

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL – PPGPV**

BRUNO NASCIMENTO

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Ilex paraguariensis* Saint Hilarei DE
DIFERENTES POPULAÇÕES**

LAGES

2022

BRUNO NASCIMENTO

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Ilex paraguariensis* Saint Hilarei DE
DIFERENTES POPULAÇÕES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, área de concentração em Melhoramento e Recursos Genéticos

Orientador: Prof. Dr. Adelar Mantovani

Coorientador: Prof. Dr. Marcio C. Navroski

LAGES

2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da Biblioteca
Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo autor**

Nascimento, Bruno

Propagação vegetativa de *Ilex paraguariensis* de diferentes populações / Bruno Nascimento. -- 2022.
165 p.

Orientador: Adelar Mantovani

Coorientador: Marcio Carlos Navroski

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2022.

1. Resgate. 2. Estaquia. 3. Genótipos. 4. Brotação de galhos. 5. Erva-mate. I. Mantovani, Adelar. II. Navroski, Marcio Carlos. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Titulo.

BRUNO NASCIMENTO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Ilex paraguariensis* Saint Hilarei DE DIFERENTES POPULAÇÕES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, área de concentração em Melhoramento e Recursos Genéticos

BANCA EXAMINADORA

Dr. Adelar Mantovani

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membros:

Dra. Mariane de Oliveira Pereira

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Dr. Ivar Wendling

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dr. Enéas Ricardo Konzen

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dra. Kelen Haygert Lencina

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Lages, 23 de fevereiro de 2022.

Dedico este trabalho ao meu querido avô, o “seu” Schmidt! Mesmo após quase cinco anos de sua ausência física, seus ensinamentos ainda me acompanham. “*Bruno, estuda! Porque isso é a única coisa que ninguém te tira!*”

AGRADECIMENTOS

Para termos uma ideia da grandiosidade desta tese, foram seccionados quase 13,0 mil propágulos, seja para a estaqueia ou estabelecimento *in vitro*. Assumindo que cada material deste levou cerca de 10 segundos para ficar pronto, foram necessárias 36 horas de trabalho para a elaboração de todas estas. Também, foram cortados mais de 250 galhos para sua brotação epicórmica e 60 plantas foram aneladas, levando aproximadamente 15 horas de serviço juntas. Tudo isto sem considerar o tempo de preparação dos experimentos, montagem de bandejas, preenchimento de tubetes, selamento dos galhos, remoção de plantas espontâneas, descontaminação de explantes, higienização de vidros e tubos de ensaio, viagens de coleta, entre várias outras atividades. Em que tudo isto acabou sendo devidamente distribuído em quase 20 experimentos e mais do que 45 avaliações, aumentando ainda mais esta carga horária.

Eu tenho profunda certeza de que 99,9% disto tudo que foi realizado não ocorreria caso dependesse apenas de mim! Nesta tese, estiveram envolvidas diretamente 20 pessoas que me auxiliaram em todas as atividades, mas este valor com certeza é no mínimo o dobro de forma indireta. Ao longo destes quatro anos algumas histórias se destacam, como quando o Luis me salvou de um possível enxame de abelhas ao me explicar para não matar a abelha que tinha me picado, a saída a campo em que eu e a Carol conversamos e contamos histórias sobre espíritos e assombrações a viagem inteira, ou quando a Betel deu uma de *Instagrammer* e nos filmou cortando um galho em uma de nossas coletas. Como esquecer da vez em que estávamos eu, Larissa e Alexandra, logo durante a primeira coleta da tese, indo de trator para uma área quando tomamos um banho de chuva que ocorreu do nada? Ou ainda de todos os procedimentos possíveis de descontaminação de explantes aplicados com o auxílio do Douglas que acabaram não dando certo, seguida de nossa indignação? Acho que uma das que mais ficaram marcadas foi a vez em que a Alexandra e a Thalia acharam que eu era mau motorista apenas porque quase fiz o motor do carro alugado cair ao passar em um buraco ou pedra. Não posso esquecer também do fatídico dia em que estávamos seccionando estacas no viveiro após uma coleta e surgiram ao menos dez desconhecidos, colegas do pessoal que já estava nos ajudando, que também nos ajudaram a finalizar os trabalhos – eram cerca de 15 pessoas fazendo estacas!

Nenhum trabalho teria sido realizado caso não fosse a bolsa concedida pela FAPESC, mas principalmente pela confiança em mim depositada pelos professores Adelar Mantovani e Marcio C. Navroski, igualmente importantes para o meu próprio desenvolvimento como pessoa e na supervisão e orientação, sendo infinitamente grato. Agradeço também à professora Mariane O. Pereira, não apenas pelas orientações relacionadas ao trabalho, mas também relacionados a

vida. Sou eternamente agradecido ao espírito de responsabilidade herdado de minha mãe, Roseli, que me ajudou a construir minha autoconsciência; a parceria dada pelo meu padrasto, Rogério, apoiando minhas escolhas para formulação de meu próprio caminho, mesmo eu tendo sido um adolescente rabugento; ao meu pai, Robinson, de quem eu adquiri tamanha criatividade e capacidade de sonhar, sempre me fazendo pensar à frente e nas infinitas possibilidades que nos aguardam, e; à minha sogra, Angela, a qual tem sido uma segunda mãe para mim por todo este período, me dando força e ânimo para seguir em frente, mas principalmente por me aturar. Sou agradecido também a mim, a quem me tornei após este período, percebendo que sou capaz de muito mais do que esperava ou imaginava, sempre agindo com perseverança mesmo em momentos árduos.

O meu maior agradecimento vai para a minha maior companheira, imprescindível para esta tese e para a minha vida, ao meu amor maior, a Alexandra. Todas as etapas deste trabalho envolveram ela de alguma forma, em que a sua liderança sempre foi ponto chave para o sucesso dos experimentos realizados. O que temos que levar para a viagem de coleta? A Alexandra tem uma lista muito detalhada. Como vamos identificar qual material é qual? A Alexandra já está etiquetando os pacotes com nome e número. Onde vamos fazer as estacas? A Alexandra acabou de colocar uma lona no chão e está buscando banquetas, baldes para descarte, baldes com água para manter as estacas, tesouras de poda e logo vai explicar para o pessoal que está ajudando a como fazer corretamente o trabalho. Estou atolado de coisas para fazer e ainda tenho que terminar um capítulo desta bendita tese, como vou dar conta? A Alexandra já afirmou que pode me ajudar a pesquisar por artigos e que eu sou uma besta de não lembrar disto. Ela possui uma capacidade de liderança e um conhecimento muito grande, o qual foi meu alicerce durante todo este tempo. Infelizmente não é possível realizar teses em dupla, porque se fosse, com certeza ela seria minha coautora!

RESUMO

Esta tese objetivou avaliar o resgate e a propagação vegetativa de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire de diferentes populações do Estado de Santa Catarina. Ao todo, foram elaborados cinco capítulos contemplando este propósito. O capítulo I objetivou resgatar dez genótipos de cinco populações, utilizando brotações de copa para a sua estaquia. Uma baixa sobrevivência e um enraizamento consideravelmente nulo foi constatado para as populações, enquanto apenas 20 dos 50 genótipos testados sobreviveram. A possível razão destes resultados ocorreu em função das elevadas temperaturas do ambiente de enraizamento e o grau de maturação do material. O estudo do capítulo II teve como finalidade avaliar a brotação epicórmica a partir do anelamento completo e a sua estaquia em comparação ao material de copa, associado à adubação NPK. Todas as variáveis resultaram em elevadas porcentagens de brotação, mