens em relação à estaquia convencional, como melhor controle nutricional e fitossanitário, maior produção por área em menor tempo, redução da área produtiva (adoção do minijardim clonal), redução dos custos com transporte e coleta das brotações, maior eficiência das atividades de manejo (controle da irrigação e nutrição das minicepas) (ASSIS, 1997; ALFENAS et al., 2004; MAFIA et al., 2005; BRONDANI et al., 2010a; DIAS et al., 2012). Como desvantagens tem-se a necessidade de maior rapidez entre a coleta dos propágulos no minijardim clonal e o plantio na casa de vegetação, maior sensibilidade das miniestacas às condições ambientais, estreitamento da base genética dos plantios clonais quando utilizado restrito número de clones (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003; WENDLING; SANTIN, 2015).

O minijardim pode ser implantado em sistema de recipientes (vasos, tubetes, sacos plásticos, caixas de fibra de vidro) ou sistema de canaletões de amianto ou concreto com leito de areia e fertirrigação por gotejamento, sendo esses últimos os mais utilizados por grandes empresas florestais (MAFIA et al., 2005; BRONDANI et al., 2010).

Os estudos com miniestaquia de erva-mate estão relacionados com a análise da sobrevivência, produtividade (SANTIN et al., 2015), uso de substratos renováveis (KRATZ et al., 2015), adequação do ambiente de enraizamento (BRONDANI et al., 2007; BRONDANI et al., 2008a), bem como da viabilidade técnica do sistema semi-hidropônico (WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2007). Na literatura científica são inexistentes informações a respeito da melhor época de coleta das miniestacas, recomendação ou não do uso de reguladores vegetais, além da possível influência da altura do ramo para coleta dos propágulos (porção apical, intermediária e basal) no enraizamento adventício destas miniestacas.

## 2.3 FATORES QUE AFETAM O ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO

### 2.3.1 Balanço hormonal

Os hormônios vegetais são compostos não nutrientes, sintetizados pela planta, que em baixas concentrações ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  M) promovem, inibem ou modificam diversos processos fisiológicos e morfológicos (SANTNER; ESTELLE, 2009; VIEIRA et al., 2010). Os hormônios podem desencadear inúmeras respostas fisiológicas no local de síntese ou serem transportados para outros tecidos, onde podem exercer sua resposta de acordo com sua concentração, estrutura química, sensibilidade e capacidade de resposta das células do tecido alvo (SAIRANEN et al., 2012; RAVEN; EICHHOM; EVERT, 2014). Além disso, os hormônios vegetais desempenham papéis complexos, exercendo efeitos diretos (atuando sobre a divisão celular ou crescimento celular) ou indiretos (interagindo com outras moléculas ou hormônios) (Li et al., 2009).

As auxinas foram o primeiro grupo a ser descoberto e identificado como hormônio vegetal (WENT, 1935), sendo amplamente estudadas e utilizadas nos protocolos de propagação de plantas. As auxinas naturais identificadas são: o ácido indol acético (IAA), ácido indol butírico (IBA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) e ácido fenilacético (PAA) (PORFÍRIO et al., 2016a). Porém, o IAA é a auxina de ocorrência natural mais importante, sendo considerado como hormônio do crescimento, por regular a dominância apical, a expansão, divisão e diferenciação celular e, atuar no desenvolvimento de frutos e de raízes adventícias (SAIRANEN et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013; STEFFENS; RASMUSSEN, 2016).

O IAA é sintetizado nas partes das plantas com crescimento ativo como meristema apical, gemas axilares e folhas jovens (POP; PAMFIL; BELLINI, 2011) e transportado através do floema, para a base das estacas, onde se concentram e, em conjunto com outras substâncias nutritivas, são responsáveis pela formação das raízes (HARTMANN et al., 2011). As auxinas promovem a formação de raízes adventícias ao induzirem a desdiferenciação das células do periciclo e parênquima que em seguida iniciam a divisão celular (LI et al., 2009).

Os níveis das auxinas endógenas podem ser irreversivelmente reduzidos por

meio da degradação oxidativa ou, reversivelmente por conjugação com açúcares, aminoácidos, peptídeos ou proteínas (LUDWIG-MÜLLER, 2011; PORFÍRIO et al, 2016b).

Para algumas espécies, a obtenção de mudas via propagação vegetativa torna-se um processo impraticável devido à concentração insuficiente de auxina endógena, problema que pode ser solucionado com o emprego de reguladores vegetais (PIMENTA et al., 2005). O uso de reguladores vegetais tende a aumentar a porcentagem de enraizamento, o número e qualidade das raízes formadas, além de uniformizar e agilizar o processo de formação do sistema radicial, viabilizando a produção de mudas (FACHINELLO et al., 2005).

A suplementação exógena de auxina acelera a divisão celular do câmbio, afeta a concentração endógena de citocinina e ácido salicílico e, aumenta o acúmulo de açúcares no caule durante o estágio de enraizamento (AGULLÓ-ANTÓN et al., 2011; AGULLÓ-ANTÓN et al., 2014). De acordo com Zhang et al. (2017), a aplicação exógena de auxina acelera o catabolismo do hormônio inibidor da formação de raiz (ácido abscísico) e a síntese de hormônios endógenos (IAA, ácido giberélico, zeatina ribosídeo - citocinina), aumenta o metabolismo de carboidratos e proteínas solúveis e, conseqüentemente, desencadeia o processo de formação da raiz.

A auxina mais utilizada na propagação vegetativa e que tem apresentado resultados satisfatórios para maioria das espécies florestais e agrônômicas é o ácido indol butírico (IBA) (NASCIMENTO, 2008; DIAS, 2011), em função da menor mobilidade e maior estabilidade química, quando comparado ao ácido indol acético (IAA), além de ser menos fitotóxico, em comparação ao ácido naftaleno acético (NAA) (FACHINELLO et al., 2005; SARZI; PIVETTA, 2005). As concentrações de auxinas indicadas variam em função da espécie (HARTMANN et al., 2011), clone (BRONDANI et al., 2010), grau de maturação dos propágulos (ALCANTARA et al., 2007) e forma de aplicação (YAMOTO et al., 2010). Diversos estudos tentam definir a melhor concentração, formulação e duração de tratamento necessários para formação adequada de raízes adventícias (OSTERC; ŠTAMPAR, 2011).

A aplicação exógena de auxina tem proporcionado resultados positivos na rizogênese de miniestacas de pessegueiro (*Prunus persica*) (TIMM et al., 2015),

*Araucaria angustifolia* (Pires et al., 2013) e, principalmente, em espécies do gênero *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 2010). Da mesma forma, efeitos satisfatórios foram observados em estudos com erva-mate. Graça et al. (1988) verificaram que o enraizamento das estacas desta espécie foi estimulado pelo uso do IBA, sendo recomendada a concentração de 8000 ppm.

No entanto, Bitencourt et al. (2009) verificaram que a aplicação de IBA não influenciou a formação de raízes de estacas de erva-mate provenientes de ramos rejuvenescidos, indicando possível quantidade endógena de auxinas suficiente para promoção do sistema radicial. Stuepp et al., (2017) ao avaliarem o enraizamento de estacas provenientes de árvores de 12 e 18 anos submetidas a diferentes concentrações de IBA, verificaram que o enraizamento das estacas de árvores de 12 anos foi superior, em relação às estacas de árvores de 80 anos, sem a necessidade da aplicação de IBA.

Sendo assim, o efeito da aplicação de IBA sobre o enraizamento adventício depende da interação de vários fatores, como material genético, espécie, época do ano, nível hormonal endógeno, presença de cofatores, condição nutricional da planta matriz, grau de juvenildade, condições de manejo no ambiente de enraizamento e técnica de propagação vegetativa utilizada (BADILLA et al., 2016). Geralmente, as concentrações consideradas ótimas para a formação de raízes são muito particulares a cada situação (BRONDANI et al., 2010a).

São evidentes a atuação das auxinas na formação do sistema radicial (LI et al., 2009; COSTA et al., 2013; DRUEGE et al., 2014; ZHANG et al., 2017), porém ainda não há um consenso sobre o modo de ação e o provável efeito no enraizamento dos outros grupos hormonais.

O etileno é descrito como ativador do enraizamento (NEGI et al., 2010; LEWIS et al., 2011), por auxiliar na regulação do transporte de auxina (LEWIS et al., 2011) ou aumentar o número de células responsivas às auxinas (DE KLERK E HANECAKOVA, 2008). De acordo com Lewis et al. (2011) o etileno estimula o enraizamento adventício por favorecer o acúmulo das auxinas na zona de enraizamento e reduzir o transporte deste hormônio em outras partes do explante. O etileno atua positivamente na fase de expressão, porém apresenta efeito inibitório na fase da indução do enraizamento

(DE KLERK et al., 1999; DE KLERK, 2002; DRUEGE et al., 2014).

Já as citocininas também podem estimular os processos iniciais de indução do enraizamento adventício ao impulsionar o ciclo celular (DE KLERK, 2002), porém apresentam efeito inibitório nas fases posteriores à indução (COSTA et al., 2013; DRUEGE et al., 2014).

As giberelinas são consideradas como inibidoras do enraizamento adventício, efeito possivelmente associado às mudanças no transporte polar das auxinas (GOU et al., 2010; COSTA et al., 2013). Porém, de acordo com Costa et al., (2013) as giberelinas apresentam efeito inibitório na fase de indução da raiz e estimulante durante a formação.

As estrigolactonas também estão envolvidas com o enraizamento adventício, principalmente com ação inibidora (COSTA et al., 2013). A relação negativa entre as estrigolactonas e o enraizamento está associada a aparente inibição da divisão celular causada por este grupo hormonal, bem como possível interferência no movimento basípeto das auxinas (RASMUSSEN et al., 2012).

De acordo com Raven et al. (2014), os hormônios vegetais dificilmente atuam de modo isolado, onde as respostas são provenientes da interação entre hormônios e outros sinais.

### 2.3.2 Maturação/Juvenilidade

O processo de formação de raízes adventícias é afetado pela idade da planta doadora de propágulos (ZHANG et al, 2017). De modo geral, a capacidade rizogênica de propágulos vegetativos diminui com o aumento da maturidade da planta-matriz (HUSEN; PAL, 2006). O evento no qual a maturação fisiológica aumenta com a idade cronológica da planta é denominado ciclófise (OSTERC; ŠTAMPAR, 2011).

A capacidade de enraizamento de propágulos maduros (oriundos de material adulto) é menor em comparação com propágulos juvenis (provenientes de plantas jovens/mudas seminais) (KIBBLER; JOHNSTON; WILLIAMS, 2004; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014). Desta forma, a idade da planta afeta a qualidade fisiológica dos propágulos e, conseqüentemente, o enraizamento.

Diversos estudos relatam a associação entre a maturação/juvenildade do propágulo e o enraizamento. Em *Prunus subhirtella* (espécie arbustiva muito utilizada como ornamental) foi avaliado o enraizamento de propágulos maduros (oriundos de árvores de 40 anos) e propágulos juvenis (provenientes de plantas de três anos rejuvenescidas *in vitro*) (OSTERC; ŠTEFANČIČ; ŠTAMPAR, 2009). Estes autores concluíram que estacas juvenis apresentaram enraizamento adventício superior, bem como maior concentração de IAA e IAAasp (ácido indol acético aspártico) em relação às estacas maduras. Da mesma forma, propágulos juvenis (oriundos de mudas de três anos) de *Dalbergia melanoxylon* (espécie florestal madeireira) foram superiores aos propágulos maduros (oriundos de plantas de 15 anos) em todas as variáveis avaliadas (porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes) (AMRI et al., 2010).

Em geral, para espécies lenhosas, propágulos juvenis enraízam facilmente, pois os níveis de auxina endógena e de cofatores são satisfatórios para o processo de formação de raízes adventícias; enquanto outras, oriundas de plantas mais velhas, são menos responsivas ao enraizamento (DIAS et al., 2012).

De acordo com Higashi e Silveira (2000) o processo de maturação está relacionado à idade ontogenética da planta matriz, e este não ocorre na mesma velocidade em todas as partes da planta. Ressalta-se que propágulos oriundos de plantas cronologicamente adultas (maduras) pode atuar como propágulos juvenis, dependendo da porção da planta matriz em que foi coletado (OSTERC; ŠTEFANČIČ; ŠTAMPAR, 2009). As variações nas características dos propágulos dependendo da altura de coleta destes denomina-se topófise e, isto ocorre pois uma mesma planta pode conter áreas (e.g. porção apical) mais maduras do que outras (e.g. porção basal), (OSTERC; ŠTAMPAR, 2011). Ou seja, há um gradiente de juvenildade em direção à base da árvore, o que promove um aumento da maturação em função da maior proximidade com o meristema apical (WENDLING; XAVIER, 2001; WENDLING, TRUEMAN, XAVIER, 2014).

### 2.3.3 Época do ano

As variações das condições ambientais, principalmente, temperatura e fotoperíodo, influenciam as condições fisiológicas da planta matriz e, conseqüentemente, afetam as características dos propágulos e a capacidade de formação do sistema radicial. As variações de temperatura e fotoperíodo recorrentes ao longo do ano influenciam os níveis endógenos de auxina, teor de carboidratos, e outros componentes bioquímicos presentes nas plantas matrizes (COSTA et al., 2013).

A temperatura pode regular a emissão de raízes adventícias (BRONDANI et al., 2007) e, de acordo com Kibbler et al. (2004), as estações do ano que apresentam temperaturas mais elevadas muitas vezes coincidem com o aumento da atividade das brotações, florescimento e maiores taxas de crescimento.

A consistência dos propágulos vegetativos também é afetada pela época de coleta, os quais tendem a ser mais herbáceos quando coletados nos períodos de crescimento vegetativo intenso (em geral primavera/verão) e mais lenhosos quando coletados em períodos de repouso vegetativo (outono/inverno) (STUEPP et al., 2017). Da mesma forma, Pivetta et al. (2012) verificaram que as estacas de *Nerium oleander* coletadas no período de intenso crescimento vegetativo (verão) apresentavam-se mais herbáceas, em relação àquelas coletadas no inverno, facilitando a emissão das raízes.

Outro fator que deve ser considerado é a fenologia da planta matriz. Em épocas de floração e frutificação, grande parte dos metabólitos produzidos pela planta são deslocados para a produção de flores e frutos, tornando-se menos disponíveis em outros processos fisiológicos, tais como o enraizamento (HARTMANN et al., 2011). Sendo assim, em geral, sugere-se que a coleta dos propágulos seja realizada na fase vegetativa da planta matriz, onde as folhas estão com o máximo de sua expansão, sendo mais eficientes na utilização da luz e também no aporte de compostos necessários para o início da emissão de raízes (OLIVEIRA et al., 2003).

Contudo, a época mais adequada para a coleta do material vegetativo é altamente variável e depende da espécie analisada. Brondani et al. (2010b)

verificaram que as estações mais frias foram as mais favoráveis ao enraizamento de miniestacas do híbrido *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*. Da mesma forma que o outono foi a época mais favorável ao enraizamento de estacas de *Ilex paraguariensis*, seguido da primavera e verão (STUEPP et al., 2017). Porém, as épocas do ano mais quentes (primavera e verão) proporcionaram maior vigor radicial às miniestacas de *Araucaria angustifolia*, em comparação com as estações mais frias. Já *Pereskia aculeata*, espécie considerada de fácil enraizamento, apresentou altos índices de enraizamento (superior a 80%) independente da época de coleta (ZEM et al., 2015).

Para algumas espécies, a época de coleta das brotações não influencia o enraizamento, porém, outras espécies podem apresentar resultados satisfatórios de enraizamento quando a coleta ocorre em períodos específicos (ALCANTARA et al., 2008). Sendo assim, faz-se necessário identificar a melhor estação do ano para coleta dos propágulos para cada espécie/clone, visando maximizar os índices de enraizamento.

#### 2.3.4 Anatomia

A capacidade de desenvolvimento das raízes adventícias pode estar relacionada às características anatômicas existentes entre espécie/cultivar/clone e/ou tipo de propágulo utilizado. Wendling et al. (2015) avaliaram a capacidade de enraizamento de estacas de diferentes porções do ramo de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e, verificaram que estacas basais apresentavam maior grau de lignificação e menor enraizamento, em relação às estacas apicais.

Da mesma forma, Ballester et al. (1999) também relacionaram o enraizamento e os caracteres anatômicos dos propágulos. Estes autores verificaram diferenças na capacidade rizogênica entre propágulos juvenis e maduros de *Castanea sativa*, e tais diferenças estavam associadas, principalmente, ao desenvolvimento do floema e xilema secundários, os quais eram muito desenvolvidos em propágulos maduros em relação aos juvenis.

Husen e Pal (2006) verificaram características anatômicas marcantes entre

estacas de *Tectona grandis* oriundas de árvores de diferentes idades (2 meses, 15 e 30 anos) e, essas características (e.g. números, largura e comprimento dos elementos do vaso, e o comprimento e a largura dos elementos de fibra) podem ser utilizadas como indicador da idade e maturidade de *Tectona grandis*.

Sendo assim, o conhecimento e identificação das estruturas anatômicas podem contribuir para o melhor entendimento das variações da capacidade rizogênica entre propágulos e, auxiliar na escolha dos materiais vegetais mais adequados ao enraizamento. Além disso, possíveis insucessos da técnica da miniestaquia podem ser explicados pelo conhecimento da estrutura interna do caule, obtido por meio de análises morfoanatômicas.

Para algumas espécies, o enraizamento adventício pode ser inibido devido à existência de barreiras anatômicas que bloqueiam a emissão dos primórdios radiciais, como por exemplo, ocasionado pelo desenvolvimento de fibras e esclereídes no floema primário, os quais formam um anel contínuo na região cortical do caule (WHITE; LOVELL, 1984; ONO; RODRIGUES, 1996). Em contrapartida, outras espécies possuem elevada facilidade ao enraizamento, como é o caso de *Odontonema strictum*, planta ornamental que possui reduzido crescimento de tecidos mecânicos na região periférica do cilindro central, e apresenta na sua maioria, parede celular primária e não lignificada, características que proporcionam facilidade ao enraizamento das estacas caulinares (ZUFFELLATO-RIBAS et al., 2005).

Em estudos com *Tibouchina sellowiana* também não foi encontrada nenhuma barreira anatômica que pudesse prejudicar seu enraizamento (BORTOLINI et al. 2008). No entanto, o lento ou difícil enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* pode estar relacionado à presença de um anel esclerenquimático quase contínuo no córtex caulinar, composto de fibras pericíclicas e esclereídes, o qual constitui barreira mecânica à emissão radicial (LIMA et al., 2011). Em *Ilex paraguariensis*, são inexistentes informações a respeito da anatomia caulinar, sendo que os trabalhos científicos atuais se restringem à análise foliar.

### 2.3.5 Compostos bioquímicos

Compostos bioquímicos endógenos (e. g. carboidratos, proteínas, compostos fenólicos, peroxidases, polifenoloxidase) também podem influenciar a capacidade de formação de raízes adventícias (HUSEN; PAL, 2007; Li et al., 2009; COSTA et al., 2013; ZHANG et al., 2017).

Durante a formação de raízes adventícias ocorre a diferenciação celular, processo que envolve a divisão celular e o aumento do número de células e, este evento, requer energia e moléculas de carbono (AHKAMI et al., 2009). De acordo com esses autores, uma importante fonte de carbono é a sacarose, formada em tecidos fotosinteticamente ativos (fonte) (e.g. folha) e translocada para as partes da planta no qual o recurso é consumido (dreno) (e.g. raiz). Nos tecidos dreno, a sacarose é convertida em glicose e frutose ou UDP-glicose e frutose e, então fosforilada por frutoquinase e hexoquinase (PEGO; SMEEKENS 2000; WILLIAMS et al. 2000). A sacarose pode ser utilizada diretamente como recurso energético ou ser convertida em compostos de armazenamento como o amido (AHKAMI et al., 2009).

Diversos estudos relacionam direta ou indiretamente o teor de carboidratos com a capacidade de formação de raízes adventícias (DRUEGE et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2003; CORRÊA et al., 2005; GIBSON, 2005; HUSEN; PAL, 2007; AHKAMI et al., 2009; SAIRANEN et al., 2012; LJUNG; NEMHAUSER; PERATA, 2015; SAMI et al., 2016). A relação entre o teor de carboidrato e o enraizamento, possivelmente está associada ao fato de que os carboidratos são fonte de carbono e de energia para a biossíntese de ácidos nucléicos e proteínas e de outras substâncias essenciais à formação de raízes (LIMA et al., 2011). Os carboidratos atuam na expressão gênica (COSTA et al., 2013), como componente estrutural celular (TAKAHASHI et al., 2003) e como molécula de sinalização, desencadeando inúmeras respostas fisiológicas (ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006).

Alguns estudos relatam a relação entre a presença de proteínas e o enraizamento. Em *Dalbergia sissoo*, espécie madeireira, verificou-se que as proteínas são necessárias para divisão e diferenciação celular durante a iniciação e desenvolvimento do primórdio radicial (HUSEN, 2008). Bortolini et al. (2008)

verificaram a variação na concentração de proteína em diferentes épocas do ano durante o enraizamento de estacas caulinares de *Tibouchina sellowiana*, e constataram que as maiores concentrações de proteínas ocorreram nas estações do ano que proporcionaram as menores taxas de enraizamento (outono e inverno), evento possivelmente relacionado às condições estruturais do material vegetativo.

De modo geral, as proteínas são compostos bioquímicos envolvidos com o enraizamento, atuando na divisão e diferenciação celular (HUSEN, 2008), na regulação da biossíntese das auxinas e em outros processos fisiológicos, principalmente com função enzimática (SAIRANEN et al., 2012).

O enraizamento ocorre em três fases sucessivas e interdependentes: indução, iniciação/formação e expressão (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). Cada fase envolve uma série de alterações metabólicas que estão associadas com variações na concentração do ácido indol acético (IAA) e na atividade da peroxidase (POD) (VATULESCU et al., 2004), e a relação inversa entre estes dois compostos tem sido relatada (CHENIANY et al., 2010). Este fato é evidenciado pelo estudo das fases do enraizamento (GASPAR et al., 1992; SCHWAMBACH et al., 2008):

- Indução - fase caracterizada pela ausência de alterações morfológicas, baixa atividade POD e alto teor de auxina;
- Iniciação/formação radicial – fase na qual ocorrem as divisões celulares; possui intermediária atividade POD e redução nos níveis auxínicos;
- Expressão/elongação radicial - caracteriza-se pela emissão das raízes e gradual declínio na atividade POD.

Desta forma, o IAA é requerido, principalmente na fase da indução radicial, promovendo efeito inibitório nas outras fases do enraizamento (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). Sendo assim o IAA é degradado pela POD a fim de manter os níveis adequados deste hormônio em cada fase do enraizamento.

Plantas com maior capacidade rizogênica apresentam maior atividade POD (VATULESCU et al., 2004). Diversos estudos apontam para a fundamental importância das peroxidases na formação de raízes adventícias (HATZILAZAROU et al., 2006; SCHWAMBACH et al., 2008; MACEDO et al., 2013; PORFIRIO et al., 2016), sendo descritas como marcadores do enraizamento adventício (MACEDO et al.,

2013).

As polifenoloxidasas (PPO) são outros compostos bioquímicos envolvidos com o enraizamento adventício. Essas enzimas catalisam a oxidação de compostos fenólicos em quinonas e, a formação do complexo IAA-fenol, classificado como cofator do enraizamento (MACEDO et al., 2013). Além disso, agem na divisão, diferenciação e desenvolvimento do primórdio radicial (ÇOBAN, 2007) e podem atuar como IAA-oxidase (SHIOZAKI et al., 2013).

Compostos fenólicos, substâncias que possuem o grupamento hidroxila ligado a um anel aromático (ANGELO; JORGE, 2007), também estão envolvidos com o enraizamento adventício. Esses compostos podem afetar os níveis endógenos de IAA, inibindo ou estimulando o enraizamento (SCHWAMBACH et al., 2008; SHIOZAKI et al., 2013).

Existem alguns fatores que podem influenciar na ação endógena dos compostos fenólicos, como a da fase do enraizamento em que o propágulo vegetativo se encontra. Estudos indicam que o aumento no nível de fenóis totais ocorre na fase de indução e iniciação do primórdio radicial, com o decréscimo na fase de emergência. SCHWAMBACH et al., (2008) verificaram que durante a fase de formação das raízes, houve o aumento do teor dos compostos fenólicos, que pode ser em virtude da necessidade de redução do transporte auxínico durante esta etapa.

A estrutura química dos compostos fenólicos é variável, englobando moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (ANGELO; JORGE, 2007) e, de acordo com sua concentração e composição química, pode inibir ou estimular o enraizamento adventício (SHIOZAKI et al., 2013). O ácido cinâmico, por exemplo, estimula a oxidação do IAA (SHIOZAKI et al., 2013). Já os flavonóides atuam como inibidores do transporte basípeto de IAA (PEER; MURPHY, 2007).

Por outro lado, outros tipos de compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes, como o floroglucinol e ácido clorogênico, os quais previnem a degradação das auxinas pelas peroxidases, estimulando o enraizamento (SHIOZAKI et al., 2013). Orto-difenóis e seus derivados (e.g. catecol, ácido clorogênico e ferúlico) são potentes inibidores das peroxidases (LEE; STARRATT; JEVNIKAR, 1982).

A resposta rizogênica depende da concentração e composição química dos

compostos fenólicos (SHIOZAKI et al., 2013). Baixas concentrações de compostos fenólicos podem promover a formação de raízes adventícias, enquanto altas concentrações podem inibi-las (WILSON; STADEN, 1990 citado por SHIOZAKI et al., 2013). Curir et al. (1990) verificaram concentração inferior (0,2 – 0,5 mg.100 g<sup>-1</sup> de matéria fresca) de compostos fenólicos em propágulos de *Eucalyptus gunnii* que não emitiram raízes adventícias, em relação ao material que apresentaram 100% de enraizamento (8 mg.100 g<sup>-1</sup> de matéria fresca).

A presença de compostos bioquímicos (carboidratos, compostos fenólicos, peroxidases, polifenoloxidasas, entre outros) quando em concentrações adequadas, podem se acumular na zona de produção de raízes, contribuindo com a emissão das mesmas (LIMA et al., 2011; PORFÍRIO et al., 2016).

#### **2.4 NIR (NEAR INFRARED SPECTROSCOPY – ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO PRÓXIMO)**

A espectroscopia é todo e qualquer processo de investigação das propriedades da matéria por meio da sua interação com a radiação eletromagnética em uma frequência específica, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura físico-química da amostra (HARRIS; BERTOLUCCI, 1978 citados por KOIZIMI, 2011). A espectroscopia no infravermelho corresponde a uma faixa do espectro da radiação eletromagnética situada na entre a região do visível e micro-ondas, sendo que a faixa do infravermelho próximo corresponde a 800 e 2500 nm (BURNS; CIURCZAK, 2008).

Os espectrômetros de NIR emitem radiação sobre o material com energia suficiente para induzir a excitação vibracional (WORKMAN; WEYMER, 2007). O material emite tal energia, a qual é capturada por detectores fotossensíveis, assim gerando um gráfico, denominado espectro (HEIN; LIMA; CHAIX, 2010). A intensidade de radiação que é refletida da superfície da amostra e analisada como uma função de comprimento de onda é usualmente apresentada como espectro de refletância (MUÑIZ et al., 2012).

O método de análise por espectroscopia no infravermelho próximo consiste em correlacionar os espectros de NIR com as propriedades da amostra determinadas

convencionalmente. Para isso, desenvolve-se uma curva de calibração usando, por exemplo, estatística multivariada (PLS) e, após a validação externa, basta obter um espectro da amostra desconhecida e com a utilização de computador equipado com software adequado pode-se rapidamente prever a propriedade desejada (MAGALHÃES et al., 2006; FERREIRA, 2013).

A obtenção de informações contidas nos espectros NIR é complexa e requer a utilização de métodos quimiométricos (HEIN; LIMA; CHAIX, 2010), os quais podem associar técnicas matemáticas, estatísticas e informáticas com o objetivo de extrair informações relevantes dos espectros no NIR (GEMPERLINE, 2006). Após a obtenção do conjunto de dados espectrais NIR, geralmente estes sofrem algum tipo de pré tratamento antes de serem utilizados para fins qualitativos ou quantitativos (PASQUINI, 2003).

Para o desenvolvimento do modelo de calibração, os dados são obtidos e validados pela utilização de dois conjuntos de amostras heterogêneas e independentes, onde um dos conjuntos é usado para definir o modelo e outro, denominado validação, é utilizado para estimar e avaliar a capacidade do modelo, ou seja, assegurar que o modelo reflita o comportamento da amostra analisada (KOIZIMI et al., 2011). A acurácia do modelo estatístico por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) depende das amostras utilizadas para geração do modelo que devem representar a variabilidade dos indivíduos a serem avaliados, bem como da qualidade das análises laboratoriais para a caracterização das mesmas (SOUZA et al., 2011).

A radiação eletromagnética do NIR é capaz de mensurar a vibração molecular entre ligações entre os átomos: C-H, N-H e O-H. Desta forma, é possível determinar a composição de compostos orgânicos (LEI; BAUHUS, 2010) possibilitando a avaliação, caracterização e classificação de materiais, sobretudo de origem biológica (HEIN et al., 2009).

Desde 1968 a técnica vem sendo utilizada na mensuração de constituintes químicos em alimentos e na agricultura (BEN-GERA; NORRIS, 1968). Trabalhos recentes relatam a aplicação da técnica NIR na análise da composição química de materiais vegetais. Tal técnica já foi utilizada em amostras de erva-mate para determinação da umidade (MAZUR et al., 2014b), metilxantinas (MAZUR et al.,

2014a), origem geográfica (COZZOLINO; RESTAINO; FASSIO, 2010; MARCELO et al., 2014), compostos fenólicos (FRIZON et al., 2015). Em outras culturas agrícolas e florestais também foi aplicada a técnica NIR para determinação de proteínas totais, teor de sólidos solúveis, propriedades químicas (lignina, celulosas, xilanas), carboidratos e lipídios (MORGANO et al., 2007; VIANA et al., 2010, FERREIRA et al., 2013, TRAVERS et al., 2014).

A espectroscopia na região do infravermelho é um método não destrutivo, que necessita do mínimo preparo das amostras (MUNIZ et al., 2012). Constitui-se em uma técnica rápida pois, com o instrumento devidamente calibrado, é possível obter resultados em minutos; apresenta maior repetibilidade em relação aos métodos tradicionais de análises químicas; não necessita da utilização de reagentes químicos; não oferece riscos ao analista, não gera resíduos tóxicos e tem potencial para substituir metodologias convencionais de análises laboratoriais garantindo especificidade e qualidade (JIANG et al., 2010; MUÑIZ et al., 2012; SANTOS; SANTOS; KORNDÖRFER, 2012; FERREIRA, 2013).

Contudo, a espectroscopia no NIR apresenta como desvantagens a dependência de metodologias analíticas bem estabelecidas para a estimativa desse parâmetro durante a etapa de calibração, bem como a necessidade da prévia correlação entre os valores do parâmetro de interesse para um determinado grupo de amostras e os espectros obtidos (MUÑIZ et al., 2012). Além da baixa sensibilidade para constituintes que estejam em reduzidas concentrações (BOKOBZA, 1998).

A produção de mudas é um processo de fundamental importância para a implantação de plantios comerciais, porém demanda tempo, insumos e mão de obra. A espectroscopia por infravermelho próximo (NIR) apresenta-se como uma técnica promissora para auxiliar na predição dos materiais genéticos com maior potencial rizogênico, antes mesmo do estabelecimento dos propágulos no ambiente de enraizamento.

### 3 CAPÍTULO I. MINIESTAQUIA DE ERVA-MATE EM QUATRO ESTAÇÕES DO ANO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA\*

#### RESUMO

*Ilex paraguariensis* é uma espécie florestal que apresenta múltiplas potencialidades, sendo utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Contudo, a propagação seminal da espécie é limitada devido à baixa (inferior a 20%) e desuniforme germinação, além do longo período de estratificação das sementes (de quatro a seis meses) necessário para a quebra da dormência embrionária. Diante do potencial uso da miniestaquia como técnica alternativa para superar tais limitações, objetivou-se avaliar o efeito do ácido indol butírico (IBA) no enraizamento de miniestacas de erva-mate coletadas nas quatro estações do ano (de julho/2014 a maio/2015). As miniestacas foram confeccionadas com 6 cm ( $\pm 1$  cm) de comprimento e duas folhas reduzidas à metade e, a porção basal dos propágulos foi imersa durante 10 segundos em diferentes soluções hidroalcoólicas de ácido indol butírico (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg L<sup>-1</sup>). Após 90 dias da permanência do material vegetal em casa de vegetação climatizada, foram avaliadas a porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca, porcentagem de calogênese, retenção foliar, brotações desenvolvidas e mortalidade. A primavera foi a época mais promissora, proporcionando aproximadamente 70% de enraizamento e, aliada a aplicação de 8000 mg L<sup>-1</sup> de IBA, as miniestacas atingiram o maior comprimento (4,3 cm) e número de raízes (9,1) bem como, a menor taxa de calogênese (0%). A coleta das miniestacas na primavera e a aplicação de 8000 mg L<sup>-1</sup> de IBA é a mais indicada para miniestaquia de erva-mate.

**Palavras-chave:** Clonagem. *Ilex paraguariensis*. Regulador vegetal. Ácido indol butírico.

---

\* Artigo (adaptado) aceito na Revista Ciência Florestal (Qualis Capes Ciências Agrárias: B1).

## MINI-CUTTINGS TECHNIQUE OF YERBA MATE IN FOUR SEASONS OF THE YEAR WITH DIFFERENT IBA CONCENTRATIONS

### ABSTRACT

*Ilex paraguariensis* is a forest species that has multiple potentialities, being used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. However, the seminal propagation of the species is difficult due to low (below 20%) and non-uniform germination and the long period (four to six months) stratification of seeds needed for the breaking of embryo dormancy. The mini-cutting technique is an alternative to overcome such limitations, therefore this study aimed to evaluate the effect of indole butyric acid (IBA) on rooting of yerba mate mini-cuttings collected at different seasons (July/2014 to May/2015). Mini-cuttings were prepared with 6 cm ( $\pm$  1 cm) long and two leaves reduced by half and, the basal portion of the propagules was immersed for 10 second in different hydro alcoholic solutions of IBA (0, 2000, 4000, 6000 and 8000 mg L<sup>-1</sup>). After 90 days of installation of the experiments we evaluated the percentage of rooting, root number and average length of three major roots, percentage of callogenesis, leaf retention, developed shoots and mortality. The spring was the most promising season, providing approximately 70% of rooting and coupled the application of 8000 mg L<sup>-1</sup> of the IBA the mini-cuttings reached the greatest length (4.3 cm) and root number (9.1) as well as the lower callus induction rate (0%). The mini-cuttings collection in the spring and 8000 mg L<sup>-1</sup> of the IBA is the most indicated for mini-cutting technique of yerba mate.

**Keywords:** Cloning. *Ilex paraguariensis*. Plant growth regulator. Indolebutyric Acid.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), espécie pertencente à família Aquifoliaceae, possui importância socioeconômica, principalmente no sul do Brasil e países limítrofes, como Argentina, Uruguai e Paraguai, sendo utilizada na indústria alimentícia para produção de chimarrão, tererê e chá mate (CUQUEL et al., 1994). É potencialmente útil na indústria farmacêutica por conter uma variedade de compostos com propriedades neuroprotetivas, anti-inflamatórias, antioxidantes e diuréticas (LIMA et al., 2014; SOUZA et al., 2015).

Sua propagação via seminal é dificultada devido à dormência embrionária, reduzida e desuniforme germinação e, baixa qualidade genética e fisiológica das sementes (CARVALHO, 1994; FOWLER; STURION, 2000). Além disso, os plantios de erva-mate provenientes de sementes coletadas sem critérios técnicos apresentam desenvolvimento heterogêneo, implicando em quedas na produtividade e qualidade do produto final (WENDLING et al., 2009).

Diante disso, a propagação vegetativa constitui-se em uma alternativa para superação das dificuldades da propagação sexuada, permitindo a multiplicação de genótipos superiores e obtenção de indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz, contribuindo com a uniformidade de populações e precocidade na produção (HARTMANN et al., 2011).

A miniestaquia é uma das técnicas de propagação vegetativa que permite o aproveitamento do potencial juvenil dos propágulos para indução do enraizamento (FERRIANI et al., 2010) e, consiste na utilização de brotações de plantas propagadas vegetativamente ou via seminal que são acondicionadas no leito de enraizamento até a completa formação da muda. Contudo, o sucesso da miniestaquia está intrinsecamente ligado ao desenvolvimento de um sistema radicial adequado.

A formação do sistema radicial adventício é um processo complexo, principalmente para espécies de plantas lenhosas, sendo afetada por fatores endógenos, tais como características genéticas, idade e qualidade dos propágulos, além de fatores externos como tratamento com reguladores vegetais e época do ano de coleta (SORIN et al., 2005; NEGISHI et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

A época do ano é um dos fatores que pode afetar a indução do enraizamento

adventício dos propágulos vegetais, devido as variações nas condições ambientais, tais como fotoperíodo e temperatura, que podem influenciar as condições fisiológicas da planta matriz, principalmente no que se refere a variação do balanço hormonal endógeno ocorrido ao longo das estações do ano (ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001; PEÑA PEÑA et al., 2015). A identificação da época mais favorável ao enraizamento nos diferentes períodos do ano poderá contribuir com a adoção de estratégias de manejo mais adequados, visando otimizar a produção de mudas (BRONDANI et al., 2010).

A aplicação de substâncias promotoras do enraizamento pode acelerar o processo de formação do sistema radicial, aumentando o índice de enraizamento, a velocidade de formação, qualidade, quantidade e uniformidade das raízes (FACHINELLO et al., 2005). O ácido indol butírico (IBA) é uma das principais substâncias indutoras, desencadeando a iniciação do enraizamento próximo à região do corte do propágulo por conta do transporte polar (DIAS et al., 2012, PIRES et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013). Contudo, as concentrações recomendadas para aplicação dos reguladores vegetais podem variar de acordo com a espécie, estado de maturação do propágulo, condições ambientais, entre outros fatores (BORTOLINI et al., 2008; BADILLA et al., 2016).

Na literatura, foi relatado o estudo com miniestaquia de erva-mate a partir de material de origem seminal (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003), bem como o enraizamento de miniestacas desta espécie sob diferentes ambientes de enraizamento (BRONDANI et al., 2008). Contudo, na literatura científica são inexistentes informações a respeito da influência da época de coleta e uso do IBA no enraizamento de miniestacas de erva-mate provenientes de minicepas propagadas via estaquia convencional de árvores de 12 anos de idade.

Diante do exposto e da necessidade do aprimoramento da técnica da miniestaquia na erva-mate como alternativa à superação dos entraves da propagação seminal, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação de diferentes concentrações de IBA no enraizamento de miniestacas de erva-mate coletadas em quatro estações do ano.

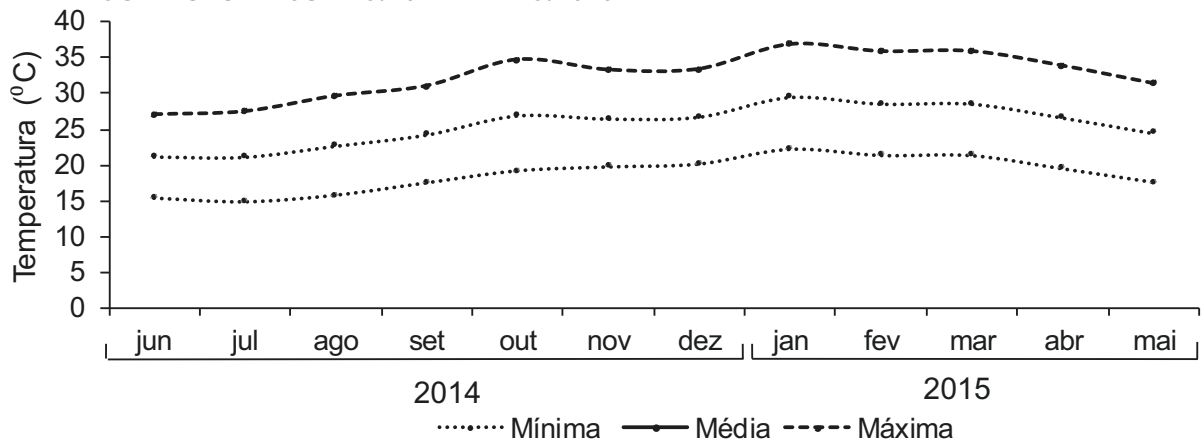
### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Propagação de Espécies Florestais da Embrapa Florestas, situada em Colombo-PR (25°20' S e 49° 14'W, 950 m), e segundo a classificação de Köppen, o clima da região é temperado do tipo Cfb.

Como fonte de propágulos para a miniestaquia foram utilizadas minicepas de erva-mate propagadas pelo processo de estaquia convencional realizado em árvores selecionadas de 12 anos de idade, oriundas de um teste de procedências e progênes. As minicepas foram mantidas em estufa, sob sistema semi-hidropônico tipo canaletão com areia lavada, as quais receberam solução nutritiva composta por 65 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 558 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de Mg<sup>2+</sup>, 517 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de K<sup>+</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 456 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de Ca<sup>2+</sup>, 617 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de Ca<sup>2+</sup>, 8,6 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 3,7 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de Mn, 0,18 mg L<sup>-1</sup> de Molibdato de Na<sup>+</sup>, 0,74 mg L<sup>-1</sup> de Sulfato de Zn e 81,8 mg L<sup>-1</sup> de Hidro Fe-pó, conforme recomendações de Wendling et al. (2007) distribuída via gotejamento três vezes ao dia, a uma vazão total de 5 L m<sup>-2</sup>.

As coletas do material vegetal ocorreram nas quatro estações do ano, realizadas nas seguintes datas: 21/07/2014 (inverno), 04/11/2014 (primavera), 16/02/2015 (verão), 23/05/2015 (outono). Os dados de temperatura máxima, média e mínima do ar verificados na estufa, no período de coleta das miniestacas, estão apresentadas na Figura 1.

FIGURA 1 - TEMPERATURAS MÍNIMAS, MÁXIMAS E MÉDIAS (°C) EM ESTUFA (COLOMBO-PR) ENTRE OS MESES DE JUNHO/2014 A MAIO/2015.



As miniestacas foram confeccionadas com comprimento médio de 6 cm ( $\pm 1$

cm), contendo um par de folhas reduzidas à metade, a fim de evitar o efeito “guarda chuva”, o qual pode reduzir a eficiência da nebulização, pelo fato das folhas formarem uma barreira física impedindo o molhamento do substrato, além de causar perda excessiva de água pela transpiração foliar (ALFENAS et al. 2009). Procedeu-se o corte reto no ápice e corte em bisel na porção basal, sendo as miniestacas mantidas em caixa de isopor contendo água para reduzir perdas por desidratação, até o momento de aplicação dos tratamentos.

Aproximadamente 1,0 cm das bases das miniestacas foram inseridas por 10 segundos em soluções hidroalcoólicas (50% v v<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações de ácido indol butírico (IBA – Merck®): 0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg L<sup>-1</sup>. A testemunha (0 mg L<sup>-1</sup> IBA) foi preparada somente com a utilização de água destilada e álcool (50% v v<sup>-1</sup>), sem adição do regulador vegetal IBA. O plantio foi realizado em tubetes de polipropileno com 55 cm<sup>3</sup>, contendo substrato comercial Tropstato Florestal®, composto por fibra de coco, vermiculita, carvão vegetal e casca de pinus em proporções não informadas pelo fabricante. As miniestacas foram acondicionadas em casa de vegetação climatizada com nebulização intermitente com duração de 30 segundos (80% de umidade relativa e temperatura de 20 a 30<sup>o</sup> C) na Embrapa Florestas.

Após 90 dias da instalação de cada experimento foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de enraizamento (miniestacas vivas que apresentaram raízes de pelo menos 1 mm de comprimento), número de raízes por miniestaca; comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca enraizada (cm); porcentagem de calogênese (miniestacas vivas, sem raízes, com formação de massa indiferenciada na base); porcentagem de retenção foliar (miniestacas que mantiveram as folhas originais no leito de enraizamento até o momento da avaliação), porcentagem de brotações desenvolvidas e porcentagem de mortalidade (miniestacas que apresentavam-se necrosadas).

Os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 4 x 5 (quatro estações do ano x cinco concentrações de IBA) com quatro repetições. A quantidade de miniestacas por unidade experimental variou segundo a quantidade do material vegetal disponível em cada estação. Na primavera e inverno foram utilizadas 18 miniestacas por unidade

experimental e, no outono e verão 20 miniestacas por unidade experimental.

As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett ( $p < 0,05$ ). As variáveis cujas variâncias se mostraram homogêneas foram submetidas à análise de variância ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) e as que apresentaram diferenças significativas pelo teste de F tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey (variáveis qualitativas) e por regressão polinomial (variáveis quantitativas), utilizando-se o programa estatístico Assistat versão 7.7.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância houve interação significativa entre as estações do ano e as concentrações de IBA para o número de raízes (NR), comprimento médio das três maiores raízes (CMR) e porcentagem de calogênese (C) (Tabela 1).

TABELA 1- RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE COLETADAS NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO E SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA, PARA A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES (CMR), PORCENTAGEM DE RETENÇÃO FOLIAR (RF), BROTAÇÕES DESENVOLVIDAS (BD), MORTALIDADE (M) E SOBREVIVÊNCIA (S).

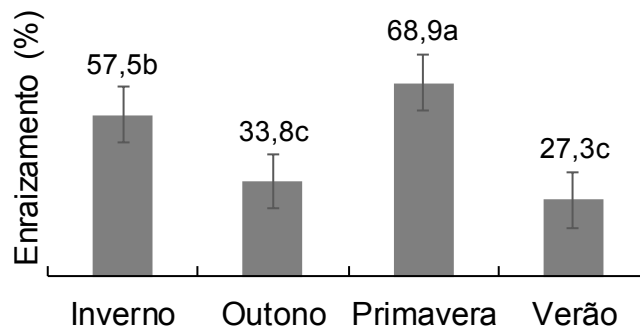
Fontes de variação	GL	Quadrado médio							
		E (%)	NR	CMR (cm)	C (%) <sup>1</sup>	RF (%)	BD (%)	M (%)	S (%) <sup>1</sup>
Estação do ano (E)	3	7699,37**	17,06**	7,12**	656,51**	10199,84**	4016,54**	643,67**	579,94**
Concentração de IBA (C)	4	604,98**	84,55**	13,13**	1045,97**	238,34 <sup>ns</sup>	295,20 <sup>ns</sup>	357,57*	319,99**
E x C	12	120,54 <sup>ns</sup>	13,08**	1,00**	226,11**	300,92 <sup>ns</sup>	125,10 <sup>ns</sup>	137,85 <sup>ns</sup>	78,04 <sup>ns</sup>
Coefficiente de variação (%)		27,49	30,73	27,95	39,93	25,58	41,35	34,38	81,88

<sup>1</sup>- Dados transformados segundo a equação arco seno  $\sqrt{(x/100)}$

\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ). \*\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ). <sup>ns</sup> Não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Para a variável porcentagem de enraizamento, não houve interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre as estações do ano e as concentrações de IBA, indicando que esses fatores são independentes. A primavera foi a época mais favorável ao enraizamento das miniestacas, sendo estatisticamente superior às demais épocas do ano, promovendo em média 68,9% de enraizamento (Figura 2).

FIGURA 2 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE COLETADAS NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO (2014-2015)\*.



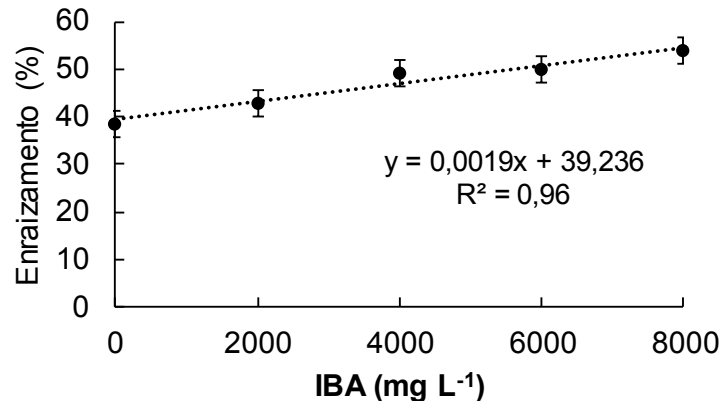
\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais correspondem ao erro padrão da média.

Este resultado contraria ao esperado, visto que na primavera a erva-mate apresenta-se no início da fase reprodutiva com a formação de flores e, de acordo com Taiz e Zeiger (2013), estas estruturas são consideradas drenos dos fotoassimilados que concorrem com a formação de raízes adventícias, evento não confirmado no presente estudo, tendo em vista o maior enraizamento durante a floração. Contudo, possivelmente as reservas acumuladas ao longo das estações mais frias (outono e inverno), durante o período de repouso vegetativo, foram disponibilizadas no início da fase reprodutiva contribuindo para a iniciação radicial.

Comportamento semelhante foi observado por Ferriani et al. (2011) que registraram uma das maiores taxas de enraizamento (cerca de 45%) em miniestacas de *Piptocarpha angustifolia* coletadas na primavera. Da mesma forma, Nery et al. (2014) verificaram que a primavera foi a época mais propícia ao enraizamento de *Psychotria nuda*. Estes autores indicam que as condições fisiológicas são mais favoráveis ao enraizamento nas estações mais quentes, devido a aceleração do metabolismo. A temperatura tem efeito direto sobre o metabolismo da planta e, quanto maior, mais aceleradas serão as reações químicas e, geralmente a maior síntese de auxinas ocorre na primavera e no verão (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Com relação ao efeito do ácido indol butírico, observou-se um aumento linear crescente do enraizamento em relação às concentrações, indicando o efeito positivo da aplicação exógena da auxina na formação do sistema radicial, visto que a testemunha alcançou 38,6% de enraizamento e, com a aplicação de 8000 mg L<sup>-1</sup> de IBA houve 54,0% de enraizamento (Figura 3).

FIGURA 3 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA\*.



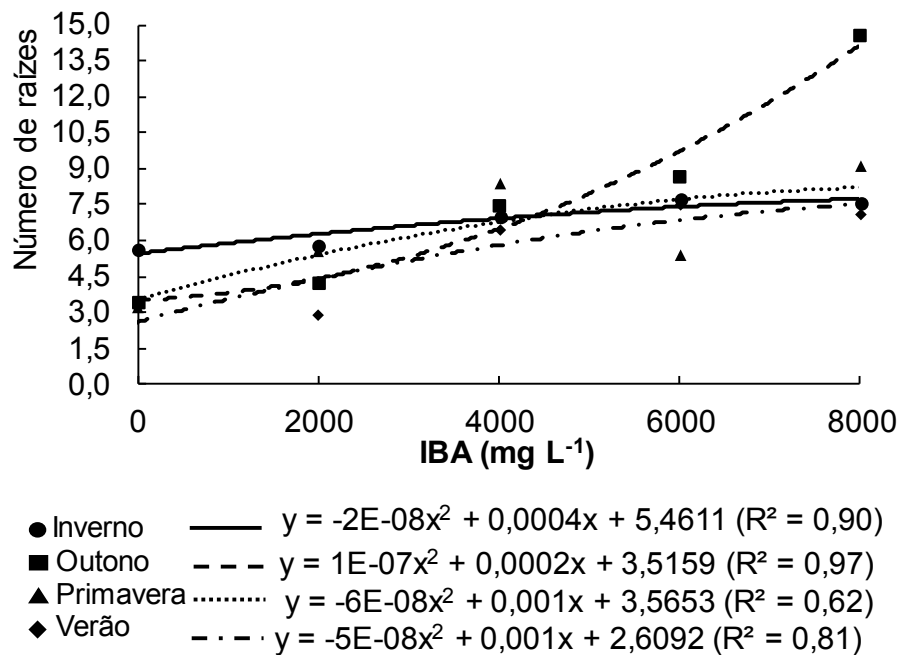
\* Barras verticais correspondem ao erro padrão da média.

Em geral, propágulos vegetativos que contêm características juvenis (e.g. miniestacas) possuem condições fisiológicas, tais como o balanço hormonal, que favorecem o enraizamento, sendo que a adição de reguladores vegetais pode ter efeito inibitório na indução radicial (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003; GUO et al., 2009; FERRIANI et al., 2011). No entanto, a demanda exógena de auxina para a promoção do enraizamento verificada neste estudo, pode estar associada à idade cronológica da planta matriz, principalmente quanto à concentração de auxina insuficiente para promover a indução radicial, bem como possivelmente à presença de inibidores e/ou ausência de cofatores do enraizamento.

Na literatura, é relatada a influência da idade da planta matriz na capacidade de enraizamento. De acordo com Dias et al. (2012), miniestacas de mudas provenientes de sementes enraízam facilmente, enquanto outras oriundas de plantas mais velhas podem enraizar esporadicamente ou não enraizar. Esse fato foi confirmado por Stuepp et al., (2017) que avaliaram o efeito da idade das mudas no enraizamento de propágulos vegetativos de *Ilex paraguariensis* e, constataram a diminuição no enraizamento com o aumento da idade das mudas.

Em relação ao número de raízes, houve interação altamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre a estação em que as miniestacas foram coletadas e a aplicação de IBA. Para todas as estações, a aplicação de IBA beneficiou a indução do maior número de raízes, principalmente nas miniestacas coletadas no outono (14,5) e primavera (9,1), tratadas com 8000 mg L<sup>-1</sup> de IBA, valores superiores ao alcançado pela testemunha, a qual apresentou em média 3,9 raízes/miniestaca (Figura 4).

FIGURA 4 - NÚMERO DE RAÍZES POR MINIESTACA DE ERVA-MATE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA E ESTAÇÕES DO ANO (2014-2015).

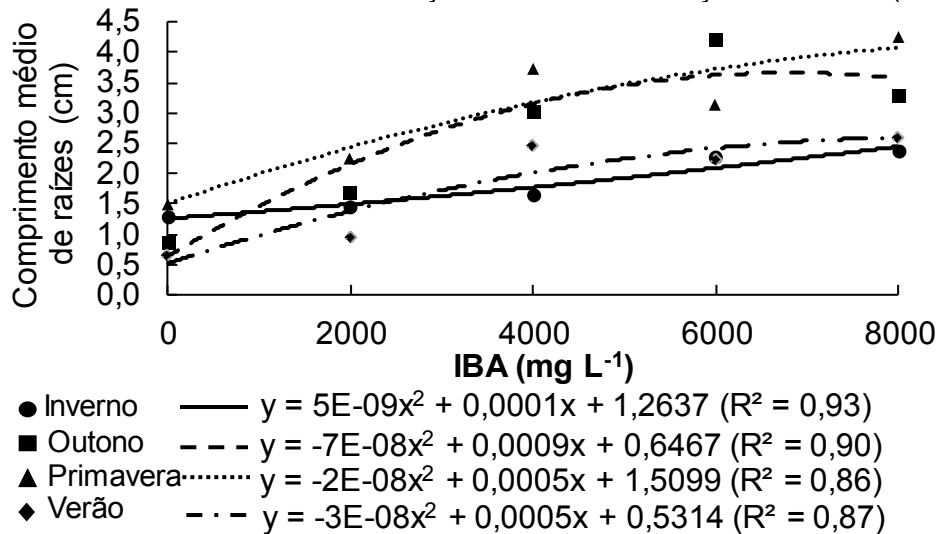


Estes resultados sustentam a hipótese de que as quantidades endógenas de auxinas foram insuficientes para indução de um sistema radicial vigoroso. A concentração endógena do ácido indol acético (IAA), hormônio responsável pela formação de raízes, pode ser abundante ou escassa, de acordo com a condição fisiológica, genética, nível de IAA-oxidase e época de coleta dos própagulos (PIZZATO et al., 2011; COSTA et al., 2013; PORFIRIO et al., 2016).

Além do enraizamento, a qualidade do sistema radicial é outro fator de extrema importância para sobrevivência da muda, características observadas nas miniestacas coletadas na primavera e outono. De acordo com Reis et al. (2000), mudas com melhor sistema radicial fixam-se melhor ao solo quando transplantadas, aumentando as chances de absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente sobrevivência e desenvolvimento.

Para o comprimento médio das três maiores raízes, houve interação significativa ( $p < 0,01$ ) entre os fatores analisados. O outono foi a única época de coleta que proporcionou o maior comprimento de raiz (4,2 cm) com o uso de 6000 mg L<sup>-1</sup> de IBA, seguido da redução desta variável (3,3 cm) com 8000 mg L<sup>-1</sup> (Figura 5). Nas demais estações, a concentração de 8000 mg L<sup>-1</sup> foi a que proporcionou os maiores comprimentos de raiz/miniestaca.

FIGURA 5 - COMPRIMENTO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA E ESTAÇÕES DO ANO (2014-2015).

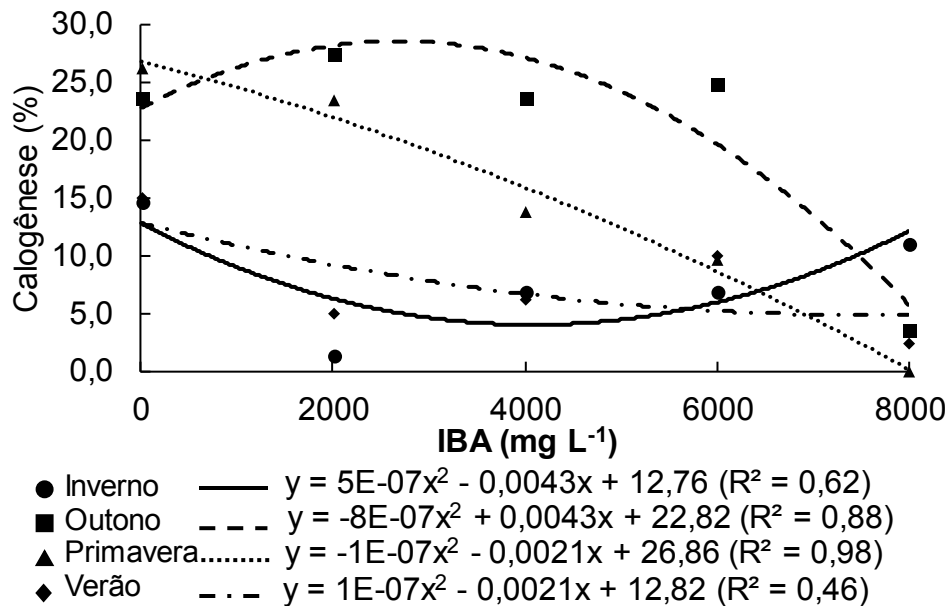


A aplicação exógena de auxina tem efeito positivo na formação de raízes, contribuindo com a formação de um sistema radicial vigoroso, aumentando a porcentagem e a uniformidade do enraizamento, reduzindo o tempo de permanência das mudas no leito de enraizamento (FACHINELLO et al., 1994; GUO et al., 2009).

Novamente verificou-se o efeito positivo da coleta efetuada no início do período reprodutivo (primavera), possivelmente devido ao estado fisiológico favorável da minicepa para coleta das brotações durante esta época. Além disso, é relatado na literatura que nessa época, tem-se os níveis adequados de carboidratos e amido nas miniestacas, os quais estão positivamente relacionados ao enraizamento (ASLMOSHTAGHI; REZA-SHAHSVAR, 2010).

Com relação a porcentagem de calogênese, houve interação significativa ( $p < 0,01$ ) entre os fatores analisados, sendo que o maior valor (27,5%) ocorreu nas miniestacas coletadas no outono e tratadas com 2000 mg L<sup>-1</sup> de IBA (Figura 6). Em todas as estações, exceto no inverno, a porcentagem de miniestacas com calos foi inversamente proporcional à concentração de IBA, uma vez que as menores porcentagens de calogênese (0% na primavera, 2,5% no verão e 3,8% no outono) foram observadas nas miniestacas tratadas com 8000 mg L<sup>-1</sup>.

FIGURA 6 - PORCENTAGEM DE CALOGÊNESE EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA E ESTAÇÕES DO ANO (2014-2015).



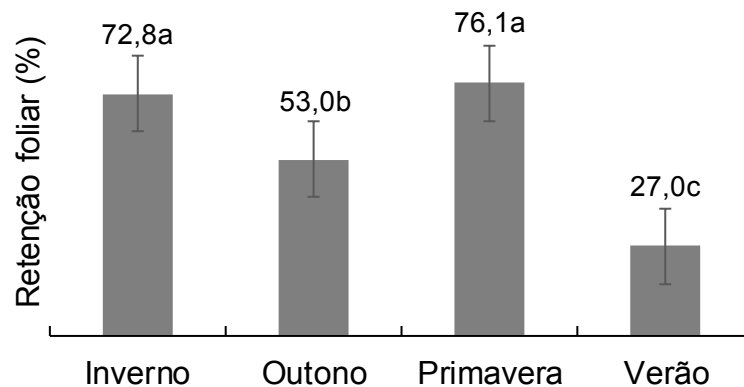
Contudo, na primavera e verão, as maiores taxas de calogênese (15 e 26,4%, respectivamente) ocorreram quando não houve aplicação exógena do regulador vegetal. De maneira semelhante, Lattuada et al., (2011) verificaram a ausência de calos em estacas de *Eugenia uniflora* quando houve aplicação de IBA, enquanto na testemunha 7,6% das estacas apresentaram a proliferação de calos.

A formação inicial das raízes adventícias pode ocorrer a partir do calo e, este se caracteriza como massa irregular de células parenquimáticas em diferentes estádios de lignificação e, sua formação pode indicar baixa juvenildade do material propagado, condições ambientais favoráveis ao enraizamento, equilíbrio entre a concentração endógena de auxina e citocina (HARTMANN et al., 2011, IKEUCHI et al., 2013; NASRI et al., 2015).

O desenvolvimento das raízes adventícias engloba três estádios: a desdiferenciação que envolve a formação de grupos de células meristemáticas, a diferenciação destas células em primórdios radiciais e, o alongamento e emergência das novas raízes, incluindo a formação do tecido vascular entre os primórdios radiciais e o tecido vascular (PACURAR et al., 2014). Desta forma, provavelmente, o IBA acelerou o processo de diferenciação celular nas miniestacas de erva-mate, contribuindo com a surgimento da rizogênese adventícia a partir das células partenquimáticas indiferenciadas.

Quanto à porcentagem de retenção foliar, não houve interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre os fatores época de coleta e concentração de IBA. Foram observadas diferenças altamente significativas apenas das estações do ano, sendo que o maior valor (76,1%) ocorreu nas miniestacas coletadas na primavera, diferindo significativamente das demais épocas, exceto do inverno (Figura 7).

FIGURA 7 - PORCENTAGEM DE RETENÇÃO FOLIAR EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO (2014-2015)\*.



\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais correspondem ao erro padrão da média.

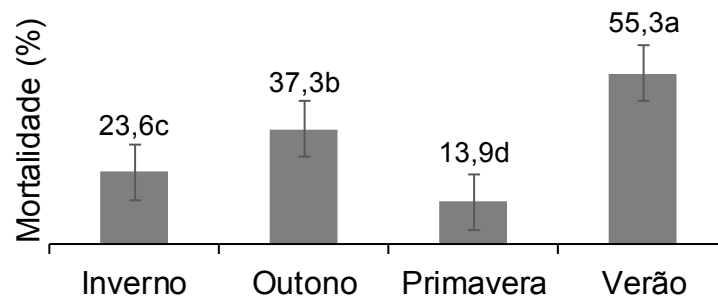
Observou-se relação direta entre enraizamento e retenção foliar, uma vez que cerca de 60% das miniestacas que mantiveram as folhas originais, apresentavam-se enraizadas. Compostos presentes nas folhas e gemas (auxinas e cofatores) são translocados via floema para a base das estacas estimulando o enraizamento (BONA; BIASI, 2010). Aliado a isso, provavelmente o enraizamento observado neste estudo foi beneficiado pelos teores de carboidratos presentes nas miniestacas. Os carboidratos podem influenciar positivamente o enraizamento atuando como elemento estrutural e/ou como recurso energético, além de aumentar o efeito estimulante do IBA (HUSEN; PAL, 2007; ASLMOSHTAGHI; REZA-SHAHSAVAR, 2010; DIAS et al., 2011; NASRI et al., 2015).

Quanto à porcentagem de brotações nas miniestacas de erva-mate, não houve interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre os fatores analisados. Houve efeito altamente significativo apenas das épocas do ano. O outono proporcionou o maior desenvolvimento de brotações (46,0%), valor estatisticamente idêntico ao inverno (38,9%). Esse resultado era esperado, visto que nas estações frias (outono e inverno) ocorre o crescimento vegetativo da erva-mate com emissão de gemas, folhas jovens

e novas brotações.

Com relação à mortalidade, a análise de variância demonstrou que não houve interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre os fatores. A mortalidade foi altamente influenciada pela estação do ano, sendo o maior valor (55,3%) observado nas miniestacas coletadas no verão (Figura 8). Nesta época, apesar das condições de temperatura e umidade controladas no ambiente de enraizamento, observou-se a oxidação e a precoce abscisão foliar.

FIGURA 8 - PORCENTAGEM DE MORTALIDADE EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE COLETADAS EM QUATRO ESTAÇÕES DO ANO (2014-2015)\*.



\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais correspondem ao erro padrão.

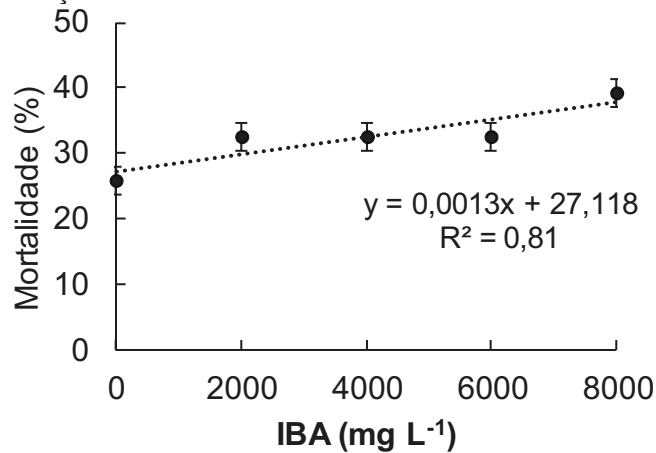
Conforme mencionado anteriormente, apenas 27% das miniestacas coletadas no verão possuíam as folhas originais retidas, sendo que nas primeiras semanas após a instalação do experimento foi observada a queda das folhas. Desta forma, possivelmente não houve tempo hábil de deslocamento, das folhas para a base das miniestacas, de fotoassimilados e outras substâncias essenciais para suprir as necessidades metabólicas das miniestacas resultando assim em maior mortalidade.

Além disso, a dessecação é outro fator que pode ter influenciado na mortalidade, uma vez que esta é uma das principais causas de morte caulinar, decorrente da ausência de raízes que impedem a absorção de água em quantidade suficiente e da excessiva perda de água por transpiração (LIMA et al., 2011).

A mortalidade foi influenciada significativamente pelo uso do regulador vegetal, apresentando comportamento linear crescente com o aumento das concentrações de IBA sendo que o maior valor observado ocorreu para o material tratado com  $8000 \text{ mg L}^{-1}$  (39,1%) (Figura 9). De acordo com Hartmann et al. (2011), o aumento da concentração da auxina, por meio de sua aplicação exógena, produz efeito

estimulador na indução de raízes até um ponto de máximo, a partir do qual qualquer acréscimo do nível da auxina se torna inibitório.

FIGURA 9 - PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE ERVA-MATE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IBA.



\* Barras verticais correspondem ao erro padrão da média.

Bitencourt et al. (2009) avaliaram o enraizamento de estacas de erva-mate oriundas de brotações do ano e verificaram 41,3% de mortalidade, sem influência significativa do ácido indol butírico. Desta forma, os dados de mortalidade registrados no presente estudo estão condizentes aos existentes na literatura para cultura de erva-mate.

### 3.4 CONCLUSÕES

A adição exógena de ácido indol butírico (IBA) é necessária para indução de maior enraizamento, número e comprimento de raízes em miniestacas de erva-mate, sendo a aplicação de 8000 mg L<sup>-1</sup> a mais indicada.

A primavera é a época do ano mais favorável para coleta dos propágulos de erva-mate por favorecer o enraizamento.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500 p.
- ASLMOSHTAGHI, E.; REZA-SHAHSAVAR, A. Endogenous soluble sugars, starch contents and phenolic compounds in easy and difficult to root olive cuttings. **Journal of Biological & Environmental Sciences**, v.4, n.11, p.83-86, 2010.
- BADILLA, Y. et al. IBA efficiency on mini-cutting rooting from Teak (*Tectona grandis* Linn F.) clones. **Revista Árvore**, v. 40, n. 3, p. 477–485, 2016.
- BITENCOURT, J. et al. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.277-281, 2009.
- BONA, C.M.; BIASI, L.A. Influence of leaf retention on cutting propagation of *Lavandula dentata* L. **Revista Ceres**, v.57, n.4, p.526-529, 2010.
- BORTOLINI, M. F. et al. *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: Enraizamento, anatomia e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 2, p. 159–171, 2008.
- BRONDANI, G.E. et al. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.57, p.29-38, 2008.
- BRONDANI, G.E. et al. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (ii) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, v.20, n.3, p.453-465, 2010.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa Florestas, 1994.
- COSTA, C. T. et al. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 1-19, 2013.
- 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**, v.5, n.3, p.415-421, 1994.
- DIAS, C.D. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.32, n.72, p.453-462, 2012.
- DIAS, J.P.T.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. IBA e carboidratos no enraizamento de brotações procedentes de estacas radiciais de *Rubus spp.* **Revista Brasileira de**

**Fruticultura**, v.33, n. espe1, p. 666-671, 2011.

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

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: [s.n.], 2005.

FERRIANI, A.P. et al. Produção de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31, n.67, p.257-264, 2011.

FERRIANI, A.P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agro@ambiente on-line**, v.4, n.2, p.102-109, 2010.

FOWLER, J.A.P.; STURION, J.A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate**. Comunicado Técnico Embrapa Florestas, nº 45, p.1-5, 2000.

GUO, X. et al. Effect of auxin treatments, cuttings`collection date and initial characteristics on *Paeonia`Yang Fei Chu Yu`cutting* propagation. **Scientia Horticulturae**, v.119, n. 2, p.177-181, 2009.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011.

HUSEN, A.; PAL, M. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests**, v. 33, n. 3, p. 309–323, 2007.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3159–3173, 2013.

LATTUADA, D.S.; SPIER, M.; SOUZA, P.V.D. Pré tratamento com água e doses de ácido indolbutírico para estaquia herbácea de pitangueiras. **Ciência Rural**, v.41, n.12, p.2073-2079, 2011.

LIMA, D.M. et al. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.422-438, 2011.

LIMA, N.S. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptina resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, v.115, p.29-35, 2014.

NASRI, F. et al. Study of indole butyric acid (IBA) effects on cutting rooting improving some of wild genotypes of damask roses (*Rosa damascena* Mill.). **Journal of Agricultural Sciences**, v.60, n.3, p.263-275, 2015.

NEGISHI, N. et al. Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. **New Forest**, v. 45, p.577–587, 2014.

NERY, F.S.G.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; KOEHLER, H. Enraizamento de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltl.) Wawra (Rubiaceae) nas quatro estações do ano. **Ciência Florestal**, v.24, n.1, p.243-250, 2014.

PACURAR, D. I.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 1, p. 83–96, 2014.

PEÑA PEÑA, M.L.; ZANETTE, F.; BIASI, L.A. Época de coleta e ácido indolbutírico no enraizamento de miniestacas de pitangueira. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n.5, p.3055-3068, 2015.

PIRES, P.P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Ácido indolbutírico e ortotropismo na miniestaquia de *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, v.37, n.3, p.393-399, 2013.

PIZZATTO, M. et al. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. **Revista Ceres**, v.58, n.4, p.487-492, 2011.

PORFÍRIO, S. et al. Current analytical methods for plant auxin quantification - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 902, p. 8–21, 2016.

REIS, J.M.R. et al. Efeito do estiolamento e do ácido indol butírico no enraizamento de estacas do porta-enxerto *Pyrus calleryana* Dcne. **Ciência Agrotecnologia**, v. 24, p.931-938, 2000.

SORIN, C. et al. Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require argonaute. **The Plant Cell**, v.17, p. 1343-1359, 2005.

SOUZA, A.V.V. et al. Enraizamento *in vitro* de catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. Ex de Souza), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.51-58, 2015.

STUEPP, C. A. et al. Age of stock plants, seasons and iba effect on vegetative propagation of *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, v. 41, n. 2, p. 1–7, 26 jun. 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

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

WENDLING, I. et al. Seleção de matrizes e tipo de propágulo na enxertia de substituição de copa em *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, v.33, n.5, p.811-819, 2009.

WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3.; FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVAMATE, 1., 2003. Chapecó. **Anais...** Chapecó: Epagri, 2003, 8 p. 1 CD-ROM.

ZHANG, W. et al. Mechanisms underlying the regulation of root formation in *Malus hupehensis* stem cuttings by using exogenous hormones. **Journal Plant Growth regulation**, v.35, p.1-12, 2016.

ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; RODRIGUES, J.D. **Estaquia: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos**. Curitiba: [K. C. Zuffellato-Ribas], 2001.

#### 4 CAPÍTULO II. MINIESTAQUIA DE *Ilex paraguariensis*: EFEITO DA SAZONALIDADE, GENÓTIPO, TEOR HORMONAL E BIOQUÍMICO

##### RESUMO

A formação de raízes adventícias em propágulos vegetativos é influenciada por vários fatores endógenos e ambientais. Neste estudo foram avaliadas a influência da sazonalidade e do teor bioquímico e hormonal no enraizamento adventício de diferentes genótipos de erva-mate. Para tanto, foram confeccionadas miniestacas de seis clones de erva-mate em quatro épocas do ano e, realizadas as quantificações das concentrações de ácido indol acético (IAA) livre, proteínas totais (PT) e açúcares totais (AT) destes propágulos. O teor hormonal e bioquímico, bem como a capacidade rizogênica dos clones IR4, CAN e SEM foram superiores aos demais clones, principalmente quando coletados na primavera. Esta época foi a mais favorável tanto para induzir a maior taxa de enraizamento (superior a 80%), quanto maior número e comprimento de raízes (8 e 4,7 cm, respectivamente). Estes resultados coincidiram com as maiores concentrações de proteínas (média 46,7 mg g<sup>-1</sup>), carboidratos (média de 133 mg g<sup>-1</sup>) e ácido indol acético (média de 526,6 mg g<sup>-1</sup>). O genótipo e a época de coleta dos propágulos influenciam o enraizamento adventício de miniestacas de erva-mate. A primavera é a época mais favorável à indução e desenvolvimento radicial, fato diretamente associado aos níveis de PT, AT e IAA.

**Palavras-chave:** Auxina. Carboidratos. Proteínas. Erva-mate. Propagação clonal.

## **MINI-CUTTING TECHNIQUE OF *Ilex paraguariensis*: EFFECT OF SEASONALITY, GENOTYPE, HORMONAL AND BIOCHEMICAL CONTENT.**

### **ABSTRACT**

Adventitious root formation in vegetative propagules is influenced by endogenous and environmental factors. In this study, the influence of seasonality, biochemical and hormonal content were evaluated in the adventitious rooting of yerba mate mini-cuttings. Mini-cuttings of six yerba mate clones were made during four seasons of the year, as well as quantifications of free indole acetic acid (IAA), total protein (PT) and total sugars (AT). The hormonal and biochemical content, as well as the rhizogenic capacity of the clones IR4, CAN and SEM were superior to the others clones, especially when collected in the spring. That season was the most favorable period to induce highest rooting rate (greater than 80%), and higher number and length of roots (8 and 4.7 cm, respectively). These results are related to the highest concentrations of proteins (average 46.7 mg g<sup>-1</sup>), carbohydrates (average 133 mg g<sup>-1</sup>) and indole acetic acid (average 526.6 mg g<sup>-1</sup>) in the spring. The genotype and the season influence the adventitious rooting of yerba mate mini-cuttings. Spring is the most favorable season for induction and root development, a fact directly associated with PT, AT and IAA levels.

**Keywords:** Auxin. Carbohydrates. Proteins. Yerba mate. Clonal propagation.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A produção efetiva de mudas é uma etapa extremamente importante no estabelecimento de genótipos de interesse comercial, sendo a propagação vegetativa amplamente utilizada em viveiros de mudas, por assegurar a multiplicação de indivíduos com características desejáveis, formação de plantios homogêneos e produtivos e, por evitar a variabilidade genotípica recorrente entre mudas obtidas a partir de sementes (HIGASHI; SILVEIRA, 2000; RAGONEZI et al., 2010).

O sucesso da produção de mudas propagadas vegetativamente depende da formação e desenvolvimento de raízes adventícias. O enraizamento adventício é um processo complexo, pois envolve a interação de fatores endógenos e ambientais (RADMANN; FACHINELLO; PETERS, 2002), varia substancialmente entre e dentro de espécie (MAURIAT et al., 2014) e, é influenciado pela composição bioquímica dos propágulos (YAN et al., 2017).

As proteínas são exemplos de compostos bioquímicos associados ao enraizamento (SORIN et al., 2006), por auxiliarem na indução, formação e desenvolvimento de raízes adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2013), atuando como enzimas (WOODWARD; BARTEL, 2005), componente estrutural (THOMAS; LEE; SCHIEFELBEIN, 2003) e/ou estarem envolvidas na sinalização e biossíntese de auxinas (FRANKLIN et al., 2011; HORNITSCHKE et al., 2012; ZHANG et al., 2017b).

O desenvolvimento radicial também é impulsionado pela disponibilidade de carboidratos (CORRÊA et al., 2005). Esses compostos são produtos diretos da atividade fotossintética e constituem um importante recurso energético (ASLMOSHTAGHI; REZA-SHAHSAVAR, 2010), exercendo relevante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (SAIRANEN et al., 2012), bem como elemento estrutural celular (fonte de esqueleto de carbono) para iniciação do primórdio radicial (CORRÊA et al., 2005).

Ainda permanece controversa a relação entre os níveis de carboidratos e a formação de raízes adventícias. Alguns estudos demonstram a correlação entre o enraizamento e o teor de carboidratos (TAKAHASHI et al., 2003; CORRÊA et al., 2005; ASLMOSHTAGHI; REZA-SHAHSAVAR, 2010; RAGONEZI et al., 2010; DENAXA; VEMMOS; ROUSSOS, 2012), enquanto em outros não foi possível

estabelecer tal relação (TSIPOURIDIS; THOMIDIS; BLADENOPOULOU, 2006). Agulló-antón et al. (2011) identificaram que níveis supra ótimos de açúcares podem atuar como inibidores do enraizamento. De acordo com TAKAHASHI et al. (2003), a influência dos carboidratos na formação de raízes adventícias depende do tipo e concentração do açúcar, condições de luz, fase do enraizamento e genótipo analisado.

Os níveis hormonais endógenos também afetam o enraizamento (PORFIRIO et al, 2016a). Os hormônios vegetais podem exercer efeito direto (atuando sobre a divisão ou crescimento celular) ou indireto (interagindo com outras moléculas ou compostos) (LI et al., 2009). As auxinas são um grupo de hormônios diretamente envolvidos com a rizogênese, sendo o ácido indol acético (IAA) um dos principais indutores desse processo (COSTA et al., 2013; STEFFENS; RASMUSSEN, 2016).

O efeito auxínico sobre o enraizamento é variável, pois a ação deste hormônio depende de vários fatores como o nível de biossíntese, conjugação, e degradação (LJUNG et al., 2002; STEFFENS; RASMUSSEN, 2016), concentração de IAA livre, responsividade dos tecidos (SAIRANEN et al., 2012), estágio de enraizamento (TONON; KEVERS; GASPAR, 2001; PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014), além da ação de fatores exógenos que regulam este hormônio como sazonalidade, nível de açúcares, uso de reguladores vegetais, atividade de enzimas antioxidantes, dentre outros (DENAXA; VEMMOS; ROUSSOS, 2012; YAN et al., 2017; ZHANG et al., 2017a).

Estudos indicam provável associação entre a capacidade rizogênica e a sazonalidade (BRONDANI et al., 2010; DENAXA; VEMMOS; ROUSSOS, 2012; MARTÍNEZ-ALONSO et al., 2012; PORFÍRIO et al., 2016b). Este fato está relacionado às variações ambientais recorrentes ao longo do ano, as quais influenciam as condições fisiológicas da planta matriz e, conseqüentemente, afetam a responsividade dos propágulos ao enraizamento (OSTERC; PETKOVŠEK; STAMPAR, 2016).

Diante da importância de compreender a base fisiológica e bioquímica do enraizamento adventício, o objetivo deste estudo foi avaliar o enraizamento de miniestacas de *Ilex paraguariensis* e, relacionar a capacidade rizogênica destes propágulos com as concentrações endógenas de ácido indol acético, açúcares e proteínas totais, além de verificar possível influência da sazonalidade e dos genótipos

utilizados no enraizamento adventício.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Miniestaquia

Foram utilizados propágulos vegetativos de minicepas de seis clones de erva-mate, sendo três estabelecidos (BRS 409, BRS 408 e F2) no minijardim clonal da Embrapa Florestas (Colombo-PR) e, outros três (CAN, BRS BLD Yari e SEM), no minijardim clonal da Empresa Baldo (São Mateus do Sul-PR), manejadas de forma similar. Na Tabela 2 estão apresentados o sexo, idade e local de seleção das plantas matrizes fornecedoras de propágulos (estacas) que deram origem às minicepas.

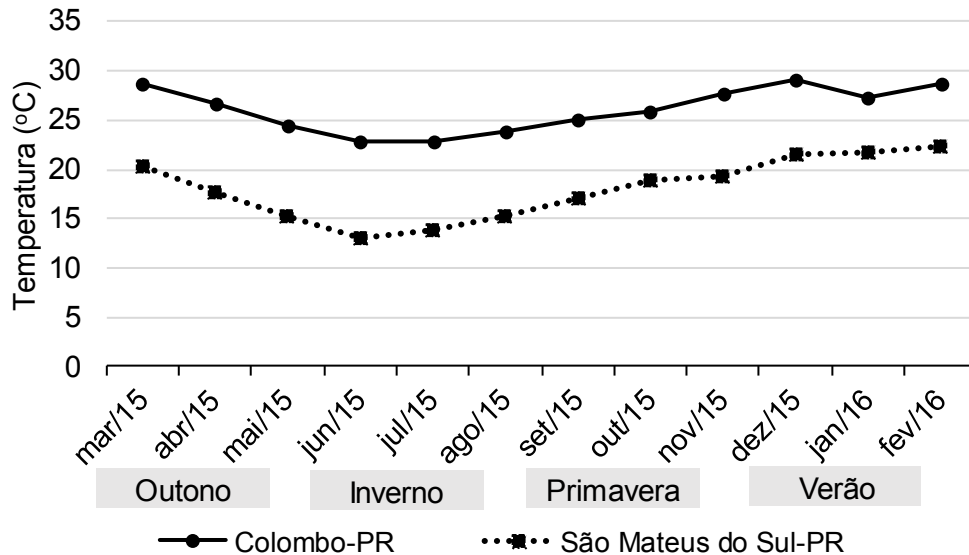
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL VEGETAL UTILIZADO PARA O ESTABELECIMENTO DO MINIJARDIM CLONAL.

<b>Clone</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade da planta matriz</b>	<b>Local de seleção da planta matriz</b>
BRS 409	Macho	12 anos	Ponta Grossa-PR
BRS 408	Fêmea	12 anos	Ponta Grossa-PR
F2	Fêmea	+ 80 anos	São Mateus do Sul-PR
CAN	Fêmea	+ 80 anos	São Mateus do Sul-PR
BRS BLD Yari	Fêmea	5 anos	União da Vitória-PR
Sementes - SEM	Origem seminal		São Mateus do Sul-PR

Os minijardins foram estabelecidos em estufa sob sistema semi-hidropônico (canaletão) com areia lavada na Embrapa Florestas. As minicepas receberam solução nutritiva conforme recomendações de Wendling et al. (2007), distribuída via gotejamento três vezes ao dia, a uma vazão total de 5 L m<sup>-2</sup>.

As coletas do material vegetal ocorreram nas quatro épocas do ano (abril/2015; julho/2015; outubro/2015; janeiro/2016). Os dados de temperatura durante o período de coletada podem ser observados na Figura 10.

FIGURA 10. VALORES MÉDIOS MENSAIS DE TEMPERATURA EM COLOMBO-PR E SÃO MATEUS DO SUL-PR (MARÇO/2015 A FEVEREIRO/2016).



As brotações provenientes das minicepas cultivadas na Empresa Baldo foram coletadas, armazenadas em caixa de isopor contendo gelo no fundo, recobertas com folhas de jornal umedecidas com água e transportadas até o Laboratório de Propagação de Espécies Florestais da Embrapa Florestas, em Colombo-PR, onde foram confeccionadas. As brotações coletadas das minicepas cultivadas na Embrapa Florestas, foram mantidas em caixa de isopor e realizadas pulverizações constantes com água para manutenção da turgescência foliar até o término da confecção das miniestacas.

As miniestacas foram confeccionadas com comprimento médio de 6 cm ( $\pm 1$  cm), contendo um par de folhas reduzidas à metade, corte reto no ápice e em bisel na porção basal. O plantio das miniestacas ocorreu em tubetes de prolipropileno com capacidade de 55 cm<sup>3</sup>, utilizando como substrato comercial Tropstato Florestal®, o material foi mantido em casa de vegetação climatizada com nebulização intermitente (80% UR – umidade relativa e temperatura de 20 a 24<sup>o</sup> C) na Embrapa Florestas.

Após 90 dias no ambiente de enraizamento, foram avaliadas a porcentagem de enraizamento (E); número de raízes/miniestaca (NR) e comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca (CMR).

## 4.2.2 Composição bioquímica

### 4.2.2.1 Preparo das amostras

As análises dos compostos bioquímicos foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia de Produtos não Madeiráveis da Embrapa Florestas (Colombo-PR). Em tais análises, foram utilizadas miniestacas coletadas no momento da instalação dos experimentos de miniestaquia.

O material vegetal (cerca de 48 miniestacas/tratamento) destinado para quantificação de proteínas e carboidratos foi inserido em sacos de papel Kraft, transportado em caixa de isopor contendo gelo e, armazenado em ultra freezer (Sanyo) a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise laboratorial. As miniestacas (cerca de 36 miniestacas/tratamento) utilizadas para quantificação de ácido indol acético (IAA) foram armazenadas em tubos plásticos do tipo Falcon envoltos em papel alumínio, transportadas em caixa de isopor contendo gelo seco e/ou nitrogênio líquido e, encaminhadas ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (Curitiba-PR) para liofilização por 72 horas (Liofilizador Edwards – super Modulyo). Após a desidratação, o material foi armazenado em ultra freezer (Sanyo)  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

### 4.2.2.2 Análise hormonal

O material vegetal foi triturado em moinho de faca (A11 basic - IKA) com nitrogênio líquido, pesado (0,3 g) e, inserido em frascos de vidro com capacidade de 5 mL, envoltos em papel alumínio a fim de evitar a foto-oxidação. Conforme metodologia adaptada por Kelen et al. (2004), as amostras foram homogeneizadas em solução contendo 4,5 mL de metanol-água (70:30 v v<sup>-1</sup>) (Metanol grau HPLC-Merck) e 100 mg L<sup>-1</sup> de hidroxitolueno butilado (BHT), ao qual foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de ácido indol acético hepta deuterado (IAA-D7) (Sigma-Aldrich). Foi direcionado fluxo de nitrogênio gasoso no interior dos frascos contendo as amostras por cerca de 30 segundos, sendo estas, em seguida armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  *overnight*. As soluções foram transferidas para tubos de ensaio (100 mm x 16 mm) e centrifugadas a 1000

rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi inserido em balão de fundo redondo de 25 mL, protegido da luz direta e mantido no evaporador rotativo (Fisatom) sob agitação a 100 rpm a 30-35° C até evaporação da metade do volume inicial da solução. O pH desta solução foi ajustado para 8-9 com 0,5 M de hidróxido de sódio (NaOH).

A extração da camada aquosa foi realizada com a adição de 1 mL de acetado de etila grau HPLC (Avantor), processo repetido por duas vezes consecutivas. O pH foi reajustado para 2,5 com 0,5 M de ácido clorídrico (HCl) e a solução foi particionada por três vezes com 1 mL de éter dietílico grau HPLC e 0,1 mg mL<sup>-1</sup> de BHT, filtrada com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e seca sob fluxo lento de nitrogênio gasoso até secagem completa. O resíduo foi dissolvido em 300 µL diclorometano grau HPLC, 15 µL de agente derivatizante [N-(tert-Butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida, com 1% TBDMSCL] e mantido por 1 h a 65° C. A análise foi por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas GC-MS (Focus GC, Thermo Scientific). As concentrações foram expressas como mg g<sup>-1</sup> massa seca (MS).

#### 4.2.2.3 Quantificação de proteínas totais (PT)

As miniestacas foram trituradas em moinho de facas (A11 basic - IKA), pesadas em duplicata (0,5 g) e inseridas em um tubo de digestão juntamente com 0,5 g de catalisador (composto por 6,3 g de selenito de sódio, 4,0 g de sulfato de cobre pentahidratado e 48,5 g de sulfato de sódio anidro). Em seguida, foi adicionado 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado e mantido no bloco digestor (Tecnal) a uma temperatura inicial de 100° C, elevando a temperatura em 50° C a cada 30 minutos até alcançar 350° C onde permaneceu por, no mínimo, 3 horas. Após a completa digestão e resfriamento das amostras, foram adicionados 15 mL de água destilada. A destilação da amostra foi realizada em destilador de nitrogênio (Tecnal TE036-1) e a titulação com ácido clorídrico (0,1M). A concentração de proteínas totais foi determinada conforme método Kjeldahl (AOAC, 1984) e expressas como mg g<sup>-1</sup> massa fresca (MF).

#### 4.2.2.4 Quantificação dos açúcares totais (AT)

As miniestacas foram trituradas em moinho de facas (A11 basic - IKA), pesadas em duplicata (1,0 g) e maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5, seguida da filtração em papel filtro quantitativo (Unifil). Em um tubo de ensaio, adicionou-se 10 µL do extrato, 490 µL de água destilada, 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Após o resfriamento da solução, as leituras foram realizadas a 490 nm em espectrofotômetro (UV/VIS Shimadzu-1800) e comparadas com uma curva-padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956). As concentrações foram expressas como mg g<sup>-1</sup> massa seca (MS).

#### 4.2.3 Delineamento e análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4 x 6), sendo os fatores constituídos por quatro épocas do ano e seis clones de erva-mate. Nos experimentos de miniestaquia foram utilizadas quatro repetições com 20 miniestacas por unidade experimental. Para quantificação de açúcares totais e proteínas foram utilizadas três repetições de oito miniestacas por tratamento e, para análise hormonal foram três repetições de 12 miniestacas por tratamento.

As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias se mostraram homogêneas foram submetidas à análise de variância e as que apresentaram diferenças significativas pelo teste de F tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Realizou-se a análise de correlação de Pearson ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) para verificar a relação entre o enraizamento adventício e o teor dos compostos bioquímicos. Foi aplicado o sistema de classificação desenvolvido por Shimakura (2006), no qual atribuiu um valor qualitativo aos valores numéricos do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), onde:  $r = |0,00|$  a  $|0,19|$  - correlação bem fraca;  $r = |0,20|$  a  $|0,39|$  - correlação fraca;  $r = |0,40|$  a  $|0,69|$  - correlação moderada;  $r = |0,70|$  a  $|0,89|$  - correlação forte;  $r = |0,90|$  a  $|1,00|$  - correlação muito forte. Para a análise de variância e de correlação de Pearson foi utilizado o programa estatístico Assistat versão 7.7.

### 4.3 RESULTADOS

Os clones e as estações do ano apresentaram comportamento diferenciado em todas as variáveis analisadas. De acordo com a análise de variância houve interação significativa entre as estações do ano e os clones sobre a porcentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento médio das três maiores raízes e, concentração de AT, PT e IAA (Tabela 3).

TABELA 3 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES/MINIESTACA (CMR), TEOR DE AÇÚCARES TOTAIS (AT), PROTEÍNAS TOTAIS (PT) E ÁCIDO INDOL ACÉTICO DE CLONES DE ERVA-MATE EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DO ANO (2015/2016).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio					
		E	NR	CMR	AT	PT	IAA
Época do ano (E)	3	1990,63**	14,27**	14,44**	44577,48**	715,24**	579559,58**
Clone (C)	5	3948,13**	50,66**	5,33**	1101,50**	651,95**	296830,70**
E * C	15	177,71**	11,54**	2,14**	395,61*	314,90**	26219,04**
CV (%)		11,57	20,67	23,82	16,20	12,15	24,29

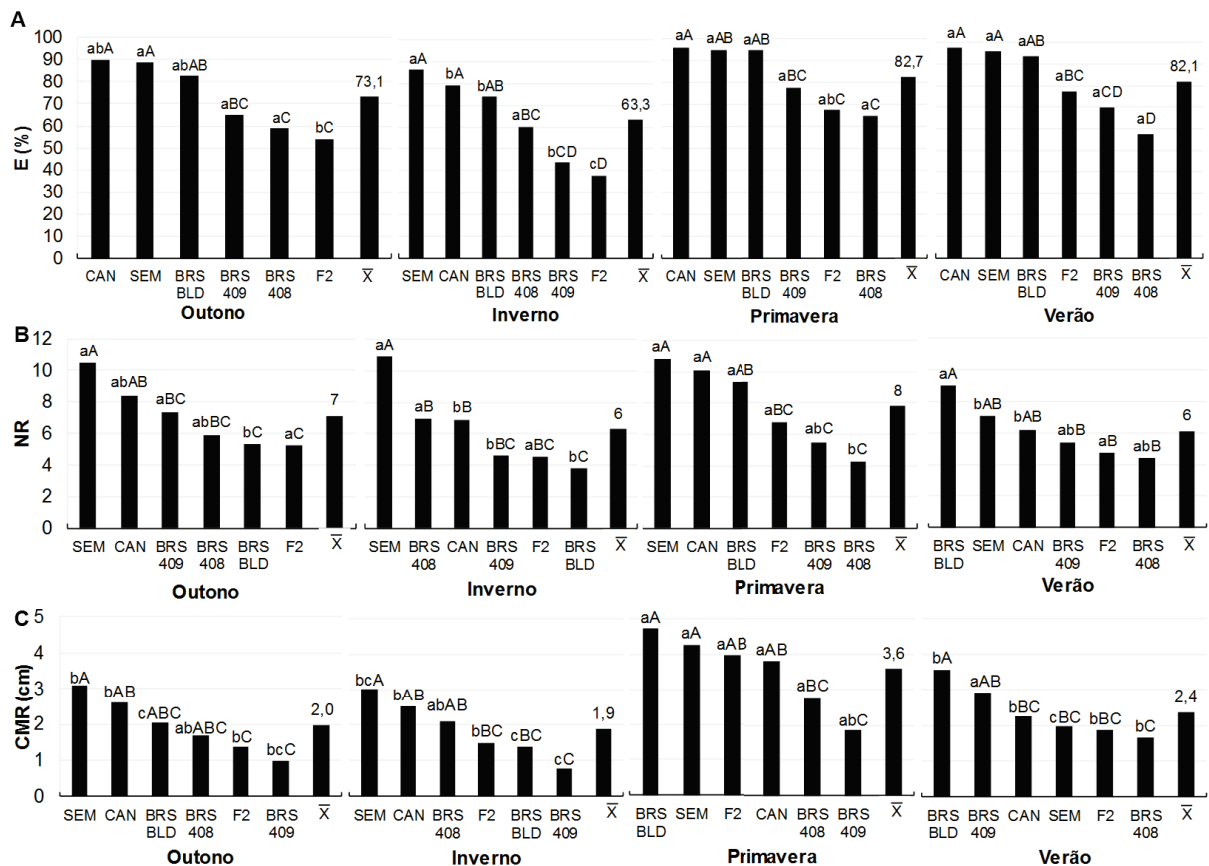
A primavera e o verão foram as estações mais favoráveis para indução de raízes adventícias (médias de 82,7 e 82,1% de enraizamento, respectivamente). Ampla variação de enraizamento foi observada entre os genótipos (de 37,5% em F2 a 97,5% em CAN). De maneira geral, os clones CAN, BRS BLD e SEM apresentaram enraizamento superior aos demais clones em todas as estações do ano. Contudo, no inverno foram observadas as menores médias (63,3%), principalmente, para o clone F2 que exibiu a menor taxa de enraizamento (37,5%), valor estatisticamente idêntico a BRS 409 (43,8%) (Figura 11A).

Com relação ao número de raízes, as maiores médias foram observadas na primavera e outono (média de 8 e 7 raízes/miniéstaca, respectivamente). SEM alcançou as maiores taxas em todas as estações do ano, com exceção do verão, onde BRS BLD apresentou comportamento superior. Porém, o outono e inverno não favoreceram o desenvolvimento das raízes de BRS BLD, no qual exibiu as menores médias (5 e 4 raízes/miniéstaca, respectivamente) (Figura 11B).

Efeito semelhante foi observado quanto ao comprimento médio das raízes, no qual BRS BLD apresentou as melhores médias na primavera, alcançando o maior

comprimento (4,7 cm), valor significativamente idêntico aos clones SEM, F2, CAN. Já os menores comprimentos foram observados em BRS 409 no outono, inverno e primavera com 1,0, 0,8, 1,9 cm respectivamente (Figura 11C).

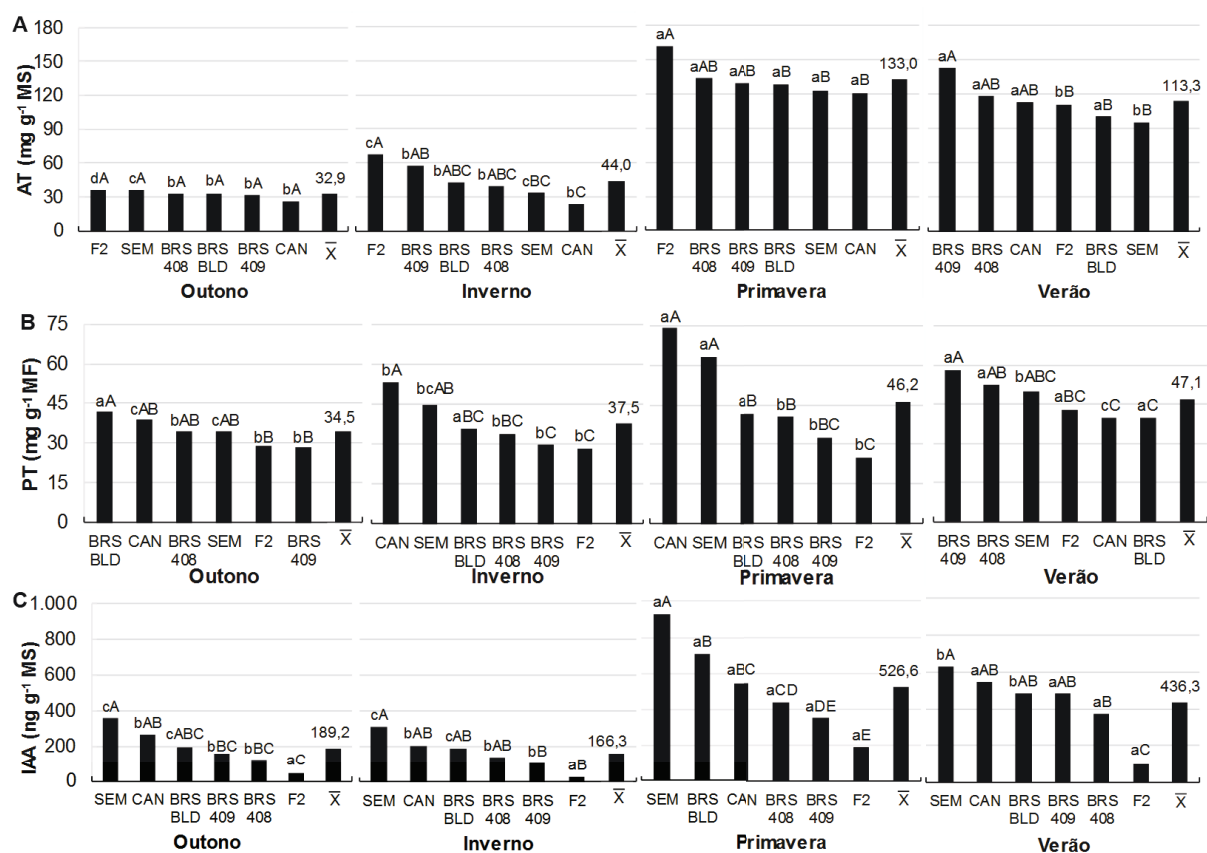
FIGURA 11 - VARIÇÃO DECRESCENTE DO POTENCIAL RIZOGÊNICO DE CLONES DE *Ilex paraguariensis* EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DO ANO (2015/2016). **A.** PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO (E), **B.** NÚMERO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR) **C.** COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES/MINIESTACA (CMR)\*.



\*Médias seguidas por mesma letra minúscula para o mesmo clone entre as épocas de coleta e, médias seguidas por mesma letra maiúscula entre clones para a mesma época de coleta não diferem estatisticamente.

Na primavera e verão foram observadas concentrações de açúcares totais (AT) três vezes maiores (133,0 e 113,3 mg g<sup>-1</sup> de AT, respectivamente) que aquelas coletadas no outono e inverno (32,9 e 44,0 mg g<sup>-1</sup> de AT, respectivamente) (Figura 12A). O clone F2 apresentou as maiores concentrações de AT em todas as épocas do ano, exceto no verão, no qual BRS 409 alcançou a maior média (142,6 mg g<sup>-1</sup> de AT). O clone CAN obteve umas das menores taxas de AT, principalmente, no inverno com 24 mg g<sup>-1</sup> de AT, diferindo significativamente de F2 e BRS 409.

FIGURA 12 - **A.** TEOR DE AÇÚCARES TOTAIS (AT), **B.** PROTEÍNAS TOTAIS (PT), **C.** ÁCIDO INDOL ACÉTICO EM MINIESTACAS DE *Ilex paraguariensis* EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DO ANO (2015/2016) E DO GENÓTIPO\*.



\*Médias seguidas por mesma letra minúscula para o mesmo clone entre as épocas de coleta e, médias seguidas por mesma letra maiúscula entre clones para a mesma época de coleta não diferem estatisticamente.

Com relação às proteínas totais (PT), as maiores concentrações foram observadas nas épocas mais quentes (média 46,7 mg g<sup>-1</sup> de PT), sendo que na primavera CAN e SEM foram estatisticamente superiores aos demais clones, apresentando em média 68,8 mg g<sup>-1</sup> de PT. Nas estações mais frias foram verificadas as menores taxas de PT (média 35,2 mg g<sup>-1</sup>), principalmente nos clones BRS 409 e F2 (Figura 12B).

As concentrações de IAA foram superiores na primavera e verão (526,6 e 436,3 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente) em relação ao observado no outono e inverno (189,2 e 166,3 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente). Em todas as épocas do ano o material oriundo de sementes (SEM) apresentou níveis hormonais superiores aos demais clones, diferentemente do ocorrido em F2, que obteve as menores concentrações de IAA, principalmente no inverno com 28,9 ng g<sup>-1</sup> de IAA (Figura 12C).

Ao observar a relação entre enraizamento e os compostos bioquímicos presentes nas miniestacas, verificou-se que as maiores porcentagens médias de enraizamento entre clones, proporcionadas pela primavera e verão, coincidiram com as maiores concentrações de AT, PT e IAA. Este efeito foi comprovado pela análise de correlação de Pearson, a qual detectou forte correlação entre a porcentagem de enraizamento e os teores de IAA, PT e IAA e, entre o comprimento médio das três maiores raízes e a concentração de AT (Tabela 4). Quanto ao número de raízes, este foi correlacionado muito fortemente com os níveis de IAA.

TABELA 4 - RESUMO DA MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES/MINIESTACA (CMR), TEOR DE AÇÚCARES TOTAIS (AT), ÁCIDO INDOL ACÉTICO (IAA) E PROTEÍNAS TOTAIS (PT) DE MINIESTACAS DE *Ilex paraguariensis*.

Variável	E	NR	CMR	AT	IAA	PT
E	1	0,89*	0,89*	-0,89*	0,87*	0,82*
NR		1	0,83*	-0,80 <sup>ns</sup>	0,90*	0,80 <sup>ns</sup>
CMR			1	-0,83*	0,74 <sup>ns</sup>	0,64 <sup>ns</sup>
AT				1	-0,88*	-0,91*
IAA					1	0,82*
PT						1

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

#### 4.4 DISCUSSÃO

O enraizamento médio das miniestacas de erva-mate (superior a 75%) foi considerado satisfatório, apesar do uso de plantas matrizes com diferentes idades cronológicas, indicando que a técnica utilizada neste estudo possibilitou a obtenção de propágulos com grau de juvenildade adequado para formação do sistema radicial.

Vários autores indicam que miniestacas juvenis são mais responsivas ao enraizamento (AMRI et al., 2010; LATTUADA; SPIER; DE SOUZA, 2011; MAJADA et al., 2011; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014b), diferentemente de propágulos maduros que podem apresentar reduzido conteúdo endógeno de auxinas, diminuição da sensibilidade dos tecidos aos promotores de enraizamento e/ou acúmulo de

substâncias inibitórias (HUSEN; PAL, 2006; AMRI et al., 2010), refletindo no declínio do enraizamento (KANG et al., 2015). Contudo, no presente estudo tanto o material proveniente de sementes de matrizes selecionadas (SEM) quanto aquele oriundo de material adulto (CAN), apresentaram capacidade de enraizamento semelhantes, indicando o vigor fisiológicos das plantas matrizes e apropriado manejo do minijardim clonal.

O enraizamento das miniestacas de erva-mate pode ser considerado genótipo-dependente, visto que a capacidade rizogênica das miniestacas foi influenciada pela origem do material genético. CAN e SEM apresentaram os melhores índices de enraizamento, tanto em termos de porcentagem de enraizamento quanto com relação ao número e comprimento de raízes, diferentemente do ocorrido com F2 e A3 que apresentaram comportamento inferior. A variação do enraizamento entre materiais genéticos da mesma espécie é recorrente em espécies lenhosas (CUNHA et al., 2009) e foi observada em *Dalbergia sissoo* (HUSEN, 2008), *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* (BRONDANI et al, 2008), *Eucalyptus globulus* (BORGES et al., 2011), *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (SOUZA et al., 2013), *Tectona grandis* (BADILLA, 2016) e *Castanea crenata* x *C. sativa* (DANTAS et al., 2016).

A oscilação dos fatores climáticos que ocorreu entre as épocas do ano afetou diretamente a indução de raízes em erva-mate. As estações mais quentes (primavera e verão) contribuíram tanto para a maior porcentagem de miniestacas enraizadas quanto para o maior desenvolvimento de raízes (em número e comprimento), fato atribuído aos maiores níveis de AT, PT e IAA observados em tais épocas. A variação de temperatura e fotoperíodo afetam as condições fisiológicas da planta-matriz (DHILLON et al., 2011) e, conseqüentemente, interfere nos níveis dos compostos bioquímicos e na capacidade rizogênica dos propágulos colhidos.

Uma das razões para a superioridade do enraizamento das miniestacas de erva-mate, coletadas nas épocas mais quentes do ano foi associada à maior produção e/ou mobilização de fotoassimilados. Durante o processo de fotossíntese são sintetizados carboidratos que são utilizados como recurso energético na indução e desenvolvimento das raízes (ASLMOSHTAGHI; REZA-SHAHSAVAR, 2010; SOUZA et al., 2015) como fonte de carbono para biossíntese de aminoácidos e ácidos nucléicos (FACHINELLO, 2005) e, atuam na regulação da expressão gênica (WANG;

RUAN, 2013).

Em geral, o aumento do fotoperíodo e das temperaturas recorrentes na primavera e verão coincidem com o aumento da atividade metabólica (KIBBLER; JOHNSTON; WILLIAMS, 2004b) e, conseqüentemente, incrementos na produção e/ou mobilização de fotoassimilados. Diferentemente, no inverno e outono, os dias curtos associados à baixas temperaturas exercem influência negativa no processo fotossintético das plantas matrizes devido a redução do metabolismo (NEVES et al., 2006).

Na erva-mate, verificou-se forte correlação negativa existente entre os níveis de AT e a porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes. Este fato possivelmente está associado ao consumo de AT com o decorrer do enraizamento das miniestacas. A redução dos níveis endógenos de carboidratos indica que estes açúcares foram utilizados durante a emissão e crescimento radicial (HUSEN; PAL, 2007).

Os níveis endógenos de PT também foram correlacionados com o enraizamento adventício de erva-mate. Verificou-se que as maiores taxas de enraizamento observadas em CAN e SEM coincidiram com as maiores concentrações de PT tanto na primavera quanto no verão. Da mesma forma Husen (2008), verificou que o pico no nível de proteínas estava associado com o período de indução do primórdio radicial e/ou crescimento das raízes de *Dalbergia sissoo*. Zhang et al. (2017b) também constataram o aumento no metabolismo de proteínas solúveis, carboidratos e hormônios em estacas de *Malus hupehensis* e, associaram este evento ao processo de formação de raízes.

Já em outras espécies florestais como em *Piptocarpha angustifolia* (FERRIANI et al., 2008) e *Tibouchina sellowiana*, não houve correlação entre o teor de proteínas e o enraizamento adventício (BORTOLINI et al., 2008). De acordo com esses autores, as maiores concentrações de proteínas registradas no outono e inverno, épocas nas quais houve o menor enraizamento, foram devido às condições estruturais do material vegetal, havendo maior acúmulo de proteínas estruturais (e.g. proteínas ricas em glicina e prolina). Possivelmente, o material do presente estudo possuía maior acúmulo de proteínas diretamente relacionadas com a indução e formação de raízes adventícias e, não apenas com função estrutural.

As proteínas com ação enzimática estão envolvidas em diferentes processos biológicos, sendo responsáveis pela extensibilidade da parede celular (HUSEN, 2008), pelo transporte das auxinas (LUDWIG-MÜLLER, 2000; PEER et al., 2011) e, pelo controle endógeno do excesso de IAA, por meio da conjugação da auxina com aminoácidos (SORIN et al., 2006) promovido pela IAA-amido sintetases (STASWICK et al., 2005).

A primavera favoreceu o enraizamento adventício de erva-mate e, este foi correlacionado positivamente com as concentrações de IAA livre. A relação diretamente proporcional entre a concentração endógena de IAA e o enraizamento também foi verificado em outras espécies, tais como *Picea crassifolia* (KANG et al., 2015), *Olea europaea* (cultivar Nabali) (PORFÍRIO et al., 2016b), híbrido *Populus tremula* × *P. tremuloides* (YAN et al., 2017).

As auxinas podem coexistir na forma livre ou conjugada com açúcares, peptídeos, aminoácidos e proteínas (LUDWIG-MULLER, 2011). A forma conjugada é inativa, constituindo-se como uma das formas de controle dos níveis endógenos deste hormônio e, apenas a auxina na sua forma livre induz os processos fisiológicos (COSTA et al., 2013). Além disso, as auxinas são produzidas em ápices caulinares, folhas e brotos jovens (fonte) e transportadas para a base do propágulo (dreno), desta forma, a presença de folhas e brotos podem afetar a disponibilidade de auxina (PORFÍRIO et al., 2016b).

Como o crescimento vegetativo da erva-mate ocorre principalmente no outono, a produção de auxinas pelas fontes nesta época pode ter sido disponibilizada na sua forma ativa na primavera e verão, promovendo o maior enraizamento em tais épocas. Sendo assim, o maior desenvolvimento de folhas, brotos e gemas que ocorre durante o crescimento vegetativo da erva-mate, pode ter sido fonte de auxina, a qual permaneceu na forma conjugada até ser convertida para a forma livre na primavera e verão, contribuindo com a maior indução radicial nestas épocas. Os fatores ambientais podem influenciar tanto nos níveis de auxina endógena quanto na sensibilidade das células ao sinal da auxina (KIBBLER; JOHNSTON; WILLIAMS, 2004).

As baixas taxas de enraizamento (inferiores a 50%) dos clones A7 e F2 coincidiram com os menores níveis endógena de IAA, fato que pode ser contornado com a aplicação de regulador vegetal.

As auxinas são um dos principais hormônios indutores da rizogênese (WOODWARD; BARTEL, 2005), os quais promovem a nível celular a despolarização das membranas, acidificação da parede celular, ativação de ATPases da membrana plasmática e controle da expressão gênica. Contudo, apenas níveis endógenos de IAA não garantem o sucesso do enraizamento, pois este é um processo complexo e regulado por outros vários fatores, por exemplo: concentração de AT e PT, época de coleta dos propágulos, nível nutricional da planta matriz (PORFÍRIO et al., 2016b), nível de inibidores (COSTA et al., 2013) e de hormônios que atuam sinergisticamente com o IAA (URQUHART; FOO; REID, 2015) e, pelas relações entre auxina/citocinina (MONCALEÁN; RODRÍGUEZ; FERNÁNDEZ, 2002) e auxina/ácido abscísico (KANG et al., 2015).

#### **4.5 CONCLUSÕES**

A capacidade rizogênica das miniestacas de erva-mate é variável e depende do material genético utilizado. Clones que possuem níveis adequados de ácido indol acético apresentam satisfatórias taxas de enraizamento.

O enraizamento adventício da erva-mate é fortemente relacionado aos níveis endógenos de açúcares totais, proteínas totais e ácido indol acético livre.

A sazonalidade influencia a capacidade rizogênica dos propágulos vegetativos. As condições ambientais recorrentes nas estações mais quentes do ano afetam as condições fisiológicas dos propágulos induzindo maior produção de açúcares totais, proteínas totais e ácido indol acético, refletindo em maior enraizamento, número e comprimento de raízes das miniestacas de erva-mate, em comparação com as estações mais frias do ano.

## 4.6 REFERÊNCIAS

ABU-ABIÉD, M. et al. Microarray analysis revealed upregulation of nitrate reductase in juvenile cuttings of *Eucalyptus grandis*, which correlated with increased nitric oxide production and adventitious root formation. **The Plant Journal**, v. 71, n. 5, p. 787–799, 2012.

AGULLÓ-ANTÓN, M. Á. et al. Auxins or Sugars: What Makes the Difference in the Adventitious Rooting of Stored Carnation Cuttings? **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 1, p. 100–113, 2011.

AMRI, E. et al. Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): Effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. **New Forests**, v. 39, n. 2, p. 183–194, 2010.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 40 ed. Washington, 1984.

ASLMOSHTAGHI, E.; REZA-SHAHSAVAR, A. Endogenous soluble sugars, starch contents and phenolic compounds in easy and difficult to root olive cuttings. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 4, n. 11, p. 83–86, 2010.

BADILLA, Y. et al. IBA efficiency on mini-cutting rooting from Teak (*Tectona grandis* Linn F.) clones. **Revista Árvore**, v. 40, n. 3, p. 477–485, 2016.

BORGES, S. R. et al. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 425–434, 2011.

BORTOLINI, M. F. et al. *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: enraizamento, anatomia e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 2, p. 159, 2008.

BRONDANI, G. E. et al. Enraizamento de Miniestacas de erva-Mate sob Diferentes Ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 57, p. 29–38, 2008.

BRONDANI, G. E. et al. Miniestacas de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (II) Sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estação do ano. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 3, p. 453–465, 2010.

CORRÊA, L. D. R. et al. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 1, p. 63–73, 2005.

COSTA, C. T. et al. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. May, p. 133, 2013.

CUNHA, A. C. M. C. et al. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de Eucalipto. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 607–615, 2009.

DANTAS, Â. K. et al. Rooting of minicuttings of *Castanea sativa* Mill. hybrid clones. **Revista Árvore**, v. 40, n. 3, p. 465–475, 2016.

DENAXA, N. K.; VEMMOS, S. N.; ROUSSOS, P. A. The role of endogenous carbohydrates and seasonal variation in rooting ability of cuttings of an easy and a hard to root olive cultivars (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 143, p. 19–28, 2012.

DHILLON, R. S. et al. Effects of auxins and thiamine on the efficacy of techniques of clonal propagation in *Jatropha curcas* L. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1502–1510, 2011.

DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453–462, 2012.

DUBOIS M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 350–356, 1956.

FACHINELLO, J. C. et al. Propagação de plantas frutíferas. Brasília: EMBRAPA informações tecnológica, 2005.

FERRIANI, A. P. et al. Estaquia e anatomia de vassourão-branco. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 2, p. 159–166, 2008.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Agro@ambiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 102–109, 2010.

FRANKLIN, K. A. et al. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20231–20235, 2011.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. DE A. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica IPEF**, v. 192, p. 1–14, 2000.

HORNITSCHKEK, P. et al. Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. **Plant Journal**, v. 71, n. 5, p. 699–711, 2012.

HUSEN, A. Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. **New Forests**, v. 36, n. 1, p. 13–27, 2008.

HUSEN, A.; PAL, M. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings

in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **New Forests**, v. 31, n. 1, p. 57–73, 2006.

HUSEN, A.; PAL, M. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests**, v. 33, n. 3, p. 309–323, 2007.

KANG, J. et al. The type, position and age effect on the cutting reproduction of *Picea crassifolia* and its rooting mechanism in the Qilian Mountains. **Journal of Forestry Research**, v. 26, n. 4, p. 993–1002, 2015.

KELEN, M. et al. Separation of abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and rose oil (*Rosa damascena* Mill.) by reversed phase liquid chromatography. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 603–610, 2004.

KIBBLER, H.; JOHNSTON, M. E.; WILLIAMS, R. R. Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell: 2. Seasonal influences of temperature, rainfall, flowering and auxins on the stock plant. **Scientia Horticulturae**, v. 102, n. 3, p. 343–358, 2004.

LATTUADA, D. S.; SPIER, M.; DE SOUZA, P. V. D. Pre-treatments with water and indole butyric acid dosis for herbaceous cuttings of Surinam cherry. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 12, p. 2073–2079, 2011.

LI, S. W. et al. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009.

LJUNG, K. et al. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 2, p. 309–332, 2002.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2–3, p. 219–230, 2000.

MAJADA, J. et al. Mini-cuttings: An effective technique for the propagation of *Pinus pinaster* Ait. **New Forests**, v. 41, n. 3, p. 399–412, 2011.

MARTÍNEZ-ALONSO, C. et al. Optimization of seasonality and mother plant nutrition for vegetative propagation of *Pinus pinaster* Ait. **New Forests**, v. 43, n. 5–6, p. 651–663, 2012.

MAURIAT, M. et al. Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and *Arabidopsis* by affecting auxin transport. **The Plant Cell**, v. 78, p. 372–384, 2014.

MONCALEÁN, P.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, B. Plant growth regulators as putative physiological markers of developmental stage in *Prunus persica*. **Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 1, p. 27–29, 2002.

NEVES, T. D. S. et al. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1699–1705, 2006.

OSTERC, G.; PETKOVŠEK, M. M.; STAMPAR, F. Quantification of IAA Metabolites in the Early Stages of Adventitious Rooting Might Be Predictive for Subsequent Differences in Rooting Response. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 2, p. 534–542, 2016.

PACURAR, D. I.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 1, p. 83–96, 2014.

PEER, W. A. et al. Seven things we think we know about auxin transport. **Molecular Plant**, v. 4, n. 3, p. 487–504, 2011.

PIZZATTO, M. et al. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. **Revista Ceres**, v. 58, n. 4, p. 487–492, ago. 2011.

PORFÍRIO, S. et al. Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 207–226, 2016a.

PORFÍRIO, S. et al. Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 204, p. 41–53, 2016b.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Effect of auxin and cultivation conditions in in vitro rooting of root-stock of apple “M-9”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 624–628, 2002.

RAGONEZI, C. et al. Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors. **Trees - Structure and Function**, v. 24, n. 6, p. 975–992, 2010.

SAIRANEN, I. et al. Soluble Carbohydrates Regulate Auxin Biosynthesis via PIF Proteins in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, n. 12, p. 4907–4916, 2012.

SHIMAKURA, S.E. Correlação. In: **CE003 - Estatística II**. Paraná: Dep. de Estatística da Universidade Federal do Paraná: 71-78p. 2006.

SORIN, C. et al. Proteomic analysis of different mutant genotypes of *Arabidopsis* Led to the Identification of 11 Proteins Correlating with adventitious root development. **Plant Physiology**, v. 140, n. 1, p. 349–364, 2006.

SOUZA, C. C. et al. Padrões de miniestacas e sazonalidade na produção de mudas clonais de *Eucalyptus grandis* Hill X *E. urophylla* S. T. Black. **Revista Árvore**, v. 37, n. 1, p. 67–77, fev. 2013.

- SOUZA, E. R. et al. Conteúdo de carboidratos em estacas de videira do porta-enxerto cv . IAC 572. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v. 8, n. 2, p. 7–15, 2015.
- STASWICK, P. E. et al. Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. **The Plant cell**, v. 17, n. February, p. 616–27, 2005.
- STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The Physiology of Adventitious Roots 1. **Plant Physiology**, v. 170, p. 603–617, 2016.
- TAKAHASHI, F. et al. Sugar-induced adventitious roots in Arabidopsis seedlings. **Journal of plant research**, v. 116, n. 2, p. 83–91, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 5ªed, Artmed, Porto Alegre, 954p, 2013.
- THOMAS, P.; LEE, M. M.; SCHIEFELBEIN, J. Molecular identification of proline-rich protein genes induced during root formation in grape (*Vitis vinifera* L.) stem cuttings. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 9, p. 1497–1504, 2003.
- TONON, G.; KEVERS, C.; GASPAR, T. Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during in vitro rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. **Tree physiology**, v. 21, n. 10, p. 655–663, 2001.
- TSIPOURIDIS, C.; THOMIDIS, T.; BLADENOPOULOU, S. Rhizogenesis of GF677, Early Crest, May Crest and Arm King stem cuttings during the year in relation to carbohydrate and natural hormone content. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 200–204, 2006.
- URQUHART, S.; FOO, E.; REID, J. B. The role of strigolactones in photomorphogenesis of pea is limited to adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 153, n. 3, p. 392–402, 2015.
- WANG, L.; RUAN, Y. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. May, p. 1–9, 2013.
- WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 289–292, 2007.
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: Reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 473–486, 2014a.
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-Part I: Concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 449–471, 2014b.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: Regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, n. 5, p. 707–735, 2005.

YAN, S. P. et al. Effect of auxins and associated metabolic changes on cuttings of hybrid aspen. **Forests**, v. 8, n. 4, 2017.

ZHANG, W. et al. The effects of exogenous hormones on rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem cuttings. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–14, 2017a.

ZHANG, W. et al. Mechanisms underlying the regulation of root formation in *Malus hupehensis* stem cuttings by using exogenous hormones. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 1, p. 174–185, 2017b.

## 5 CAPÍTULO III. *Ilex paraguariensis*: PADRÕES DE MINIESTACAS X DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS E ANATÔMICAS

### RESUMO

A fim de otimizar o protocolo de miniestaquia de erva-mate, o presente estudo buscou avaliar a capacidade rizogênica de padrões de miniestacas, oriundas de distintos materiais genéticos, e relacioná-la com a composição bioquímica e com as características anatômicas dos propágulos. Foram confeccionados dois padrões de miniestacas, coletados das porções apical e basal de brotações de minicepas de quatro clones (A3, A7, F1 e F2) de erva-mate. Após 90 dias em casa de vegetação foram avaliadas as porcentagens de enraizamento, sobrevivência, mortalidade, calogênese, retenção foliar e, número e comprimento das raízes/miniestaca. Antes e após a permanência dos propágulos por 90 dias no ambiente de enraizamento, foram coletadas amostras para realização das análises anatômicas e determinação da atividade das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e de compostos fenólicos (CF). Os quatro clones e os dois padrões de miniestacas apresentaram o mesmo comportamento rizogênico (em média 42,7% de enraizamento), resultado associado às características anatômicas idênticas dos propágulos. A composição bioquímica variou entre os tipos de miniestacas, onde a miniestaca apical apresentou a maior atividade de POD ( $4923,16 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), PPO ( $1835,35 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) e de CF ( $35,29 \text{ mg EAG L}^{-1}$ ), em relação a miniestaca basal. Contudo não houve correlação significativa dos compostos bioquímicos com o enraizamento. Os propágulos vegetativos não apresentaram diferenças anatômicas e, foi observado a presença de anel de esclerênquima circundando o sistema vascular. Os dois padrões de miniestacas estudados são indicados para propagação via miniestaquia, sendo que a capacidade rizogênica de ambos é similar. Os propágulos vegetativos não apresentam diferenças anatômicas e, são inexistentes estruturas que impeçam a emergência radicial. A formação adventícia de raízes ocorre a partir do câmbio vascular e independe da formação de calos. A atividade POD, PPO e CF não está diretamente associada a indução de raízes adventícias e, o teor destes compostos depende do tipo de propágulo e do material genético utilizado.

**Palavras chaves:** Erva-mate. Polifenoloxidase. Enzimas. Peroxidase. Compostos Fenólicos.

## ***Ilex paraguariensis*: PATTERNS OF MINI-CUTTINGS X BIOCHEMICAL AND ANATOMICAL DETERMINATIONS**

### **ABSTRACT**

In order to optimize the protocol for mini-cuttings technique of yerba mate, the present study evaluated the rhizogenic capacity of mini-cuttings from different patterns genetic materials and, relate it to the biochemical composition and anatomical characteristics of the propagules. Two patterns of mini-cuttings were collected from the apical and basal portions of ministumps of four clones (A3, A7, F1 and F2) selected from yerba mate. After 90 days in greenhouse, the percentages of rooting, survival, mortality, calogenesis, leaf retention and number and length of roots/minicutting were evaluated. At the time of installation and evaluation of the experiment, samples were collected to perform the anatomical analysis and determination of the activity of the enzymes peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO) and phenolic compounds (CF). The four clones and the two patterns of mini-cuttings had the same rhizogenic capacity (mean 42.7% rooting), a result associated with the identical anatomical characteristics of the propagules. The biochemical composition varied between types of mini-cuttings, where the apicals showed the highest POD activity ( $4923.16 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), PPO ( $1835.35 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) and CF ( $35.29 \text{ mg EAG L}^{-1}$ ), relative to basal mini-cutting. However, there was no significant correlation of biochemical compounds with rooting. The vegetative propagules did not present anatomical differences and the sclerenchyma ring was observed surrounding the vascular system. The two patterns of mini-cuttings studied are indicated for propagation through minicuttings technique, and the rhizogenic capacity of both is identical. The vegetative propagules do not present anatomical differences and there are nonexistent structures that preclude radicial emergence. The adventitious formation of roots occurs from the vascular cambium and is independent of callus formation. The POD, PPO and CF activity is not directly associated with adventitious root induction, and the content of these compounds depends on the type of propagule and the genetic material used.

**Keywords:** Yerba mate. Polyphenoloxidase. Enzymes. Peroxidases. Phenolics Compounds.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa vem sendo amplamente utilizada na produção de mudas, permitindo a formação de plantios homogêneos e produtivos por meio da clonagem de genótipos selecionados. Além disso, possibilita a multiplicação de espécies que apresentam alguma restrição na reprodução seminal (DIAS et al., 2012), como é o caso da erva-mate que possui baixa (inferior a 20%) e desuniforme taxa de germinação (CARVALHO, 1994; FOWLER; STURION, 2000).

Um dos fatores cruciais na propagação vegetativa é a formação de raízes adventícias. Este processo pode ser dividido em três fases sucessivas e interdependentes: indução, iniciação e expressão (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014), nas quais estão associadas alterações metabólicas que incluem a ação enzimática, hormonal e de outros compostos bioquímicos que atuam como indutores do enraizamento.

As peroxidases (POD) e polifenoloxidasas (PPO) são enzimas antioxidantes envolvidas nas diferentes fases do processo rizogênico (HATZILAZAROU et al., 2006; ZHANG et al., 2017), sendo apontadas como marcadores bioquímicos do enraizamento (CHENIANY et al., 2010). As POD catalisam a oxidação de diversos compostos orgânicos (LI et al., 2009) e atuam principalmente na regulação hormonal, mantendo os níveis adequados de ácido indol acético (IAA) nas diferentes fases do enraizamento (CHENIANY et al., 2010). As PPO atuam na divisão e diferenciação celular (ÇOBAN, 2007), estão envolvidas na regulação da síntese de precursores necessários para biossíntese de lignina (HAISSIG, 1986 citado por CHENIANY et al., 2010) e, catalisam a oxidação dos compostos fenólicos (CF) (MACEDO et al., 2013). Os CF são um dos grupos de metabólitos secundários mais abundantes e apontados como cofatores do enraizamento por induzir a síntese (ŠTEFANČIČ et al., 2007) e impedir a degradação de auxinas endógenas (HARTMANN et al., 2011; SHIOZAKI et al. 2013).

Outro fator que afeta a formação de raízes adventícias é a posição do ramo em que o propágulo é coletado (AMRI et al., 2010). A influência posicional no crescimento ou desenvolvimento de explantes é denominada topófise (GEORGE 1993; MITCHELL et al. 2004). Explantes oriundos de diferentes porções do mesmo

ramo podem apresentar variações na capacidade rizogênica (FACHINELLO et al., 2005; PARK et al., 2011) em parte, devido a variação nas características anatômicas (WENDLING; BROOKS; TRUEMAN, 2015). Estas, podem limitar a formação de raízes adventícias, principalmente em propágulos oriundos das porções basais, devido a presença de tecidos (e.g. esclerênquima, lignina, fibras e braquiesclereídes) que atuam como barreira mecânica para emissão dos primórdios radiciais (LIMA et al., 2011; WENDLING; WARBURTON; TRUEMAN, 2015). Em geral, propágulos provenientes das porções apicais do ramo, que em geral são mais herbáceas, apresentam maior facilidade ao enraizamento, em relação aqueles das porções basais, pelo fato de não apresentarem barreiras estruturais para emergência das raízes (HARTMANN et al., 2011).

A identificação do propágulo vegetativo com maior capacidade rizogênica, bem como o conhecimento de eventos bioquímicos e morfológicos associados à indução e formação de raízes adventícias, podem beneficiar o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação. Desta forma, esse estudo tem como objetivos avaliar o enraizamento adventício de dois padrões de miniestacas provenientes de quatro genótipos de erva-mate, e relacionar a rizogênese com os níveis de POD, PPO e CF, bem como analisar as características anatômicas das miniestacas utilizadas.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Origem e manutenção do minijardim clonal**

As minicepas utilizadas como fonte de propágulos foram estabelecidas a partir de mudas propagadas pelo método de estaquia convencional, provenientes de quatro clones de erva-mate, sendo A3 e A7 plantas matrizes de 12 anos de idade, fêmea e macho, respectivamente, oriundas de Ponta Grossa-PR e, F1 e F2 árvores fêmeas de mais de 80 anos de idade oriundas de São Mateus do Sul-PR.

As minicepas foram mantidas em estufa, sob sistema semi-hidropônico tipo canaletão com areia lavada, pertencente ao Laboratório de Propagação de Espécies Florestais da Embrapa Florestas, situada em Colombo-PR (25°20' S e 49° 14'W, 950 m). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é temperado do tipo Cfb.

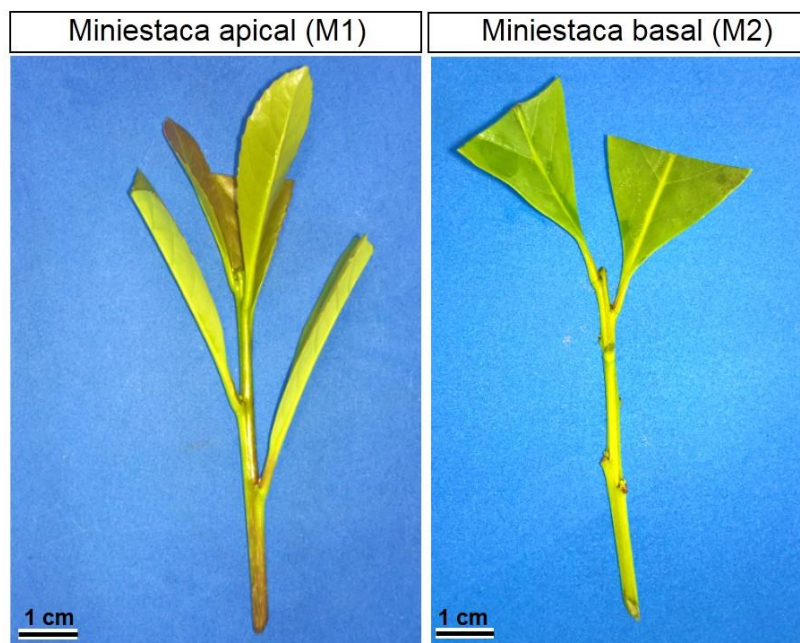
As minicepas receberam solução nutritiva conforme recomendações de Wendling et al. (2007), distribuída via gotejamento três vezes ao dia, a uma vazão total de 5 L m<sup>-2</sup>.

### 5.2.2 Coleta das brotações e confecção dos propágulos

As brotações foram colhidas das minicepas em janeiro de 2017 utilizando tesoura de poda, previamente esterilizada em álcool (70% v v<sup>-1</sup>) e armazenadas em caixas de isopor contendo água para evitar o estresse hídrico e manter a turgescência do material vegetal, até a confecção dos propágulos vegetativos.

As miniestacas foram confeccionadas seguindo dois padrões: M1 – miniestaca coletada da porção superior da brotação, contendo a ponteira (gema apical) e um par de folhas na porção apical com área foliar reduzida em 50% e, M2 – miniestaca coletada da porção basal da brotação, confeccionadas com um par de folhas com área foliar reduzida em 50% e corte reto na porção apical (Figura 13). Ambas as miniestacas foram confeccionadas com comprimento médio de 6 cm ( $\pm 1$  cm) e corte em bisel na porção basal do caule.

FIGURA 13 - PADRÕES DE MINIESTACAS DE ERVA-MATE UTILIZADAS: MINIESTACA APICAL (M1) E BASAL (M2).



FONTE: A autora (2017).

### 5.2.3 Miniestaquia

Após a coleta e confecção, as miniestacas foram plantadas em tubetes de polipropileno (55 cm<sup>3</sup>) com substrato comercial Tropstato Florestal®, a base de fibra de coco, vermiculita, carvão vegetal e casca de pinus em proporções não relatadas pelo fabricante e, mantidas em casa de vegetação climatizada (80% de umidade relativa e temperatura de 20 a 30<sup>0</sup> C). Após 90 dias no ambiente de enraizamento foram avaliadas a porcentagem de enraizamento (miniestacas com raiz de no mínimo 1 mm de comprimento); número de raízes/miniestaca; comprimento médio das três maiores raízes/miniestaca; porcentagem calogênese (miniestacas vivas, sem raiz e que apresentavam na porção basal a formação de massa indiferenciada de células); porcentagem de sobrevivência (miniestacas vivas, sem raiz ou calos); porcentagem de mortalidade (miniestacas necrosadas); número de brotações desenvolvidas/miniestaca e porcentagem de retenção foliar (miniestacas que mantiveram as folhas originais ao longo do período de enraizamento).

### 5.2.4 Análises bioquímicas

#### 5.2.4.1 Condições de transporte e armazenamento

No momento da instalação do experimento (T<sub>0</sub>) e após 90 dias no ambiente de enraizamento (T<sub>90</sub>) amostras das miniestacas foram coletadas, inseridas em sacos de papel Kraft e transportadas em caixa de isopor contendo gelo para posteriores análises no Laboratório de Tecnologia de Produtos não Madeiráveis da Embrapa Florestas (Colombo-PR).

#### 5.2.4.2 Determinação dos compostos fenólicos (CF)

A determinação dos CF foi realizada segundo o Procedimento Operacional Padrão da Embrapa Florestas e a metodologia (com adaptações) descrita por Frizon et al. (2015). As miniestacas (cerca de 24 miniestacas/tratamento) foram secas em micro-ondas (BMF45 Ative - Brastemp) na potência média de 3 a 4 minutos,

revolvendo manualmente o material em intervalos regulares de 30 segundos para garantir a secagem homogênea (HANSEL et al., 2008). As amostras foram trituradas em moinho de facas (A11 basic - IKA), acondicionadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da análise.

As amostras (0,5 g) foram homogeneizadas em 50 mL de etanol 50% e mantidas sob agitação por 30 minutos em banho de ultrassom (Ultracleaner 1400 A – Unique). O extrato foi filtrado utilizando papel de filtração rápida (10 x 10 cm) (Unifil) e adicionado etanol 50% até completar 100 mL de solução. Em uma alíquota de 100 µL desta solução, acrescentou-se 500 µL do reagente Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich) e 5 mL de água destilada. Após agitação em vórtex por um minuto foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 15%. Novamente agitou-se a solução em vórtex por 30 segundos e, por fim, a solução teve seu volume completado para 10 mL com água destilada. O controle negativo incluiu o meio de reação com todos os reagentes, apenas substituindo-se o extrato vegetal por etanol 50%.

As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz por 2 h, seguida da mensuração das absorbâncias a 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800). O teor de fenóis totais foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras com a curva padrão de ácido gálico (1 a 10 mg L<sup>-1</sup>) e expresso em mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de amostra vegetal úmida.

#### 5.2.4.3 Determinação de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO)

A quantificação de POD foi determinada de acordo com a técnica descrita por Matsuno e Uritani (1972) e, de PPO por Ponting e Joslyn (1948), ambas seguindo as modificações recomendadas por Campos e Silveira (2003). As miniestacas foram trituradas em triturador de facas (A11 basic - IKA) com nitrogênio líquido, pesadas (0,5 g) e maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0) e 1 mg de polivinilpirrolidona (PVP40 Sigma-Aldrich).

O homogeneizado foi filtrado em papel de filtração rápida (Unifil), centrifugado a 4000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático. Toda vidraria utilizada foi previamente resfriada por no mínimo 4 horas a -20° C.

Para análise da atividade de POD foram colocados em um tubo de ensaio: 2,5

mL de tampão fosfato-citrato (pH 5,0), 1,5 mL de extrato enzimático e 0,25 mL de guaiacol 0,5% (Sigma-Aldrich). Após a homogeneização em vórtex durante 15 segundos foram adicionados 0,25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, seguido de nova agitação em vórtex. Após incubação a 30°C por 15 minutos, a solução foi transferida para um banho de gelo e adicionado 0,25 mL de metabissulfito de sódio a 2% (Merck). Após homogeneização em vórtex, a solução foi mantida em repouso por 10 minutos e as absorbâncias registradas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800) com comprimento de onda de 450 nm. Para o cálculo da atividade enzimática considerou-se como uma unidade de enzima (UE) correspondente a um aumento na absorbância de 0,001 unidade ótica/minuto. O controle negativo incluiu o meio de reação com todos os reagentes, apenas substituindo-se o extrato vegetal por água destilada.

Para análise da atividade de PPO, foram inseridos em um tubo de ensaio: 3,6 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0), 1 mL de extrato enzimático, 0,1 mL de catecol (Sigma-Aldrich). Após agitação em vórtex por 15 segundos, a solução foi incubada em banho-maria a 30° C por 30 minutos e transferida para um banho de gelo. Em seguida foram adicionados 0,2 mL de ácido perclórico 1,4% (BIOTEC), agitados em vórtex por 15 segundos e mantidos em repouso por 10 minutos. As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro, (Shimadzu, UV-1800) com comprimento de onda de 395 nm. Para o cálculo da atividade enzimática considerou-se como uma unidade de enzima (UE) correspondente a um aumento na absorbância de 0,001 unidade ótica/minuto. O controle negativo incluiu o meio de reação com todos os reagentes, apenas substituindo-se o extrato vegetal por água destilada.

#### 5.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Para avaliar o efeito dos tipos de miniestacas e genótipos no processo rizogênico de miniestacas de erva-mate, o experimento foi conduzido sob delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (dois padrões de miniestacas x quatro clones) com quatro repetições e 15 miniestacas por unidade experimental. A análise dos compostos bioquímicos foi realizada separadamente nos tempos T<sub>0</sub> e T<sub>90</sub>, seguindo delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (dois padrões de miniestacas x

quatro clones) com três repetições de oito miniestacas, sendo cada repetição constituída pela média de uma triplicata.

As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias se mostraram homogêneas foram submetidas à análise de variância e as que apresentaram diferenças significativas pelo teste de F tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A fim de correlacionar as variáveis analisadas na miniestaquia e os compostos bioquímicos foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ). Para a análise de variância e de correlação de Pearson foi utilizado o programa estatístico Assistat versão 7.7.

#### 5.2.6 Análises anatômicas

Amostras da base das miniestacas (cerca de 3 cm de comprimento) dos dois padrões de miniestacas e dos quatro clones foram coletadas em  $T_0$  e  $T_{90}$ , fixadas em FAA70 (formaldeído, ácido acético e etanol 70%) por 24 horas (JOHANSEN, 1940) e conservadas em etanol 70% até o início das atividades no Laboratório de Botânica Estrutural - Departamento de Botânica, pertencente a UFPR, Curitiba-PR.

As amostras foram seccionadas em fragmentos de 1 cm e infiltradas em blocos de PEG (polietilenoglicol 1500 - Dinâmica). Os blocos foram fixados em suportes de madeira (2 x 2 cm), acondicionados em geladeira por 24 horas e, seccionados em micrótomo rotatório (Olympus CUT 4055) com espessura de 15  $\mu\text{M}$ .

Os cortes foram submetidos a testes histoquímicos com lugol, para identificação de grãos de amido e, sudam III para identificação de lipídeos (JOHANSEN, 1940). Parte dos cortes obtidos também foi corado com azul de toluidina (0,5%) para caracterização estrutural. Após, foram confeccionadas lâminas semi-permanentes com a utilização de gelatina-glicerinada e posterior vedação com esmalte incolor. As observações e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss com câmera digital Sony Cyber-shot P72 acoplada.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Miniestaquia

De acordo com a análise de variância, não houve interação significativa dos fatores padrões de miniestacas e clones. Os padrões de miniestacas apresentaram resultados significativamente idêntico em todas as variáveis analisadas. Os clones exibiram efeito significativo sobre a porcentagem de enraizamento, sobrevivência e número de brotações desenvolvidas (Tabela 5).

O clone A3 apresentou o maior enraizamento médio (65,6%), não diferindo estatisticamente de F1 que obteve em média 48,7% de miniestacas enraizadas (Tabela 6). Já F2 foi o clone com menor capacidade rizogênica, com menos de 25% de miniestacas enraizadas.

Quanto ao número de brotações desenvolvidas, o clone A7 foi superior aos demais com 1,8 brotos/miniestaca em média, diferindo estatisticamente do clone F2 (1,2 brotos/miniestaca). Os dois tipos de miniestacas apresentaram o mesmo valor de brotos desenvolvidos (1,5) (Tabela 6).

Com relação a retenção foliar, 88,7% das miniestacas mantiveram as folhas originais retidas durante a permanência no ambiente de enraizamento, independente do padrão de miniestaca e do clone (Tabela 6).

Quanto a calogênese, o clone F2 apresentou a maior porcentagem de miniestacas com calos (42,2%), porém, este valor foi estatisticamente idêntico aos outros materiais genéticos. Os dois tipos de miniestacas demonstraram a mesma resposta quanto ao desenvolvimento de calos (em média 37,4%) (Tabela 6).

Os índices de mortalidade foram inferiores a 5%, independente do clone e do tipo de miniestaca. A respeito da sobrevivência, F2, A7 foram significativamente superiores aos demais clones (28,1% e 25,6%, respectivamente) e, considerando os padrões de miniestacas, ambas apresentaram valores inferiores a 20% de sobrevivência, uma vez que essa variável é a diferença entre miniestacas enraizadas, mortas e com calos (Tabela 6).

TABELA 5 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES/MINIESTACA (CMR), NÚMERO DE BROTAÇÕES DESENVOLVIDAS (NBD), PORCENTAGEM DE RETENÇÃO FOLIAR (RF), CALOGÊNESE (C), MORTALIDADE (M) E SOBREVIVÊNCIA (S) EM DOIS PADRÕES DE MINIESTACAS PROVENIENTES DE QUATRO CLONES DE *Ilex paraguariensis*.

Fator de Variação	GL	Quadrado Médio							
		E	NR	CMR	NBD	RF	C	M	S
Clone (C)	3	2374,05**	227,96 <sup>ns</sup>	0,79 <sup>ns</sup>	0,51*	70,35 <sup>ns</sup>	198,11 <sup>ns</sup>	38,22 <sup>ns</sup>	930,90*
Padrão de Miniestacas (PM)	1	310,69 <sup>ns</sup>	4,26 <sup>ns</sup>	0,52 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	26,58 <sup>ns</sup>	187,70 <sup>ns</sup>	20,86 <sup>ns</sup>	125,35 <sup>ns</sup>
C * PM	3	174,57 <sup>ns</sup>	1,87 <sup>ns</sup>	1,03 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	93,50 <sup>ns</sup>	526,82 <sup>ns</sup>	71,20 <sup>ns</sup>	241,09 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	184,44	2,50	0,62	0,13	84,27	254,25	42,12	221,99
Total	31								
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		30,50	53,44	63,15	24,20	10,35	42,61	90,43	84,64

\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ). \*\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ). <sup>ns</sup> Não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES/MINIESTACA EM cm (CMR), NÚMERO DE BROTAÇÕES DESENVOLVIDAS (NBD), PORCENTAGEM DE RETENÇÃO FOLIAR (RF), CALOGÊNESE (C), MORTALIDADE (M) E SOBREVIVÊNCIA (S) EM DOIS PADRÕES DE MINIESTACAS PROVENIENTES DE QUATRO CLONES DE *Ilex paraguariensis*\*

Clone	E (%)			NR			CMR (cm)			NBD			RF (%)			C (%)			M (%)			S (%)		
	M1	M2	Média	M1	M2	Média	M1	M2	Média	M1	M2	Média	M1	M2	Média	M1	M2	Média	M1	M2	Média	M1	M2	Média
A3	70,8	60,4	65,6a	3,3	3,9	3,6a	0,9	2,0	1,5a	1,3	1,5	1,4ab	90,6	93,8	92,2a	47,9	29,2	38,5a	0,0	0,0	0,0a	8,3	10,4	9,4b
A7	43,3	35,4	39,4bc	2,9	2,2	2,6a	0,7	1,0	0,8a	1,9	1,7	1,8a	85,9	89,6	87,8a	21,3	39,6	30,4a	7,1	2,1	4,6a	28,3	22,9	25,6a
F1	55,6	41,7	48,7ab	3,8	2,6	3,2a	1,3	1,7	1,5a	1,6	1,5	1,5ab	85,4	93,8	89,6a	33,3	43,8	38,5a	2,1	4,2	3,1a	4,2	10,4	7,3b
F2	20,8	28,1	24,5c	3,3	1,7	2,5a	1,5	0,8	1,2a	1,2	1,3	1,2b	89,1	81,3	85,2a	37,5	46,9	42,2a	0,0	9,4	4,7a	37,5	18,8	28,1a
Média	47,6A	41,4A		3,3A	2,6A		1,1A	1,4A		1,5A	1,5A		87,8A	89,6A		35,0A	39,8A		2,3A	3,9A		19,6A	15,6A	

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. M1: Miniestaca apical; M2: Miniestaca basal.

### 5.3.2 Análises bioquímicas

De acordo com a análise de variância houve interação significativa entre o tipo de miniestaca (M1 e M2) e os clones, tanto no momento da instalação do experimento ( $T_0$ ), quanto após 90 dias no ambiente de enraizamento ( $T_{90}$ ) para a atividade POD e, CF apresentou interação apenas em  $T_0$ . O clone apresentou efeito altamente significativo para a atividade PPO em  $T_0$  e, CF apenas em  $T_{90}$ . O padrão de miniestacas apresentou efeito altamente significativo apenas em PPO em  $T_0$  (Tabela 7).

A POD duplicou sua atividade entre os dois períodos analisados, sendo que em  $T_0$ , os clones F2 e A3 foram estatisticamente idênticos e superiores aos demais clones para o padrão de miniestaca M1 (média de  $1424,5 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) (Figura 14A). Porém, em M2, o clone F1 foi estatisticamente superior com  $1714,7 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de POD. Já em  $T_{90}$ , o clone F2 foi novamente superior com média de  $4923,16 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  para o tipo M1. Porém, em M2 as maiores médias ocorreram em F1 ( $4341,34 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), diferindo significativamente de A3 e A7.

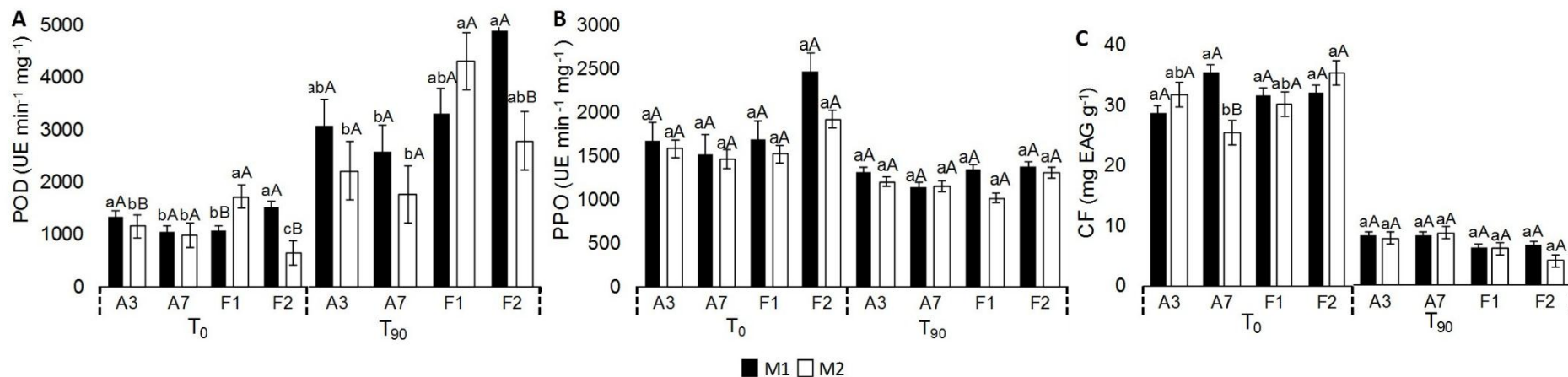
Houve uma redução (média de 27%) na atividade da enzima PPO durante o período em que as miniestacas foram mantidas no ambiente de enraizamento (Figura 14B). Em  $T_0$  os fatores analisados apresentaram efeito independente, onde F2 foi significativamente superior aos demais clones com  $2192,62 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e, M1 ( $1835,35 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) alcançou valor estatisticamente superior a M2 ( $1621,57 \text{ UE min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) (dados não mostrados). Em  $T_{90}$ , tanto os clones, quanto os padrões de miniestacas apresentaram efeito significativamente idêntico.

Observou-se uma redução drástica (média de 77%) na concentração dos compostos fenólicos entre  $T_0$  e  $T_{90}$  (Figura 14C). Em  $T_0$ , houve interação significativa dos fatores analisados e a maior média alcançada foi obtida por M1 no clone A7 ( $35,29 \text{ mg EAG g}^{-1}$ ). Em  $T_{90}$  houve efeito significativo somente dos clones, onde A3 e A7 apresentaram as maiores médias ( $8,08$  e  $8,54 \text{ mg EAG g}^{-1}$ , respectivamente) diferindo de F1 e F2 que apresentaram em média  $5,8 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (dados não mostrados).

TABELA 7 - RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE (POD), POLIFENOLOXIDASE (PPO) E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (CF) EM DOIS PADRÕES DE MINIESTACAS PROVENIENTES DE QUATRO CLONES DE *Ilex paraguariensis* NO MOMENTO DA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO (T<sub>0</sub>) E APÓS 90 DIAS (T<sub>90</sub>).

Fator de Variação	GL	Quadrado Médio					
		T <sub>0</sub>			T <sub>90</sub>		
		POD	PPO	CF	POD	PPO	CF
<b>Clone (C)</b>	3	227646,51**	594566,45**	20,75 <sup>ns</sup>	5710019,12**	57250,17 <sup>ns</sup>	17,45**
<b>Padrão de Miniestacas (PM)</b>	1	102022,54**	274207,27*	12,64 <sup>ns</sup>	3885677,25 <sup>ns</sup>	136184,09 <sup>ns</sup>	4,80 <sup>ns</sup>
<b>C * PM</b>	3	780674,91**	75349,59 <sup>ns</sup>	75,58*	3338064,88*	43305,16 <sup>ns</sup>	3,60 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	24	9817,95	39832,21	24,62	1022833,99	34027,44	1,29
<b>Total</b>	31						
<b>Coefficiente de variação</b>		8,39	11,55	15,91	3,25	14,85	16,09

FIGURA 14 – COMPOSTOS BIOQUÍMICOS EM DOIS PADRÕES DE MINIESTACAS (M1 E M2) PROVENIENTES DE QUATRO CLONES DE *Ilex paraguariensis* NO MOMENTO DA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO (T<sub>0</sub>) E APÓS 90 DIAS (T<sub>90</sub>). A. ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE (POD); B. ATIVIDADE DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE (PPO), C. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (CF)\*.



\*Para cada época de avaliação (T<sub>0</sub> e T<sub>90</sub>, separadamente), médias seguidas por mesma letra minúscula entre clones para o mesmo tipo de miniestaca e, médias seguidas por mesma letra maiúscula entre tipo de miniestaca para o mesmo clone não diferem estatisticamente.

### 5.3.3 Correlação entre os fatores analisados

A maior porcentagem média de enraizamento (65,6%), número de raízes (4 raízes/miniéstaca) e comprimento médio de raízes (1,44 cm/miniéstaca) apresentadas pelo clone A3, coincidiram com uma das menores taxas de POD e PPO (2662,4 e 1268,9 UE min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectivamente) e maior de CF (8,08 mg EAG g<sup>-1</sup>) (Figura 14). Relação inversa foi observada em F2, que apresentou o menor enraizamento (24,5%) e, a maior taxa de POD e PPO (3864,8 e 1349,1 UE min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectivamente) e menor de CF (5,4 mg EAG L<sup>-1</sup>). Contudo, não foram detectadas correlações significativas entre as variáveis E, NR e CMR e os valores médios da atividade da POD, PPO e CF (Tabela 8).

TABELA 8 – RESUMO DA MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PERSON ENTRE A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES/MINIESTACA (CMR), ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE (POD), POLIFENOLOXIDASE (PPO) E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM MINIESTACAS DE *Ilex paraguariensis* NO MOMENTO DA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO (T<sub>0</sub>) E APÓS 90 DIAS (T<sub>90</sub>).

Variável	E	NR	CMR	PDO		PPO		CF	
				T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>
E	1	0,38 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	-0,33 <sup>ns</sup>	-0,56 <sup>ns</sup>	-0,00 <sup>ns</sup>	-0,24 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>
NR		1	0,48 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	0,38 <sup>ns</sup>	0,57 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>
CMR			1	0,52 <sup>ns</sup>	0,39 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	-0,12 <sup>ns</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>	-0,21 <sup>ns</sup>
PDO	T <sub>0</sub>			1	0,71 <sup>ns</sup>	0,15 <sup>ns</sup>	-0,27 <sup>ns</sup>	-0,31 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>
	T <sub>90</sub>				1	0,66 <sup>ns</sup>	0,19 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	-0,39 <sup>ns</sup>
PPO	T <sub>0</sub>					1	0,69 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>	-0,41 <sup>ns</sup>
	T <sub>90</sub>						1	0,19 <sup>ns</sup>	-0,21 <sup>ns</sup>
CF	T <sub>0</sub>							1	-0,53 <sup>ns</sup>
	T <sub>90</sub>								1

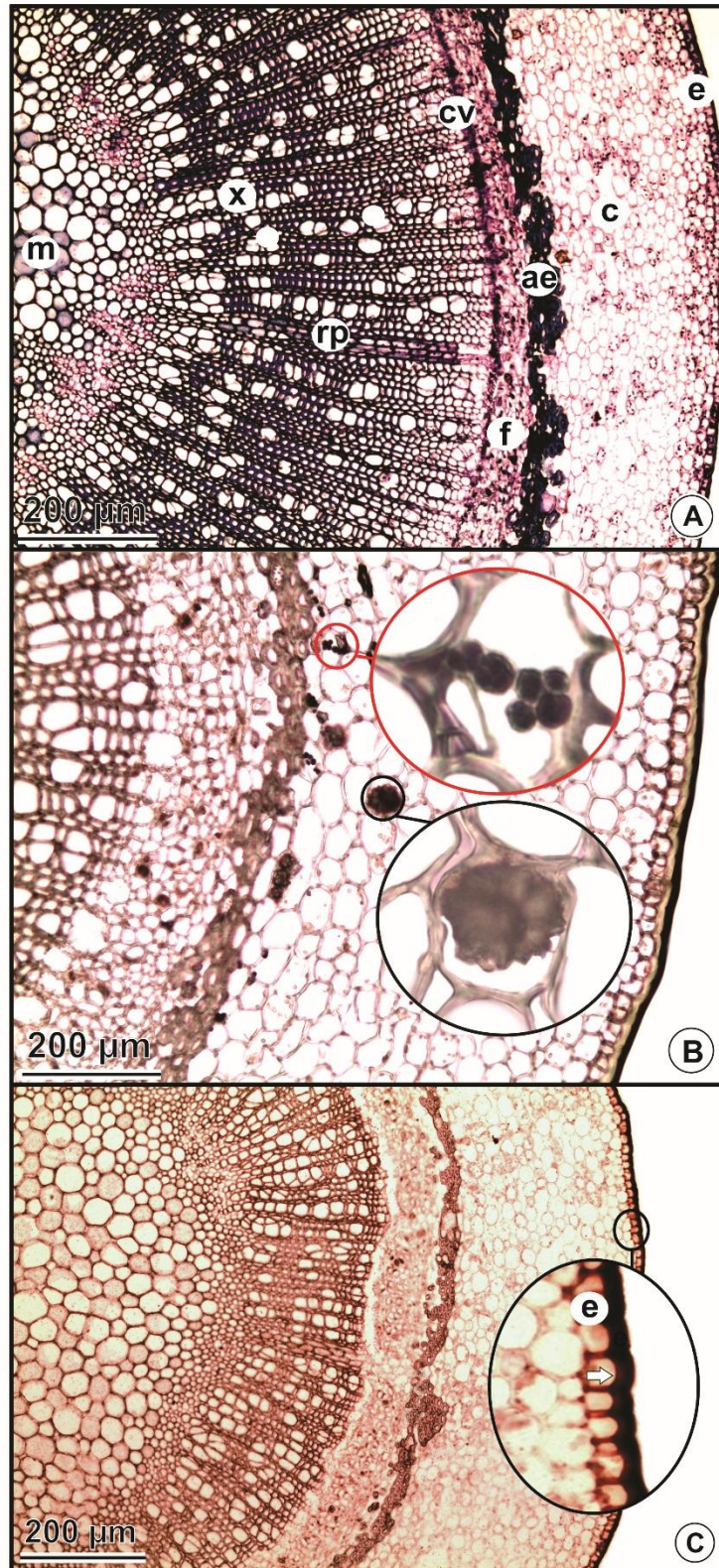
<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

### 5.3.4 Análises anatômicas

Os tipos de miniéstacas analisados apresentaram o mesmo padrão anatômico, não sendo observadas diferenças entre clones e padrões de miniéstacas. As estruturas exibiram crescimento secundário, caracterizado pela formação do xilema e floema secundário a partir do câmbio vascular, este único meristema lateral em atividade. Em T<sub>0</sub>, a medula é formada, exclusivamente, por células parenquimáticas e o sistema vascular é circundado por um anel esclerenquemático (Figura 15A).

No parênquima cortical, poucos grãos de amido foram observados, sendo o caule revestido por epiderme unisseriada, a qual manteve-se intacta, recoberta por cutícula, não havendo indício do surgimento de felogênio (Figura 15B). O teste para lipídeos foi considerado negativo, tendo em vista que estas substâncias graxas não foram visualizadas no interior das células, acumulando-se apenas na cutícula. (Figura 15C).

FIGURA 15 - SEÇÕES TRANSVERSAIS DA BASE CAULINAR DE MINIESTACAS DE ERVA-MATE. **A.** VISÃO GERAL EM T<sub>0</sub>; **B.** DETALHE DOS GRÃOS DE AMIDO (CONTORNO EM VERMELHO) E DRUSA (CONTORNO EM PRETO). **C.** DETALHE DA CUTÍCULA (⇒). **ae**=anel esclerenquimático; **cv**=câmbio vascular; **c**=côrtex; **e**=epiderme; **f**=floema; **m**=medula, **x**=xilema, **rp**=raio parenquimático.

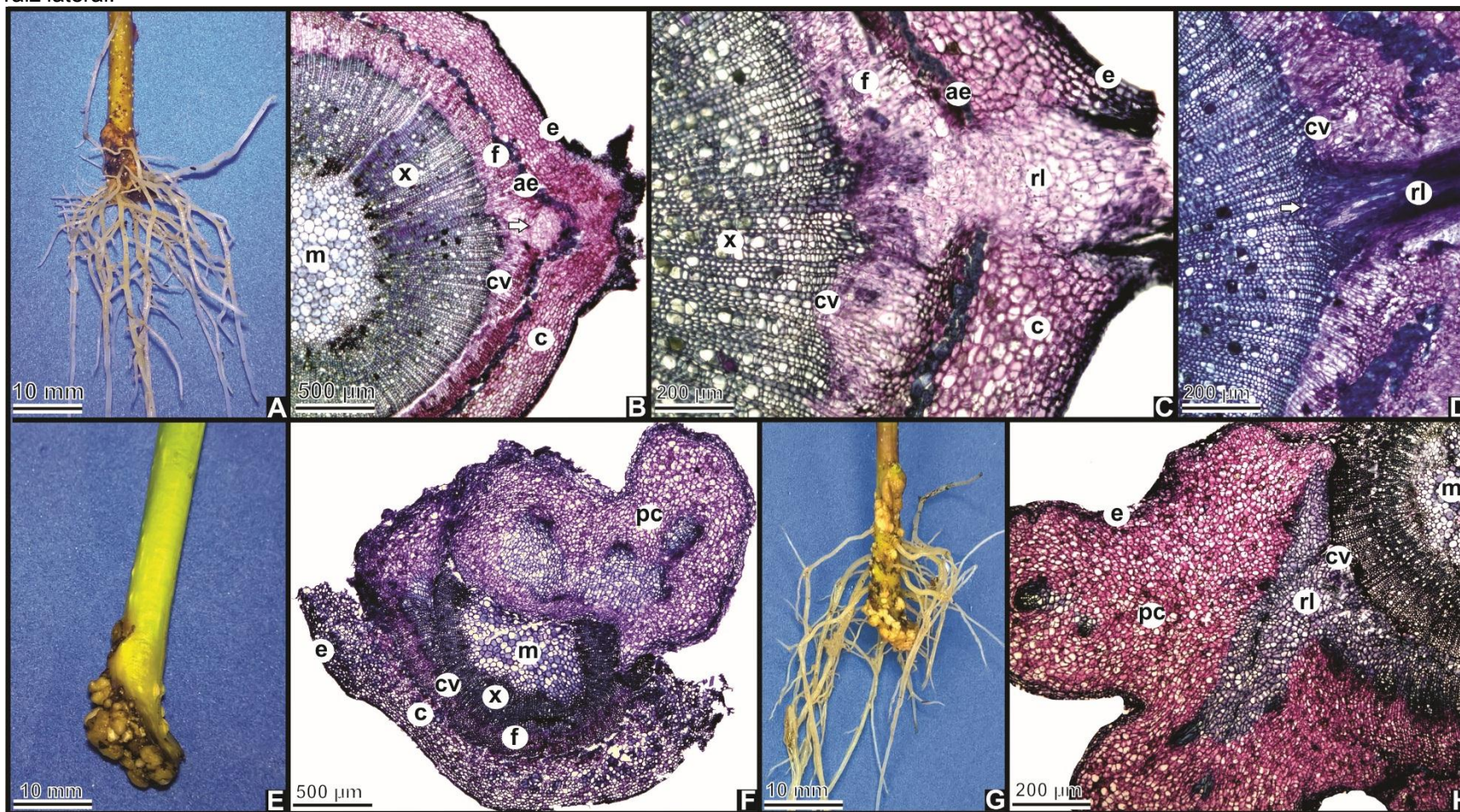


FONTE: A autora (2017).

A estrutura morfoanatômica da região basal de uma miniestaca enraizada em  $T_{90}$  (Figura 16A), também apresentou os três sistemas de tecidos (dérmico, fundamental e vascular) e manteve o anel esclerenquimático assim como em  $T_0$ . Verificou-se que a formação do primórdio radicial ocorreu a partir do câmbio vascular, fato evidenciado pela proliferação de células nesta região que deslocou as estruturas adjacentes para a periferia (Figura 16B), rompendo o anel esclerenquimático (Figura 17C) e, formando conexão com o câmbio vascular do caule (Figura 16D).

Houve a formação de massa celular indiferenciada (calo) na porção basal das miniestacas (Figura 16E e G), sem e com o desenvolvimento do primórdio radicial (Figura 16F e H, respectivamente) próximo à região do câmbio vascular.

FIGURA 16 - BASE CAULINAR E SEÇÕES TRANSVERSAIS DE *Ilex paraguariensis*. **A.** PORÇÃO BASAL DE MINIESTACA ENRAIZADA; **B.** DETALHE DO INÍCIO DA FORMAÇÃO DA RAIZ LATERAL (⇒); **C.** RAIZ LATERAL DESENVOLVIDA; **D.** DETALHE DA CONEXÃO (⇒) DA RAIZ LATERAL (RL) COM O CAULE; **E.** PORÇÃO BASAL DE MINIESTACA COM CALO; **F.** FORMAÇÃO DO CALO PRÓXIMO A MEDULA; **G.** PORÇÃO BASAL DE MINIESTACA ENRAIZADA E COM CALO; **H.** DESENVOLVIMENTO DO PRIMÓDIO RADICIAL A PARTIR DO CÂMBIO VASCULAR E A PROLIFERAÇÃO DE MASSA INDIFERENCIADA DE CÉLULAS. **ae**=anel esclerenquimático; **cv**=câmbio vascular; **c**=côrtex; **e**=epiderme; **f**=floema; **pc**=parênquima cortical; **m**=medula; **x**=xilema; **rl**=raiz lateral.



## 5.4 DISCUSSÃO

A formação de raízes adventícias pode ser variável conforme a porção do ramo em que são colhidos os propágulos (HUSEN; PAL, 2007; ABU-ABIED et al., 2012; DIAS et al., 2015; WENDLING; et al., 2015; ROSA et al., 2017) e com o material genético utilizado (HUSEN, 2004; DANTAS et al., 2016). Contudo, a capacidade rizogênica das miniestacas utilizadas neste estudo foi semelhante, não havendo diferenças significativas entre os padrões de miniestacas de erva-mate.

De forma análoga, miniestacas apicais e nodais de *Handroanthus heptaphyllus* (ipê roxo) também apresentaram resultados semelhantes de enraizamento, em virtude, possivelmente, dos mesmos níveis endógenos de auxina e substâncias de reserva nos dois tipos de propágulos (PIMENTEL et al., 2016). Já para *Eucalyptus globulus*, onde miniestacas apicais apresentaram comportamento superior em relação às miniestacas intermediárias, em todas as características avaliadas (sobrevivência, número de raízes, altura, diâmetro do colo, massa de matéria seca da parte aérea e do sistema radicial), Correia et al. (2015) indicam que este resultado está associado a maior juvenilidade dos propágulos apicais, a qual proporcionou o melhor desenvolvimento do sistema radicial.

No entanto, no caso da erva-mate a semelhança do potencial rizogênico observado entre os padrões de miniestaca (M1 e M2) foi associada às características anatômicas idênticas, tanto em termos estruturais quanto da origem do primórdio radicial e padrão de enraizamento.

Ambos os padrões de miniestaca apresentaram a presença do anel esclerenquimático entre as células do floema e do córtex, o qual não impediu a emissão e desenvolvimento das raízes laterais. Diferentemente do ocorrido com *Maytenus muelleri*, que apresentou limitações para emissão de raízes laterais devido à presença do anel esclerenquimático formado por fibras pericíclicas e braquiesclereídes (LIMA et al., 2011). O anel esclerenquimático observado nas miniestacas de erva-mate não atuou como barreira anatômica à emergência do primórdio radicial. Possivelmente, esta estrutura forneceu sustentação e proteção (JESUS et al., 2010) à estrutura caulinar e sua presença não necessariamente limitou a emissão das raízes.

Não houve relação direta entre a presença de tecidos esclerenquimáticos e a redução da capacidade de enraizamento das miniestacas de erva-mate, visto que os dois padrões de miniestacas apresentaram o mesmo enraizamento adventício e, houve emissão das raízes adventícias apesar da presença do anel de esclerênquima. Desta forma, não houve correlação entre a presença de anel esclerenquimático e a formação de raízes adventícias. Contrariamente, estacas oriundas das porções basais do ramo de *Corymbia torelliana* X *C. citriodora* exibiram um denso anel esclerenquimático e baixo enraizamento (cerca de 60%), em relação àquelas provenientes das regiões apicais, que não apresentaram esclerificação e alcançaram cerca de 80% de enraizamento (WENDLING; BROOKS; TRUEMAN, 2015).

A origem de raízes adventícias é variada e provém da rediferenciação de vários tecidos celulares (tecidos subepidérmicos, do córtex, do câmbio, do floema secundário, do periciclo ou dos feixes vasculares) (MACEDO et al., 2013). No caso da erva-mate, a formação dos primórdios radiciais ocorreu a partir da região do câmbio vascular, assim como em outras espécies florestais como *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone H1) (GOULART et al., 2014), *Corymbia torelliana* e *Eucalyptus camaldulensis* (BRYANT; TRUEMAN, 2015), *Piptocarpha angustifolia* (FERRIANI et al., 2008) e *Maytenus muelleri* (LIMA et al., 2011).

A formação de raízes adventícias exhibe dois padrões de desenvolvimento: o direto, no qual a formação da raiz ocorre a partir dos tecidos caulinares como em *Pereskia aculeata* (ZEM et al., 2015), *Corymbia torelliana* e *Eucalyptuscamaldulensis* (BRYANT; TRUEMAN, 2015); e o indireto, onde a emissão das raízes adventícias é antecedida por uma etapa intermediária, na qual ocorre a formação de massa irregular de células parenquimáticas em diferentes estádios de lignificação (HARTMANN et al., 2011). A maioria (73,4%) das miniestacas enraizadas de erva-mate apresentaram o desenvolvimento de calos, indicando predominantemente rizogênese indireta. A formação de calos pode ser um indicativo de condições ambientais favoráveis ao enraizamento e pode ou não, ocorrer simultaneamente com o desenvolvimento de raízes adventícias (HARTMANN et al., 2011).

Análises anatômicas em miniestacas de *Eucalyptus benthamii* demonstraram que a presença de calos pode comprometer a conexão vascular e influenciar o desenvolvimento da planta (BRONDANI et al., 2012). No entanto, no presente estudo

verificou-se que apesar da formação destes, houve a conexão vascular da miniestaca com a raiz adventícia, comprovando a funcionalidade e capacidade de absorção das mesmas.

Amri et al. (2010) verificaram uma relação positiva entre a calogênese e o enraizamento adventício entre dois tipos de propágulos. Esses autores observaram que as estacas das porções basais de *Dalbergia melanoxylon* apresentaram maior formação de calos (14,3%) e enraizamento (35,9%), em relação àquelas das porções apicais (2,5% de estacas com calos e 15,0% enraizamento). Contudo, esse efeito não foi verificado em erva-mate, tendo em vista que os dois tipos de propágulos, tanto basais quanto apicais, apresentaram o mesmo comportamento em relação à calogênese e enraizamento.

A atividade da enzima POD aumentou consideravelmente durante o enraizamento. Resultado semelhante foi observado em outras espécies florestais como *Juglans regia* (CHENIANY et al., 2010). Em estacas do híbrido *Populus tremula* x *P. tremuloides* verificou-se que a atividade da POD permaneceu praticamente constante durante o período de avaliação do enraizamento (YAN et al., 2017). No entanto, em *Olea europaea* foi verificado que o aumento na atividade da POD coincidiu com mudanças histológicas correspondentes as fases iniciais de formação das raízes e, o declínio da atividade da POD ocorreu na fase de expressão das raízes (MACEDO et al., 2013). Esse resultado não foi observado no presente estudo, haja visto que a maior atividade da POD ocorreu aos 90 dias, período em que as raízes estavam desenvolvidas e visíveis. Ou seja, mesmo com a fase de expressão das raízes, não houve o declínio da atividade da POD.

Diversos estudos relacionam a ação da POD ao enraizamento, pelo fato desta atuar em diferentes processos fisiológicos, tais como lignificação da parede celular (CHRISTENSEN et al., 1998; QUIROGA et al., 2000), organogênese da raiz (CHENIANY et al., 2010) e catabolismo de IAA (LJUNG et al., 2002). A concentração de IAA é variável entre as fases do enraizamento (PORFIRIO et al., 2016) e a concentração requerida na fase de indução pode ser inibitória nas fases subsequentes (CHENIANY et al., 2010). Desta forma, o catabolismo do IAA é obrigatório para evitar a inibição do desenvolvimento das raízes (PORFIRIO et al., 2016). Sendo assim, a POD pode ter apresentado maior atividade durante a emergência radicial em erva-

mate a fim de diminuir a concentração de IAA, para que esta não inviabilizasse a emissão das raízes e, isto justifica o aumento da atividade da POD entre os dois períodos avaliados.

Observou-se uma relação inversa entre a atividade da POD e PPO, onde houve o aumento da atividade da POD e redução da PPO entre os 90 dias de enraizamento. Este efeito também foi observado por outros autores (CHENIANY et al.,2010; MACEDO et al.,2013), possivelmente a redução na atividade da PPO acarreta no acúmulo de compostos monofenólicos que estimulam a atividade da POD (CHENIANY et al.,2010 ).

A redução no teor dos CF foi verificada durante o enraizamento das miniestacas de erva-mate, indicando o possível consumo dos CF durante a formação de raízes adventícias, e este evento pode estar associado ao processo de lignificação. Os composto fenólicos atuam como precursores de monolignóis necessários para biossíntese de lignina (CHENIANY et al., 2010) e este composto, é requerido na formação de raízes adventícias, atuando na gênese da parede celular (HATZILAZAROU et al., 2006).

De maneira geral, os clones A3 e F1 apresentaram taxas de enraizamento satisfatórias (média superior a 50%). Diferentemente de F2 e A7 que exibiram enraizamento médio inferior a 40%, esse fato possivelmente está associado a níveis inadequados de auxina, ao qual pode ser revertido com a aplicação de regulador vegetal.

A composição bioquímica depende do tipo de propágulo e do material genético utilizado na miniestacas de erva-mate. A análise isolada de cada composto (POD, PPO e CF) não apresentou correlação significativa com o enraizamento, porém, isto não indica que estes não afetam a emissão e desenvolvimento radicial. Possivelmente, estes compostos não atuam de forma independente, mas sim de maneira associada.

## **5.5 CONCLUSÕES**

Miniestacas apicais e basais de erva-mate apresentam comportamento rizogênico idêntico, sendo que ambas podem ser utilizadas na propagação vegetativa

via miniestaquia de *Ilex paraguariensis*, principalmente aquelas oriundas dos clones A3 e F1.

A semelhança do enraizamento adventício das miniestacas apicais e basais de erva-mate está associada às características anatômicas idênticas de ambos os propágulos vegetativos.

A formação das raízes adventícias de miniestacas de erva-mate ocorre a partir do câmbio vascular e independe da formação de calos. Apesar da presença de anel esclerenquimático circundando o sistema vascular, esta estrutura não atua como uma barreira anatômica.

O enraizamento adventício de erva-mate não está relacionado diretamente com as concentrações de polifenoloxidasas, peroxidases e compostos fenólicos.

## 5.6 REFERÊNCIAS

ABU-ABIÉD, M. et al. Microarray analysis revealed upregulation of nitrate reductase in juvenile cuttings of *Eucalyptus grandis*, which correlated with increased nitric oxide production and adventitious root formation. **The Plant Journal**, v. 71, n. 5, p. 787–799, 2012.

AMRI, E. et al. Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): Effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. **New Forests**, v. 39, n. 2, p. 183–194, 2010.

BRONDANI, G. E. et al. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 23, n. 4, p. 583–592, 2012.

BRYANT, P. H.; TRUEMAN, S. J. Stem Anatomy and Adventitious Root Formation in Cuttings of *Angophora*, *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 6, p. 1227–1238, 2015.

CAMPOS, Â. D.; SILVEIRA, E. M. D. L. Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas. **Comunicado Técnico - Embrapa**, v. 87, p. 2–4, 2003.

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

CHENIANY, M. et al. Effect of endogenous phenols and some antioxidant enzyme activities on rooting of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **African Journal of Plant Science**, v. 4, n. 12, p. 479–487, 2010.

CHRISTENSEN, J. H. et al. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. **Plant Physiology**, v. 118, n. 1, p. 125–135, 1998.

ÇOBAN, H. Determination of Polyphenol Oxidase Activity during Rooting in Cutting of Some Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). **Asian Journal of Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 4020–4024, 2007.

CORREIA, A. C. G. et al. Redução foliar em miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, p. 295–304, 2015.

DANTAS, Â. K. et al. Rooting of minicuttings of *Castanea sativa* Mill. hybrid clones. **Revista Árvore**, v. 40, n. 3, p. 465–475, 2016.

DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453–462, 2012.

DIAS, P. C. et al. Tipo de miniestaca e de substrato na propagação vegetativa de Angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan). **Ciência Florestal**, v.

25, n. 4, p. 909–919, 2015.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: [s.n.], 2005.

FERRIANI, A. P. et al. Estaquia e anatomia de vassourão-branco. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 2, p. 159–166, 2008.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627-650, 1927.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 45, p. 1–8, 2000.

FRIZON, C. N. T. et al. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 795–801, 2015.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. The technology. Exegetics Ltd, Edington, UK. 1993.

GOULART, P. B. et al. Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Ciencia Florestal**, v. 24, n. 3, p. 521–532, 2014.

HANSEL, F. A. et al. Moagem e sapeco/secagem em forno de microondas na classificação sensorial de erva-mate no infravermelho próximo. **Comunicado Técnico - Embrapa**, v. 203, p. 8, 2008.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011, 915 p.

HATZILAZAROU, S. P. et al. Peroxidases, lignin and anatomy during in vitro and ex vitro rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 8, p. 827–836, 2006.

HUSEN, A. Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. by softwood nodal cuttings: Effects of genotypes, application of IBA and position of cuttings on shoots. **Silvae Genetica**, v. 53, n. 2, p. 50–55, 2004.

HUSEN, A.; PAL, M. Effect of branch position and auxin treatment on clonal propagation of *Tectona grandis* Linn. f. **New Forests**, v. 34, n. 3, p. 223–233, 2007.

JESUS, A. M. S. et al. Observações anatômicas em plantas de *Coffea arabica* L. obtidas por enraizamento de estacas. **Ceres**, v. 57, n. 2, p. 175–180, 2010.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.

LI, S. W. et al. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009.

LIMA, D. M. et al. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 422–438, 2011.

LJUNG, K. et al. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 2, p. 309–332, 2002.

MACEDO, E. et al. Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots: anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 53–59, 2013.

MITCHELL, R.G.; ZWOLINSKI, J.; JONES, N.B. A review on the effects of donor maturation on rooting and field performance of conifer cuttings. **South African Forestry Journal**, v. 201, p. 53–63, 2004.

PACURAR, D. I.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 1, p. 83–96, 2014.

PARK, S. M. et al. Effects of node position, number of leaflets left, and light intensity during cutting propagation on rooting and subsequent growth of domestic roses. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 339–343, 2011.

PIMENTEL, N. et al. Shoot segment and substrate composition in rooting of juvenile lpe-roxo mini-cuttings. **Ciênc. rural**, v. 46, n. 6, p. 996–1002, 2016.

PORFIRIO, S. et al. Scientia Horticulturae Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 204, p. 41–53, 2016.

QUIROGA, M. et al. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant physiology**, v. 122, n. 4, p. 1119–1127, 2000.

ROSA, G. G. et al. Propagação de porta-enxerto de *Prunus* spp . por estaquia : efeito do genótipo , do estágio de desenvolvimento do ramo e tipo de estaca. **Ceres**, v. 64, n. 1, p. 90–97, 2017.

SHIOZAKI, S. et al. Hardwood cuttings of recalcitrant-to-root wild grapes native to east Asia : *Vitis davidii* and *Vitis kiusiana*. **Journal of Botany**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

ŠTEFANČIČ, M. et al. The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock “GiSela 5” leafy cuttings pretreated with IAA and IBA. **Scientia Horticulturae**, v. 112, n. 4, p. 399–405, 2007.

WENDLING, I.; BROOKS, P. R.; TRUEMAN, S. J. *Topophysis in Corymbia torelliana* × *C. citriodora* seedlings: adventitious rooting capacity, stem anatomy, and auxin and abscisic acid concentrations. **New Forests**, v. 46, n. 1, p. 107–120, 9 jan. 2015.

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

YAN, S. P. et al. Effect of auxins and associated metabolic changes on cuttings of hybrid aspen. **Forests**, v. 8, n. 4, 2017.

ZEM, L. M. et al. *Pereskia aculeata* nas quatro estações do ano em diferentes substratos. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 2, n. 3, p. 227–233, 2015.

ZHANG, W. et al. The effects of exogenous hormones on rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem cuttings. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–14, 2017.

## 6 CAPÍTULO IV. PRIMEIRO MÉTODO PARA ESTIMAR O ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE ERVA MATE VIA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)\*

### RESUMO

A formação de raízes adventícias é uma etapa complexa, porém, essencial no processo de propagação vegetativa, sendo necessário o desenvolvimento e aplicação de técnicas alternativas que reduzam o período para a formação de mudas. Este estudo teve como objetivo obter um modelo para estimar o enraizamento de miniestacas de erva-mate utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), aliada a técnicas quimiométricas. Foram coletados propágulos vegetativos de dez clones de erva-mate em três épocas do ano. A partir de cada clone foram obtidos espectros na faixa entre 1600 e 2400 nm na superfície adaxial das folhas de 20 miniestacas. As amostras foram divididas em dois grupos: 2/3 utilizados para a construção do modelo de regressão de mínimos quadrados (PLS) e 1/3 para validação externa. O modelo desenvolvido apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,68, erro de calibração de 11% e desvio da razão de performance (RPD) de 1,75. O modelo é adequado para estimar do enraizamento de miniestacas de erva-mate. Este resultado pode auxiliar produtores na escolha a campo dos propágulos mais responsivos ao enraizamento, porém, novos estudos devem ser conduzidos a fim de se obter um modelo mais representativo, acurado e com maior aplicabilidade.

**Palavras chave:** Espectroscópio NIR. Análise Quimiométrica. Método não destrutivo, *Ilex paraguariensis*. Espectroscopia.

---

\* Artigo (adaptado) submetido na Revista *Computers and electronics in agriculture* (Qualis Capes Ciência Agrárias: A2).

## FISRT METHOD TO ESTIMATE ROOTING IN YERBA MATE MINI-CUTTINGS BY NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY

### ABSTRACT

The adventitious root formation is a complex stage, however, essential in the vegetative propagation process, being necessary the development and application of alternative techniques that reduce the period for plants formation. This study aimed to obtain a model using the near-infrared spectroscopy (NIR) and chemometric techniques to estimate the rooting in yerba-mate. Mini-cuttings of ten clones of yerba mate were collected at three seasons. From each clone we collected spectra in the range between 1600 and 2400 nm adaxial surface in the leaves from 20 mini-cuttings. The samples were divided into two groups: 2/3 used for the construction of the PLS (Partial Least Squares) model and 1/3 for external validation. The developed model presented a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0,68, calibration error of 11% and ratio of performance to deviation (RPD) of 1,75. The model is efficient to estimate the minicuttings of yerba mate rooting. This result can help the producers to choose the genetic materials more responsive to rooting in the field.

**Keywords:** NIR spectroscopy. Chemometric Analysis. Non-destructive Method. *Ilex paraguariensis*. Spectrophotometer.

## 6.1 INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Família: Aquifoliaceae) popularmente conhecida como erva-mate, ocorre naturalmente no nordeste da Argentina, Paraguai e sul do Brasil (BERGOTTINI et al., 2015; SIGNOR; GOMES; WATZLAWICK, 2015). As folhas são tradicionalmente consumidas na América do Sul como chá, chimarrão e tererê. No entanto, a erva-mate atingiu relevante atenção no mercado mundial devido à variedade de compostos bioativos úteis para indústria cosmética, farmacológica e alimentícia (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; HUANG et al., 2014).

A espécie possui restrições na sua propagação seminal (WENDLING; DUTRA, 2008), desta forma, a propagação vegetativa é uma forma alternativa e eficiente de produção de mudas de erva-mate, permitindo a multiplicação de genótipos superiores (WASSNER; RAVETTA, 2000), garantindo uniformidade e possibilitando aumento na produtividade e qualidade de seus produtos.

A formação de raízes adventícias influencia o sucesso da propagação vegetativa e é afetada por vários fatores. O enraizamento adventício é induzido por fatores exógenos como a luz (SORIN et al. 2005), fotoperíodo, temperatura (BRONDANI et al., 2010), o uso de reguladores vegetais (BRONDANI et al., 2008b), idade e condições fisiológicas da planta matriz (ALCANTARA et al. 2008) e grau de lignificação dos propágulos (WENDLING; BROOKS; TRUEMAN, 2015). Fatores endógenos também afetam o enraizamento adventício, como os níveis de auxina, principalmente o ácido indol acético (IAA), além de outros hormônios incluindo etileno, citocinina, ácido abscísico, ácido giberélico, estrigolactonas (DIAS et al., 2011, COSTA et al., 2013; BELLINI et al., 2014), bem como a presença de cofatores.

A técnica de miniestaquia é uma forma de propagação vegetativa, que consiste na coleta de brotações, preparação e plantio dos propágulos vegetativos. A formação do sistema radicial das miniestacas de erva-mate ocorre de 60 (BRONDANI et al., 2007) a 120 dias (BRONDANI et al., 2008a) a depender do clone e tipo de propágulo utilizado. Desta forma, seria válido o desenvolvimento de mecanismos para auxiliar na predição de propágulos vegetativos mais responsivos ao enraizamento no momento da coleta das brotações, algo possível por meio da aplicação de modelos de infravermelho próximo (NIR).

A espectroscopia NIR é uma técnica rápida, precisa e não destrutiva que permite a análise qualitativa e quantitativa. Esta técnica consiste em expor amostras à radiação eletromagnética (750-2500 nm) (MUNIZ et al., 2012) e esta promove a vibração molecular de compostos químicos, especialmente moléculas contendo as ligações CH, NH, SH ou OH (PASQUINI, 2003). A técnica NIR mostrou-se eficiente para a classificação de amostras de erva-mate de acordo com o país de origem (COZZOLINO et al., 2010; MARCELO et al., 2014), bem como para determinar os níveis de compostos fenólicos (FRIZON et al., 2015), umidade (MAZUR et al., 2014a) e metilxantinas (MAZUR et al., 2014b). No entanto, o uso da técnica NIR para estimar o enraizamento não foi relatado.

Assim, o objetivo deste trabalho foi elaborar um modelo usando espectroscopia NIR para prever o enraizamento de miniestacas de erva-mate como forma a auxiliar na seleção de propágulos.

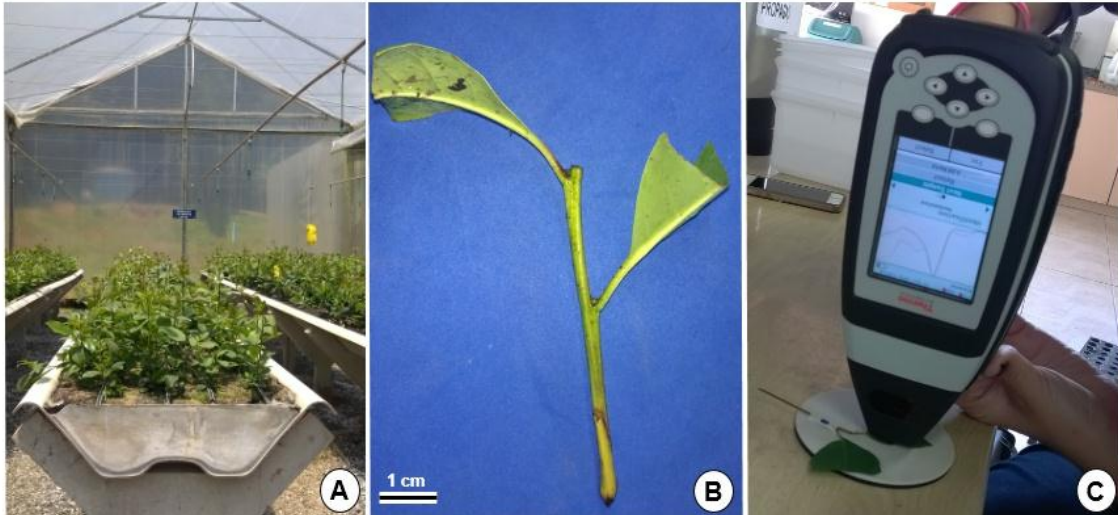
## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Material vegetal**

Foram analisados genótipos de erva-mate de fácil, intermediário e difícil enraizamento. Quatro clones (A7, A3, F1 e F2) provenientes da Embrapa Florestas, Colombo-PR, Brasil (25 ° 20 'S e 49 ° 14' W, 920 m) e outros seis (CAN, F4, F7, IR4, IR15 e material de sementes selecionadas) da empresa Baldo SA, São Mateus do Sul-PR, Brasil (25 ° 52'26 "S e 50 ° 22'58" W, 835 m).

Foram utilizados como fonte dos propágulos vegetativos minicepas cultivadas em estufa sob um sistema semi-hidropônico (Figura 17A), as quais receberam solução nutritiva, conforme recomendado por Wendling et al. (2007), distribuídos por gotejamento três vezes por dia, com um fluxo total de 5 L m<sup>-2</sup>.

FIGURA 17 – **A.** MINIJARDIM CLONAL DE ERVA-MATE EM SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO; **B.** MINIESTACA; **C.** AQUISIÇÃO ESPECTRAL UTILIZANDO EQUIPAMENTO NIR PORTÁTIL NA SUPERFÍCIE ADAXIAL DAS FOLHAS.



FONTE: A autora (2015).

### 6.2.2 Miniestaqueia de erva-mate

O material vegetal foi coletado nas três estações do ano (abril/2015 - outono, julho/2015 – inverno, outubro/2015 – primavera). A partir das brotações das minicepas de erva-mate foram confeccionadas 20 miniestacas por clone com comprimento médio de 6 cm ( $\pm 1$  cm), corte em bisel na base e reto no ápice, mantendo-se duas folhas com área foliar reduzida em 50% (Figura 17B). O plantio das miniestacas ocorreu em tubetes de polipropileno com capacidade de 55 cm<sup>3</sup>, utilizando substrato comercial (Tropstato Florestal®) composto de fibra de coco, vermiculita, carvão e casca de pinheiro em proporções não relatadas pelo fabricante e mantidas em casa de vegetação com nebulização intermitente (80% umidade relativa do ar e 20-30°C) na Embrapa Florestas.

Após 90 dias da instalação dos experimentos, avaliou-se o número de miniestacas enraizadas (miniestacas que emitiram raízes de no mínimo 1 mm de comprimento) e obteve-se a porcentagem média de enraizamento por clone e, esse dado foi correlacionado com o conjunto de espectros a fim de gerar um modelo matemático.

### 6.2.3 Aquisição espectral

Antes do plantio das miniestacas efetuou-se as coletas dos espectros de infravermelho utilizando equipamento NIR portátil (MicroPhazir TM PC Thermo Scientific) no modo de refletância difusa. Os espectros NIR foram capturados em comprimentos de onda entre 1600 e 2400 nm a um intervalo de 8 nm, obtidos de três pontos diferentes da superfície adaxial de cada folha (Figura 17C), totalizando 6 espectros por miniestaca. Em cada época de coleta, 20 miniestacas por clone foram utilizadas na aquisição espectral, e os espectros médios por clone foram calculados por meio do software Unscrambler®.

#### 6.2.3.1 Calibração, validação e seleção do modelo

O modelo de regressão PLS (*Partial Least Square*) foi ajustado utilizando o software Unscrambler® para descrever a relação entre os espectros NIR e os resultados obtidos por meio da técnica de miniestaquia. O conjunto de dados foi dividido em duas partes: 2/3 (20 amostras) utilizado para calibração (construção do modelo) e o restante 1/3 (10 amostras) para validação externa (predição). A seleção das amostras para o subconjunto de calibração foi realizada classificando-se na ordem crescente os dados de enraizamento e selecionando subconjuntos uniformemente distribuídos (duas em cada três amostras). O subconjunto de validação usou as amostras complementares de um terço. Este procedimento permitiu maior controle da variabilidade dentro de cada subconjunto.

Foi utilizado como método de pré-tratamento dos espectros NIR a variação normal padronizada (SNV) e a normalização e, foi aplicado o teste de incerteza de Martens (WESTAD, MARTENS, 2000) para selecionar os números de ondas mais relevantes. Para avaliar a qualidade do modelo, foram consideradas as estatísticas: coeficiente de determinação ( $R^2$ ), erro quadrático médio (RMSE), erro padrão (SE), desvio padrão (SD) e desvio da razão de performance (RPD) que corresponde ao desvio padrão dos dados obtidos convencionalmente e o erro padrão da validação ( $RPD = SD / SE$ ).

### 6.3 RESULTADOS

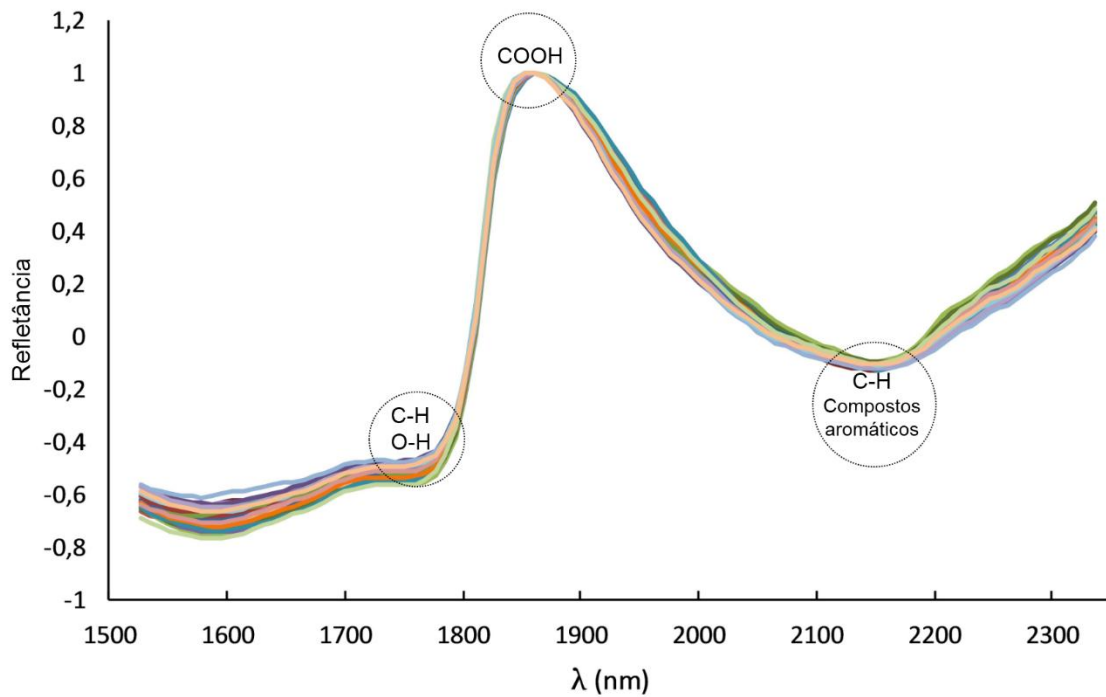
O intervalo de enraizamento variou entre 25,0% a 100,0%, com um valor médio de 67,5%. A primavera promoveu o melhor índice de enraizamento (83,0%), seguido do outono e inverno (61,5% e 58,0%, respectivamente) (Tabela 9).

TABELA 9 – PORCENTAGEM MÉDIA DE ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS COLETADAS EM TRÊS ESTAÇÕES DO ANO PROVENIENTES DE DEZ CLONES DE ERVA-MATE.

Material genético	Outono (%)	Inverno (%)	Primavera (%)	Médias (%)
A3	25,0	60,0	75,0	53,3
A7	60,0	65,0	80,0	68,3
CAN	90,0	85,0	85,0	86,7
F1	65,0	55,0	95,0	71,7
F2	50,0	50,0	80,0	60,0
F4	65,0	40,0	75,0	60,0
F7	75,0	50,0	90,0	71,7
IR4	60,0	55,0	100,0	71,7
IR15	45,0	45,0	55,0	48,3
SEMENTES	80,0	75,0	95,0	83,3
Médias (%)	61,5	58,0	83,0	67,5

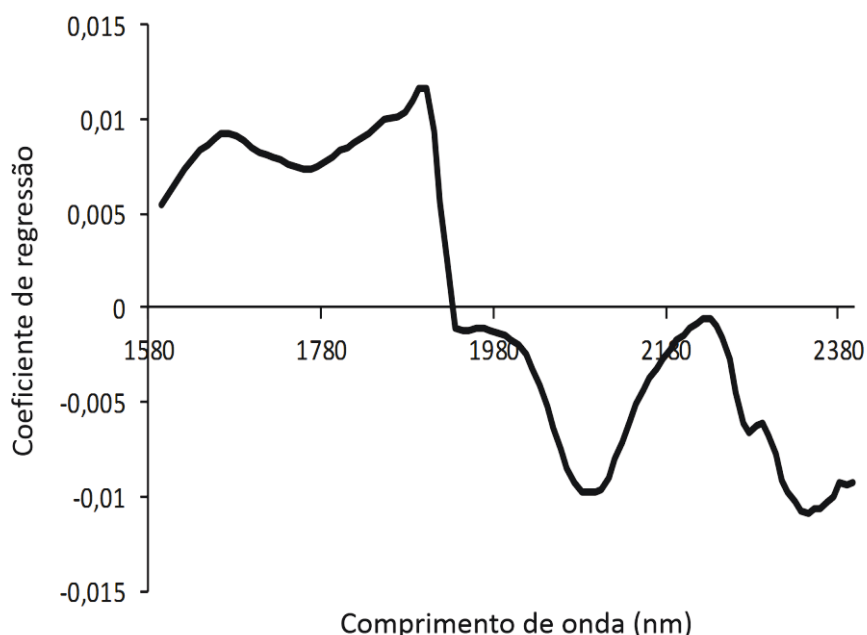
O grupo de espectros das 30 amostras (10 clones x 3 estações do ano) mostrou uma distribuição espectral semelhante (Figura 18). O espectro de refletância mostrou três regiões que estão associadas a grupos funcionais de moléculas que podem promover enraizamento. A região entre 1750 e 1800 nm foi relacionada ao primeiro *overtone* entre as ligações alifáticas C-H e O-H. A região de refletância mais intensa (entre 1850 e 1900 nm) foi associado à presença de ácidos carboxílicos (COOH). A ligação C-H, presentes em compostos aromáticos, mostrou um pico de refletância em 2148 nm.

FIGURA 18- ESPECTRO DE REFLETÂNCIA NIR DE FOLHAS DE DEZ CLONES DE ERVA-MATE COLETADAS EM TRÊS ESTAÇÕES DO ANO. AS REGIÕES EM DESTAQUE CORRESPONDEM ÀS MOLÉCULAS QUÍMICAS RELACIONADAS COM O ENRAIZAMENTO.



O método PLS mostrou que os espectros NIR apresentaram correlação significativa com os dados de enraizamento. A Figura 19 demonstra os resultados do PLS e a importância do comprimento de onda no modelo de predição do enraizamento. As moléculas que apresentaram picos de refletância entre 1674 e 1894 nm contribuem para o processo de enraizamento das miniestacas de erva-mate; porém, as moléculas que apresentaram picos entre 2094 e 2334 nm afetaram negativamente este processo.

FIGURA 19 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO OBTIDO EM UM MODELO PLS PARA ESTIMAR O ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE ERVA-MATE UTILIZANDO ESPECTRO DE REFLETÂNCIA NIR.



A curva de calibração construída com PLS mostrou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,75 e um RPD de 2,10. No entanto, o grupo de validação apresentou  $R^2$  de 0,68 e um RPD de 1,75 (Tabela 10).

TABELA 10 - RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS DE CALIBRAÇÃO E PREDIÇÃO PARA OS ÍNDICES DE ENRAIZAMENTO EM MINIESTACAS DE ERVA-MATE.

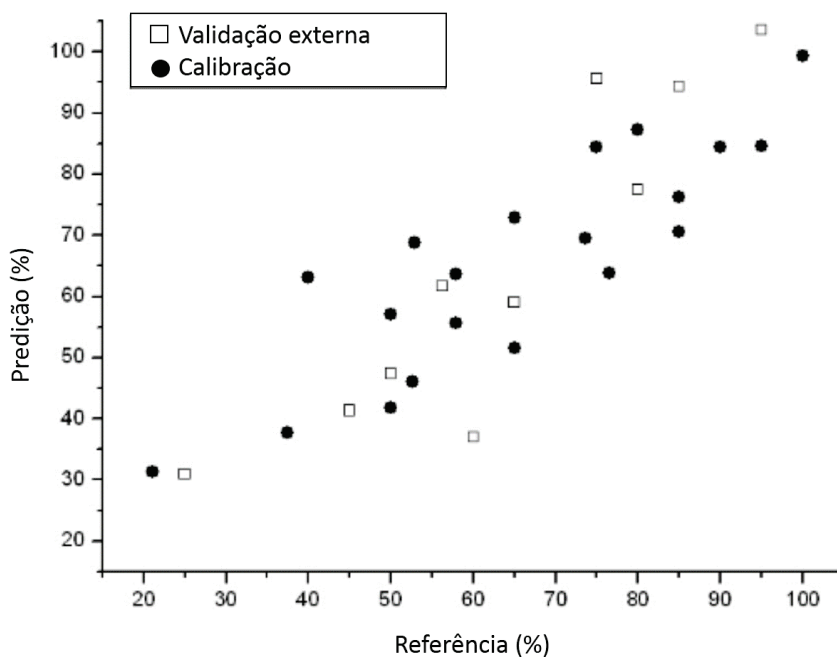
Variáveis	Grupo de calibração	Grupo de validação cruzada	Grupo de validação externa
Mínimo (%)	25,0	25,0	25,0
Máximo (%)	100,0	100,0	95,0
Média (%)	68,0	68,0	64,0
SD	0,21	0,21	0,21
$R^2$	0,75	0,55	0,68
RMSE	0,10	0,14	0,11
SE	0,10	0,15	0,12
RPD	2,10	1,40	1,75

SD (*standard deviation*): Desvio padrão dos dados obtidos convencionalmente;  $R^2$ : Coeficiente de determinação; RMSE (*root mean squared error*): Erro quadrático médio; SE (*standard error*): Erro padrão de calibração; RPD (*ratio of permacnce to deviation*): desvio da razão de performance.

Os grupos de calibração e de validação externa utilizando valores de referência medidos pelo método convencional de determinação dos dados de enraizamento foram correlacionados com os valores calculados utilizando o modelo

PLS. O gráfico plotado mostrou uma distribuição homogênea (Figura 20).

FIGURA 20 - DADOS DE ENRAIZAMENTO MENSURADOS X PREDITO PELO MODELO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS) PARA MINIESTACAS DE ERVA-MATE.



## 6.4 DISCUSSÃO

A formação de raízes adventícias é um processo complexo, pois envolve a ação isolada e/ou a interação de diversos compostos bioquímicos. Os principais compostos envolvidos neste processos são os hormônios (PACURAR et al. 2014; RASMUSSEN et al. 2015; DRUEGE et al. 2016; OSTERC et al. 2016; STEFFENS; RASMUSSEN 2016), carboidratos (AGULLÓ-ANTÓN et al. 2011; DIAS et al. 2011; DENAXA et al. 2012), proteínas (BORTOLINI et al. 2008; ZHANG et al. 2016) e compostos fenólicos (ASLMOSHTAGHI; REZA-SHAHSAVAR, 2010; de KLERK et al. 2011).

Modelos NIR podem avaliar sistemas complexos (AKROUME et al., 2016; LOHR et al., 2016), similares ao enraizamento de miniestacas. Neste estudo, foi possível obter um modelo que abrangeu os dez clones de erva-mate e, os espectros NIR deste modelo, demonstraram refletância características e similares com as frequências associadas aos grupos funcionais de moléculas que podem promover o enraizamento.

Os carboidratos são compostos que afetam o enraizamento (LI et al., 2009) e caracterizam-se como moléculas orgânicas constituídas por ligações C-H, as quais estão relacionadas ao sinal observado entre 1750 e 1800 nm. Estes compostos contribuem com a formação de raízes adventícias por serem fonte de energia e de carbono, sendo utilizados para síntese de outros compostos tais como proteínas (HAISSIG, 1974; COSTA et al., 2013).

Já os ácidos carboxílicos, grupo funcional presente nas proteínas, estão associados ao espectro NIR na faixa entre 1850 e 1900 nm. As proteínas estão envolvidas no processo de indução do primórdio radicial, principalmente com função enzimática (HUSEN, 2008). Além disso, o ácido carboxílico também está presente na molécula do ácido indol acético, este é um dos principais hormônios indutores da formação de raízes adventícias.

Contudo, a faixa entre 2100 e 2200 nm foi associada aos fenóis. Estes podem induzir ou inibir o enraizamento dependendo da estrutura química do composto (Schwambach et al., 2008; Shiozaki et al., 2013).

Os resultados de PLS e as moléculas com refletância até 1894 nm de comprimento de onda contribuem para a estimativa do enraizamento das miniestacas de erva-mate. Nesta região possivelmente estão presentes moléculas que possuem ligações C-H, O-H e o COOH carboxílico. As moléculas que contêm esses grupos funcionais são responsáveis por induzir a formação da raiz, como os carboidratos, auxinas e proteínas.

Por outro lado, o pico de refletância em 2334 nm pode representar moléculas químicas que influenciam negativamente o processo de enraizamento. Possivelmente, essas moléculas sejam e/ou estejam associadas aos compostos fenólicos, uma classe importante de metabólitos secundários (LI et al., 2010). Estudos demonstram que compostos fenólicos, especialmente monofenóis, podem inibir a ocorrência de raízes adventícias (SHANG et al., 2017), ativando a síntese do complexo IAA oxidase, diminuindo assim os níveis de IAA (PORFIRIO et al., 2016).

As três épocas do ano foram consideradas para a construção do modelo. A primavera apresentou um melhor resultado de enraizamento (83,0%). Ao longo das estações, as variações de temperatura e fotoperíodo afetam as condições fisiológicas da planta matriz, principalmente quanto ao grau de lignificação (WENDLING et al.,

2015; ZHANG et al. 2016) e balanço hormonal (COSTA et al. 2013; PACURAR et al., 2014), estes são fatores que afetam o processo de indução e desenvolvimento radicial. Períodos que favorecem a aceleração do metabolismo dos propágulos vegetativos (estações mais quentes) proporcionam o aparecimento de propágulos herbáceos. Estes propágulos podem enraizar facilmente devido ao menor grau de lignificação e aos níveis endógenos favoráveis de auxina (KIBBLER et al., 2004; ALCANTARA et al., 2008; WENDLING et al., 2014). A influência da sazonalidade na indução das raízes também foi observada em outras espécies florestais, como *Pinus taeda* (ALCANTARA et al., 2007), *Tibouchina sellowiana* (BORTOLINI et al., 2008); *Eucalyptus benthamii* x *dunni* (BRONDANI et al., 2010), *Eucalyptus grandis* x *urophylla* (SOUZA et al., 2013), *Psychotria nuda* (FERREIRA et al., 2014), *Araucaria angustifolia* (PIRES et al., 2015), *Drimys brasiliensis* (ZEM et al., 2015) e *Pinus radiata* (CORRÊA et al., 2015).

Com relação às porcentagens de enraizamento, estas foram semelhantes as apresentadas por outros autores para a mesma espécie (BITENCOURT et al., 2009). Brondani et al. (2008a) usando a técnica de miniestaquia, avaliaram diferentes ambientes de enraizamento e obtiveram médias de 46,4% a 49,1% de enraizamento. Possivelmente, os melhores resultados de enraizamento neste estudo (média de 67%) foram decorrentes da variação genética existente entre os propágulos utilizados.

Considerando que o presente estudo foi a primeira tentativa de obtenção de um modelo para estimar o enraizamento, processo altamente complexo e influenciado por inúmeros fatores, o modelo matemático obtido foi satisfatório para estimar o enraizamento de miniestacas de erva-mate considerando o RPD de 1,75.

A avaliação do bom ajuste da curva de predição pode ser inferida, entre outros parâmetros, pela relação de desempenho ( $RPD = SD/SE$ ) (LAZZAROTTO; MAGALHÃES, 2014). Os valores elevados da relação  $SD/SE$  significam que o erro de estimativa é muito menor do que o desvio padrão das amostras e valores baixos indicam a ineficiência do modelo (LAZZAROTTO; MAGALHÃES, 2014). De acordo com esses autores, índices RPD em torno de 1,5 também são adequados, porém RPD acima de 2,0 é o ideal (SCHIMLECKL et al., 2004).

## 6.5 CONCLUSÃO

O modelo desenvolvido utilizando a técnica de espectroscopia NIR mostrou-se adequado para prever o enraizamento de miniestacas de erva-mate ( $R^2$ : 0,68 e RPD: 1,75). Contudo, novos estudos devem ser conduzidos a fim de aprimorar o modelo com o intuito de obter índices com maior exatidão, representatividade e aplicabilidade. A espectroscopia NIR para estimar o enraizamento tem potencial para ser utilizada como ferramenta auxiliar na seleção de propágulos mais responsivos ao enraizamento.

## 6.6 REFERÊNCIAS

AGULLÓ-ANTÓN, M. Á. et al. Auxins or Sugars: What makes the difference in the adventitious rooting of stored carnation cuttings? **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 1, p. 100–113, 2011.

AKROUME, E. et al. Improving the design of long-term monitoring experiments in forests: a new method for the assessment of local soil variability by combining infrared spectroscopy and dendrometric data. **Annals of Forest Science**, v. 73, n. 4, p. 1005–1013, 2016.

ALCANTARA, G. B. DE et al. Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 399–404, 2007.

ALCANTARA, G. B. DE et al. Efeitos do ácido indolilbutírico (AIB) e da coleta de brotações em diferentes estações do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Scientia Forestalis**, v. 36, n. 78, p. 151–156, 2008.

ASLMOSHTAGHI, E.; REZA-SHAHSAVAR, A. Endogenous soluble sugars, starch contents and phenolic compounds in easy - and difficult – to – root olive cuttings. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 4, n. 11, p. 83–86, 2010.

BELLINI, C.; PACURAR, D. I.; PERRONE, I. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 639–666, 2014.

BERGOTTINI, V. M. et al. Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 6, p. 749–755, 2015.

BITENCOURT, J. et al. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 277–281, 2009.

BORTOLINI, M. F. et al. *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: Enraizamento, anatomia e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 2, p. 159, 2008.

BRONDANI, G. E. et al. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva- mate. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 3, p. 257–267, 2007.

BRONDANI, G. E. et al. Ácido indolbutírico em gel para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 2, p. 153–158, 2008a.

BRONDANI, G. E. et al. Enraizamento de miniestacas de erva-Mate sob diferentes

Ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 57, p. 29–38, 2008b.

BRONDANI, G. E. et al. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (II) Sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estação do ano. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 3, p. 453–465, 2010.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

CORRÊA, P. R. R. et al. Efeito da planta matriz, estação do ano e ambiente de cultivo na miniestaquia de *Pinus radiata*. **Floresta**, v. 45, n. 1, p. 65–74, 2015.

COSTA, C. T. et al. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 133, 2013.

COZZOLINO, D.; RESTAINO, E.; FASSIO, A. Discrimination of yerba mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.) samples according to their geographical origin by means of near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v. 4, n. 2, p. 67–72, 2010.

DE KLERK, G. J. et al. Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in Malus “Jork 9”. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 175–185, 2011.

DENAXA, N. K.; VEMMOS, S. N.; ROUSSOS, P. A. The role of endogenous carbohydrates and seasonal variation in rooting ability of cuttings of an easy and a hard to root olive cultivars (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 143, p. 19–28, 2012.

DIAS, J. P. T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. IBA e carboidratos no enraizamento de brotações procedentes de estacas radiciais de *Rubus* Spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. spe1, p. 666–671, out. 2011.

DRUEGE, U.; FRANKEN, P.; HAJIREZAEI, M. R. Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 381, 2016.

FERREIRA, B. G. A. et al. *Psychotria nuda* (Cham. & Schltldl.) Wawra: Rooting of stock plants in different phenophases and environments. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 2, p. 367–378, 27 jun. 2014.

FRIZON, C. N. T. et al. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 795–801, 2015.

HAISSIG, B. E. Metabolism during adventitious root primordium initiation and

development. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 4, n. 2, p. 324–337, 1974.

HUANG, W. Y. et al. Effects of water quality on dissolution of yerba mate extract powders. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

HUSEN, A. Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. **New Forests**, v. 36, n. 1, p. 13–27, 2008.

KIBBLER, H.; JOHNSTON, M. E.; WILLIAMS, R. R. Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell: 2. Seasonal influences of temperature, rainfall, flowering and auxins on the stock plant. **Scientia Horticulturae**, v. 102, n. 3, p. 343–358, 2004.

LAZZAROTTO, M.; MAGALHÃES, W. L. E. Uso da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para predição não-destrutiva de densidade básica da madeira de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus pellita*. **Comunicado Técnico**, v. 334, p. 1–6, 2003.

LI, S. W. et al. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009.

LI, Z. H. et al. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933–8952, 2010.

LOHR, D. et al. Non-destructive measurement of nitrogen status of leafy ornamental cuttings by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for assessment of rooting capacity. **Biosystems Engineering**, v. 148, n. 0, p. 157–167, 2016.

MARCELO, M. C. A. et al. Methods of multivariate analysis of NIR reflectance spectra for classification of yerba mate. **Analytical Methods**, v. 6, n. 19, p. 7621–7627, 2014.

MAZUR, L. et al. Multivariate calibration and moisture control in yerba mate by near infrared spectroscopy. **Acta Scientiarum Technology**, v. 36, n. 2, p. 369–374, 2014.

MAZUR, L. et al. Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, n. 2, p. 55–60, 2014b.

MUNIZ, G. I. B. et al. Background and State of the Art of near Infrared Spectroscopy in the Forest Sector Base. **Ciencia Florestal**, v. 22, n. 4, p. 865–875, 2012.

OSTERC, G.; PETKOVŠEK, M. M.; STAMPAR, F. Quantification of IAA metabolites in the early stages of adventitious rooting might be predictive for subsequent differences in rooting response. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 2, p. 534–542, 2016.

PACURAR, D. I.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 1, p.

83–96, 2014.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PIRES, P. et al. Sazonalidade e soluções nutritivas na miniestaquia de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 283–293, 2015.

PORFIRIO, S. et al. Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 204, p. 41–53, 2016.

RASMUSSEN, A. et al. Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 5, p. 1437–1452, 2015.

SCHIMLECKL, L. R. et al. Nondestructive estimation of tracheid length from sections of radial wood strips by near infrared spectroscopy. **Holzforschung**, v. 58, p. 375–379, 2004.

SHANG, W. et al. Research on the relationship between phenolic acids and rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 224, n. March, p. 53–60, 2017.

SIGNOR, P.; GOMES, G. S.; WATZLAWICK, L. F. Produção de erva-mate e conservação de Floresta com Araucária. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 35, n. 83, p. 199, 2015.

SORIN, C. et al. Auxin and Light Control of Adventitious Rooting in Arabidopsis Require ARGONAUTE1. **The Plant Cell**, v. 17, n. 5, p. 1343–1359, 2005.

SOUZA, C. C. et al. Padrões de miniestacas e sazonalidade na produção de mudas clonais de *Eucalyptus grandis* Hill x *E. urophylla* S. T. Black. **Revista Árvore**, v. 37, n. 1, p. 67–77, 2013.

STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The physiology of adventitious roots. **Plant Physiology**, v. 170, p. 603–617, 2016.

WASSNER, D.; RAVETTA, D. Vegetative propagation of *Grindelia chiloensis* (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 7–10, 2000.

WENDLING, I.; BROOKS, P. R.; TRUEMAN, S. J. Topophysis in *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* seedlings: adventitious rooting capacity, stem anatomy, and auxin and abscisic acid concentrations. **New Forests**, v. 46, n. 1, p. 107–120, 2015.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em sistema semi-hidropônico. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 157, p. 1–4, 2008.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-Part I: Concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 449–471, 2014.

ZEM, L.M., Christina, K., Henrique, Z., Koehler, S. Enraizamento de estacas semilenhosas de *Pereskia aculeata* nas quatro estações do ano em diferentes substratos. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 2, p. 227–233, 2015.

ZHANG, W. et al. Mechanisms underlying the regulation of root formation in *Malus hupehensis* stem cuttings by using exogenous hormones. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 1, p. 174–185, 2017.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

Os índices de enraizamento observados são considerados satisfatórios mesmo com o uso de genótipos adultos (provenientes de árvores com mais de 80 anos), os quais apresentam enraizamento semelhante ao material juvenil (provenientes de muda propagadas sexuadamente), indicando que a técnica da miniestaquia manteve as características juvenis dos propágulos.

No entanto, para os clones que apresentam baixo enraizamento (inferiores a 50%), recomenda-se o uso do ácido indol butírico, conforme as recomendações citadas no capítulo 1. A demanda exógena das miniestacas de erva-mate pelo regulador vegetal está associada a níveis endógenos insuficientes de ácido indol acético. Conforme abordado no capítulo 2, o enraizamento da erva-mate está correlacionado com os níveis de auxina endógena, bem como com os teores de açúcares e proteínas totais.

Quanto à ação das enzimas peroxidases, polifenoloxidasas e dos compostos fenólicos, estas não afetam diretamente o desenvolvimento do sistema radicial das miniestacas de erva-mate. Possivelmente estes compostos não atuam de forma independente, mas sim, de maneira inter-relacionada ou associada com outras substâncias.

A formação de raízes adventícias de miniestacas de erva-mate independe da formação de calos. O primórdio radicial advém do câmbio vascular e, apesar da presença do anel esclerenquimático, esta estrutura não funciona como uma barreira mecânica.

As condições ambientais recorrentes nas estações mais quentes do ano, principalmente na primavera, favorecem a emissão e o desenvolvimento das raízes da erva-mate. Desta forma, deve-se adotar estratégias de manejo que viabilizem a maior produção de mudas em tal época.

Tanto a porção apical quanto basal das miniestacas de erva-mate são indicadas para serem utilizadas como propágulos vegetativos durante a miniestaquia desta espécie.

O modelo construído utilizando a espectroscopia de infravermelho próximo é adequado para estimar o enraizamento de miniestacas de erva-mate, porém deve ser aprimorado para se obter um melhor ajuste de predição.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES FUTURAS**

Os estudos realizados na presente tese contribuem para um melhor entendimento da relação de alguns dos principais compostos bioquímicos (IAA, PT, AT, POD, PPO, CF) que influenciam direta e indiretamente o enraizamento adventício da erva-mate. Também foi realizada a caracterização anatômica da rizogênese da erva-mate, foi recomendado o uso do regulador vegetal IBA e de miniestacas apicais e basais como propágulos vegetativos, foram identificados os materiais genéticos mais responsivos ao enraizamento, bem como a melhor época para coleta dos propágulos. E, pela primeira vez, foi relatado o uso da espectroscopia NIR para estimar o enraizamento de miniestacas de *Ilex paraguariensis*.

A miniestaquia é uma das técnicas de propagação vegetativa que permite o aproveitamento do potencial juvenil dos propágulos e de modo geral, proporciona a redução ou exclusão do uso de reguladores vegetais. Contudo, constatou-se neste estudo, que a aplicação do IBA contribuiu para a formação do sistema radicial das miniestacas de erva-mate, fato relacionado aos níveis endógenos insuficientes de IAA. Diante disso, recomendam-se estudos relacionados a miniestaquia seriada da erva-mate, como forma de promover o rejuvenescimento dos propágulos vegetativos e, dispensar a necessidade da aplicação do regulador vegetal.

Estudos relacionados com a análise das fases do enraizamento (indução, iniciação e emergência) também são indicados. Para tanto, recomenda-se em diferentes períodos do enraizamento, a coleta dos propágulos e, a quantificação e caracterização dos compostos bioquímicos que influenciam a rizogênese (e.g. POD, PPO, CF, AT, PT, IAA, dentre outros hormônios). Com isso, cada fase do enraizamento poderia ser caracterizada, bem como determinado a função de cada composto.

Na presente tese também foi relatada pela primeira vez a utilização da espectroscopia NIR para estimar o enraizamento de miniestacas, estudo inovador, interessante e com grande potencial de aplicação. Diferentemente a outros estudos

na literatura científica que analisam um componente em específico, neste trabalho foi avaliado um sistema complexo (enraizamento), o qual é influenciado por inúmeros fatores exógenos (temperatura, umidade, luminosidade) e endógenos (hormônios, e compostos bioquímicos, dentre outros). Sendo assim, foi possível desenvolver um modelo adequado para prever o enraizamento, porém este deve ser aprimorado, a fim de se obter, principalmente, um melhor ajuste de predição.

Estudos envolvendo a coleta de espectros de árvores de erva-mate cultivadas no campo também devem ser conduzidos, a fim de desenvolver um modelo com maior aplicabilidade e utilidade, podendo assim auxiliar no campo a escolha dos materiais genéticos mais responsivos ao enraizamento.

## REFERÊNCIAS

AGULLÓ-ANTÓN, M. Á. et al. Auxins or Sugars: What Makes the Difference in the Adventitious Rooting of Stored Carnation Cuttings? **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 1, p. 100–113, 2011.

AGULLÓ-ANTÓN, M. Á. et al. Early steps of adventitious rooting: Morphology, hormonal profiling and carbohydrate turnover in carnation stem cuttings. **Physiologia Plantarum**, v. 150, n. 3, p. 446–462, 2014.

AHKAMI, A. H. et al. Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: Involvement of wound response and primary metabolism. **New Phytologist**, v. 181, n. 3, p. 613–625, 2009.

AKATU. **Linha Akatu-Cosméticos naturais de erva-mate**. Disponível em: <<http://www.ervamatevalerio.com.br/index.php?menu=akatu>>. Acesso em 12 de Mai 2017.

ALCANTARA, G. B. DE et al. Efeitos do ácido indolilbutírico (AIB) e da coleta de brotações em diferentes estações do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Scientia Forestalis**, v. 36, n. 78, p. 151–156, 2008.

ALCANTARA, G.B. et al. Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, v.31, n.3, p.399-404, 2007.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. 2 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009.

AMRI, E. et al. Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): Effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. **New Forests**, v. 39, n. 2, p. 183–194, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ARAUJO, G. **Gaúcho cria cerveja de chimarrão**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL251585-5598,00GAUCHO+CRIA+CERVEJA+DE+CHIMARRAO.html>>. Acesso em 02 Fev. 2017.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In.: **IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus**, Salvador. Anais... Colombo: Embrapa-CNPq, p. 300-304, 1997.

BACCARIN, F. J. B. et al. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, n. 4, p. 465–483, 2015.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul**: guia de identificação e interesse ecológico. Instituto Souza Cruz, 2002.

BADILLA, Y. et al. IBA efficiency on mini-cutting rooting from Teak (*Tectona grandis* Linn F.) clones. **Revista Árvore**, v. 40, n. 3, p. 477–485, 2016.

BALLESTER, A. et al. Anatomical and Biochemical Events during in vitro Rooting of Microcuttings from Juvenile and Mature Phases of Chestnut. **Annals of Botany**, v. 83, n. 1987, p. 619–629, 1999.

BEN-GERRA, I.; NORRIS, K. H. Direct spectrophotometric of fat and moisture in Meat Products, **Food Science**, v. 33, n.1, p. 64-67, 1968.

BERTÉ, K. A. S. et al. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 354–360, 2011.

BITENCOURT, J. et al. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 277–281, 2009.

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 686–692, 2013.

BOKOBZA, L. Near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v.6, n.1, p.3-17, 1998.

BORTOLINI, M. F. et al. *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: enraizamento, anatomia e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 2, p. 159, 30 jun. 2008.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011.

BRANCO, C. DOS S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 92, p. 60–68, 2013.

BRONDANI, G. E. et al. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestquia de erva- mate. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 3, p. 257–267, 2007.

BRONDANI, G. E. et al. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 57, p. 29–38, 2008.

BRONDANI, G. E. et al. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta**

**Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 667–674, 2010a.

BRONDANI, G. E. et al. Miniestacas de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (II) Sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estação do ano. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 3, p. 453–465, 2010b.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. Handbook of near-infrared analysis. 3.ed. Boca Raton: CRC, 808p, 2008.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

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

CASSON, S. A.; LINDSEY, K. Genes and signalling in root development. **New Phytologist**, v. 158, n. 1, p. 11–38, 2003.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583–3589, 2004.

CHENIANY, M. et al. Effect of endogenous phenols and some antioxidant enzyme activities on rooting of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **African Journal of Plant Science**, v. 4, n. 12, p. 479–487, 2010.

CHIESA, L.; SCHLABITX, C.; SOUZA, C. F. V. Efeito da adição de erva-mate nas características sensoriais e físico- químicas de barras de cereais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 105–110, 2012.

ÇOBAN, H. Determination of Polyphenol Oxidase Activity during Rooting in Cutting of Some Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). **Asian Journal of Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 4020–4024, 2007.

CORRÊA, L. D. R. et al. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 1, p. 63–73, 2005.

COZZOLINO, D.; RESTAINO, E.; FASSIO, A. Discrimination of yerba mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.) samples according to their geographical origin by means of near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v. 4, n. 2, p. 67–72, 2010.

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

COSTA, C. T. et al. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. May, p. 133, 2013.

CURIR, P. et al. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. **Plant physiology**, v. 92, n. 4, p. 1148–1153, 1990.

DIAS, J. P. T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. IBA e carboidratos no enraizamento de brotações procedentes de estacas radiciais de *Rubus* Spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. spe1, p. 666–671, out. 2011.

DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453–462, 2012.

DRUEGE, U. et al. Relation between nitrogen status, carbohydrate distribution and subsequent rooting of Chrysanthemum cuttings as affected by pre-harvest nitrogen supply and cold-storage. **Annals of Botany**, v. 85, n. 5, p. 687–701, 2000.

DRUEGE, U. et al. Transcriptomic analysis reveals ethylene as stimulator and auxin as regulator of adventitious root formation in petunia cuttings. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. September, p. 1–19, 26 set. 2014.

FABIANE, K. C. et al. Tentativa de propagação de erva-mate por estaquia. **Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária - Ciências Agrárias, Animais e Florestais**, v. 1–3, p. 3–5, 2010.

FACCIN, C. et al. Bread with Yerba Mate Aqueous Extract (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). **American Journal of Food Technology**, v. 10, n. 5, p. 206–214, 1 maio 2015.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. Propagação de plantas frutíferas. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2005. 221p.

FAION, Andréia Maria. **Influência da Adição de Extrato de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e culturas adjuntas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) em queijo prato**. Master thesis. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Erechim, 2010.

FERLA, N. J.; MARCHETTI, M. M.; SIEBERT, J. C. Acarofauna (acari) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.: Aquifoliaceae) no estado do rio grande do sul. **Biociências**, v. 13, n. 2, p. 133–142, 2005.

FERREIRA, D.S.; **Aplicação de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada para previsão de parâmetros de qualidade em soja e quinoa**. 2013, 119 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Agro@ambiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 102–109, 2010.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. **Revista Embrapa** – Comunicado técnico, n.45, p. 1-5, 2000.

FOWLER, J.A.P.; STURION, J.A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 105–108, 2007.

FRIZON, C. N. T. et al. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 795–801, 2015.

GASPAR, T. et al. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. **Agronomie**, v. 12, n. 10, p. 757–765, 1992.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. st.-hil., aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**, v. 84 (Pt 6), n. June 1999, p. 647–656, 2000.

GEMPERLINE, P. Practical Guide to Chemometrics. 2. ed. Boca Raton: Taylor and Francis, 2006. 520 p.

GIBSON, S. I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 93–102, 2005.

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. et al. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes, na emergência de plântulas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 39, p. 31–39, 1999.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Prentice Hall, 915p, 2011.

HATZILAZAROU, S. P. et al. Peroxidases, lignin and anatomy during in vitro and ex vitro rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 8, p. 827–836, 2006.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

HEIN, P. R. G. et al. Estimativa da resistência e da elasticidade à compressão paralela

às fibras da madeira de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* usando a espectroscopia no infravermelho próximo. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 37, n. 82, p. 119–129, 2009.

HEIN, P. R. G.; LIMA, J. T.; CHAIX, G. Espectroscopia no infravermelho próximo para estimativa de propriedades da madeira de *Eucalyptus*. **Floresta**, v. 40, n. 3, p. 615–624, 2010.

HEXSEL, D.; ORLANDI, C.; PRADO, D. Botanical extracts used in the treatment of cellulite. **Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 31, p. 866–872; discussion 872, 2005.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. DE A. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica IPEF**, v. 192, p. 1–14, 2000.

HUSEN, A. Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. **New Forests**, v. 36, n. 1, p. 13–27, 2008.

HUSEN, A.; PAL, M. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **New Forests**, v. 31, n. 1, p. 57–73, 2006.

HUSEN, A.; PAL, M. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests**, v. 33, n. 3, p. 309–323, 2007.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Lavoura Permanente - Erva-mate (folha verde)**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em: 10 de Nov. 2017.

IRITANI, C.; SOARES, R. V.; GOMES, A. V. Aspectos morfológicos da aplicação de reguladores do crescimento estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Acta Biológica Paranaense**, v. 15, p. 21–46, 1986.

JIANG, W. et al. Fast compositional analysis of ramie using near-infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 937–941, 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KIBBLER, H.; JOHNSTON, M. E.; WILLIAMS, R. R. Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell. 1. Plant genotype, juvenility and characteristics of cuttings. **Scientia Horticulturae**, v. 102, n. 1, p. 133–143, 2004.

KRATZ, D. et al. Produção de mudas de erva-mate por miniestaquia em substratos renováveis. **Floresta**, v. 45, n. 3, p. 609–616, 2015.

KOIZIMI, S.M, L. **Sistema integrado de análise e distribuição de resultados aplicados à bebida de açaí**, 106 p, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2011.

LEE, T. T.; STARRATT, A. N.; JEVNIKAR, J. J. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: Structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 517–523, 1982.

LEI, P.; BAUHUS, J. Use of near-infrared reflectance spectroscopy to predict species composition in tree fine-root mixtures. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1, p. 93–103, 2010.

LEWIS, D. R. et al. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. **Development**, v. 138, n. 16, p. 3485–3495, 2011.

LI, S. W. et al. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009.

LIMA, D.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; BONA, C.; MAYER, J.L.S. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.422-438, 2011.

LIMA, N. D. S. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, v. 115, n. 1, p. 29–35, 2014.

LJUNG, K.; NEMHAUSER, J. L.; PERATA, P. New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 130–137, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, vol.1/4.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LOURENÇO, R. S. et al. Avaliação de níveis de nitrogênio sobre a produção de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Fernandes Pinheiro, PR, em latossolo vermelho escuro. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 34, p. 75–98, 1997.

LUDWIG-MULLER, J. Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 6, p. 1757–1773, 2011.

MACEDO, E. et al. Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots: anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 53–59, 2013.

MAFIA, R. G. et al. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de Eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 843–851, 2005.

MAGALHÃES, W. L. E. et al. Uso da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) para Predição Não- Destrutiva de Densidade Básica da Madeira de *Pinus taeda*. **Comunicado Técnico** 159. Embrapa Florestas. Colombo, Paraná. 2006.

MARCELO, M. C. A. et al. Methods of multivariate analysis of NIR reflectance spectra for classification of yerba mate. **Anal. Methods**, v. 6, n. 19, p. 7621–7627, 2014.

MARCHEI, E. et al. Measurement of iodide and caffeine content in cellulite reduction cosmetic products sold in the European market. **Analytical Methods**, v. 5, n. 2, p. 376–383, 2013.

MARTÍNEZ, M. A. D. P.; PELOTTO, J. P.; BASUALDO, N. Distribution of flavonoid aglycones in *Ilex* species (Aquifoliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 7, p. 619–622, 1997.

MAZUR, L. et al. Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, n. 2, p. 55–60, 2014a.

MAZUR, L. et al. Multivariate calibration and moisture control in yerba mate by near infrared spectroscopy. **Acta Scientiarum. Technology**, 2014b.

MEJÍA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23–34, 2010.

MELLO, A. C. B. et al. Bebida gaseificada de erva-mate verde. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2009.

MUÑIZ, G. I. B. et al. Background and state of the art of near infrared spectroscopy in the forest sector base. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 4, p. 865–875, 2012.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 346–350, 2007.

NASCIMENTO, P.K.V. **Regeneração in vitro de *Parapiptadenia rigida* (Brethan) Brenan**. 2008, 77 p. Dissertação, Mestrado em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

NEGI, S. et al. Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. **Plant Journal**, v. 61, n. 1, p. 3–15, 2010.

OLIVEIRA, T. P. DE F. DE et al. Efeito do ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento de miniestacas de ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus* Mattos). **Ciencia Florestal**, v. 25, n. 4, p. 1043–1051, 2015.

OLIVEIRA, A. F. DE et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentração de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 117–125, 2003.

OLIVEIRA, Y. M. M. DE; ROTTA, E. Natural distribution area of Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Seminário Sobre Atualidades e Perspectivas Florestais**, p. 17–36, 1983.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83 p.

OSTERC, G.; ŠTAMPAR, F. Differences in endo/exogenous auxin profile in cuttings of different physiological ages. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 17, p. 2088–2092, 2011.

OSTERC, G.; ŠTEFANČIČ, M.; ŠTAMPAR, F. Juvenile stockplant material enhances root development through higher endogenous auxin level. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 5, p. 899–903, 2009.

PACURAR, D. I.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 1, p. 83–96, 2014.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionando à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil**. 112 p. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba 2003.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PEER, W. A.; MURPHY, A. S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 12, p. 556–563, 2007.

PEGO, J.V, SMEEKENS, S.C.M. Plant fructokinases: a sweet family get-together. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 531–536, 2000.

PES, L. et al. Comportamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em consórcio Silvicultural **Ciencia Florestal**, **Ciência Florestal**, v.5, n.1, p.19-31,1995.

PIMENTA, A. C. et al. Interações entre Reguladores Vegetais , Épocas do Ano e Tipos de Substrato no Enraizamento de Estacas Caulinares de *Sapium glandulatum* ( Vell .) Pax . ( Pau – de – leite ). **Boletim Pesquisa Florestal**, n. 50, p. 53–67, 2005.

PIRES, P. P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Ácido Indolbutírico e ortotropismo na Miniestaquia de *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 393–399, 2013.

PIVETTA, K. F. L. et al. Época de coleta e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de espiroleira (*Nerium oleander* L.). **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p. 17–23, fev. 2012.

POP, T. I.; PAMFIL, D.; BELLINI, C. Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, n. June, p. 307–316, 2011.

PORFÍRIO, S. et al. Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 207–226, 2016a.

PORFÍRIO, S. et al. Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 204, p. 41–53, 2016b.

PRECI, D. et al. Desenvolvimento de iogurte light com extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e adição de probióticos. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 27–38, 2011.

RASMUSSEN, A. et al. Strigolactones Suppress Adventitious Rooting in Arabidopsis and Pea. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p. 1976–1987, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

REICHERT, C. L. et al. Chemical stability and dissolution study of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extract and some formulations. **International Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 8(1), p.33–49, 2013.

RODIGHERI, H. R. Rentabilidade econômica comparativa entre plantios florestais e sistemas agroflorestais com erva-mate, eucalipto e pinus e as culturas do feijão, milho, soja e trigo. **Circular Técnica EMBRAPA Florestas**, n. 26, p. 1–36, 1997.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and Novel Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 675–709, 2006.

SAIRANEN, I. et al. Soluble Carbohydrates Regulate Auxin Biosynthesis via PIF Proteins in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, n. 12, p. 4907–4916, 2012.

SANTOS, L. **Erva mate – O ouro verde do Paraná**. Disponível em: <<http://www.gazetadopovo.com.br/vida-e-cidadania/especiais/erva-mate/origen.s.jpg>>. Acesso em: 01 set. 2017.

SAMI, F. et al. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and**

**Biochemistry**, v. 109, p. 54–61, 2016.

SANTIN, D. et al. Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por miniestacas juvenis e por sementes. **Ciencia Florestal**, v. 25, n. 3, p. 571–579, 2015.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1071–1078, 2009.

SANTOS, G. A.; SANTOS, A. P.; KORNDÖRFER, G. H. Sistema por infravermelho próximo (NIR) para análise de nitrogênio foliar. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 83–90, 2012.

SARZI, I.; PIVETTA, K. F. L. Efeito das estações do ano e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de variedades de miniroseira (*Rosa* spp.). **Científica**, v. 332, n. 1, p. 62-68, 2005.

SCHWAMBACH, J. et al. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: A comparative study. **New Forests**, v. 36, n. 3, p. 261–271, 2008.

SHIOZAKI, S. et al. Hardwood Cuttings of Recalcitrant-to-Root Wild Grapes Native to East Asia : *Vitis davidii* and *Vitis kiusiana*. **Journal of Botany**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

SIGNOR, P. **Biomassa comercial de *Ilex paraguariensis* St.-Hil. e sua relação com variáveis ambientais em floresta com araucária, Paraná.** 90 p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Irati, 2013.

SOUZA, L. C. et al. Desenvolvimento de modelos de calibração NIRS para minimização das análises de madeiras de *Eucalyptus* spp. **Ciencia Florestal**, v. 21, n. 3, p. 589–597, 2011.

SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286–294, 2015a.

SOUZA, V. A.; AGUIAR, A. V.; SPOLADORE, J. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 315–323, 2015b.

STACHEVSKI, T.W.; FRANCISCON, L.; GOLDBACH, J.D. Efeito do meio de cultura na calogênese *in vitro* a partir de folhas de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.33, n.75, p.339-342, 2013.

STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The Physiology of Adventitious Roots 1. **Plant Physiology**, v. 170, n. February, p. 603–617, 2016.

STUEPP, C. A. et al. Age of stock plants, seasons and iba effect on vegetative

- propagation of *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, v. 41, n. 2, p. 1–7, 26 jun. 2017.
- STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate**. Curitiba, EMBRAPA-CNPQ, 1988. (Circular Técnica, 17).
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.
- TAKAHASHI, F. et al. Sugar-induced adventitious roots in Arabidopsis seedlings. **Journal of plant research**, v. 116, n. 2, p. 83–91, 2003.
- TAMURA, A. et al. Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1714–1723, 2013.
- THE PLANT LIST, 2013. **Aquifoliaceae**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Aquifoliaceae/>>. Acesso em: 23 mai.2017.
- TIMM, C. R. F. et al. Enraizamento de miniestacas herbáceas de porta-enxertos de pessegueiro sob efeito de ácido indolbutírico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 135–140, 2015.
- TRAVERS, S.; BERTELSEN, M.G.; KUCHERYAVSKIY, S. Predicting apple (cv. Elshof) postharvest dry matter and soluble solids content with near infrared spectroscopy. **Journal Science Food Agriculture**, v.94, p. 955–962, 2014.
- VATULESCU, A. D. et al. Cloning and characterisation of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 7–8, p. 609–615, 2004.
- VIANA, L.C. et al. Modelo de calibração e a espectroscopia no infravermelho próximo para predição das propriedades químicas e da densidade básica da madeira de *Eucalyptus*. **Ciência Florestal**, v.20, p.367-376, 2010.
- VIEIRA, E. L. et al. **Manual de fisiologia vegetal**. 1.ed. São Luís: EDUFMA, 2010. 230p.
- VIEIRA, M. A. et al. Chemical Characterization of Candy Made of Erva (*Ilex paraguariensis* A. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, p. 4637–4642, 2008.
- VIEIRA, M.T. (2009). Coca Cola com sabor oriental. Disponível em: <<http://blogs.lanacion.com.ar/vivir-en-japon/sabores-exoticos/coca-cola-con-sabor-oriental/>>. Acesso em 05 de Abr de 2017.
- WATZLAWICK, L. F. et al. Estrutura, diversidade e distribuição espacial da vegetação arbórea na Floresta Ombrófila Mista em Sistema Faxinal, Rebouças (PR). **Revista Ambiente**, v. 7, n. 3, p. 415–427, 2011.
- WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia**, 1999, 70 F. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal),

Departamento de Engenharia Florestal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

WENDLING, I.; DUTRA, L.F. **Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Sistema Semi-hidropônico**. Embrapa Florestas, 2008, 4p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 157).

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. (Ed.). **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 184 p.

WENDLING, I. et al. Seleção de matrizes e tipos de propágulos na enxertia de substituição de copa em *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, v.33, n.5, p.811-819, 2009.

WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: **CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. Anais. [Chapecó]: EPAGRI, 2003. s. 3-1., p. 1–8, 2003.**

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: Reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 473–486, 2014.

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

WENT, F. W. Auxin, the plant growth-hormone. **The Botanical Review**, v. 1, n. 5, p. 162–182, 1935.

WHITE, J.; LOVELL, P. H. Anatomical changes which occur in cuttings of *Agathis australis* (D. Don) Lindl 2. The initiation of root primordia and early root development. **Annals of Botany**, v. 54, p. 633–645, 1984.

WILLIAMS, L.E; LEMOINE, R.; SAUER, N. Sugar transporters in higher plants a diversity of roles and complex regulation. **Trends in Plant Science**, v.5, p. 283–290, 2000.

WORKMAN, J.J; WEYER L. **Practical guide to interpretive near- infrared spectroscopy**. CRC Press, New York, 120 p, 2007.

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

ZEM, L. M. et al. *Pereskia aculeata* nas quatro estações do ano em diferentes substratos. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 2, n. 3, p. 227–233, 2015.

ZHANG, W. et al. Mechanisms underlying the regulation of root formation in *Malus hupehensis* stem cuttings by using exogenous hormones. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 1, p. 174–185, 13 mar. 2017.

ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. et al. Enraizamento e morfo-anatomia de estacas caulinares de *Odontonema strictum* Kuntze (Acanthaceae). **Revista Brasileira Horticultura Ornamental**, v.11, n.1, p.57-61, 2005.

YAMAMOTO, L. Y. et al. Cutting rooting of *Psidium guajava* L. “Seculo XXI” guava treated with indolebutyric acid with talc and alcohol as a vehicle. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 5, p. 1037–1042, 2010.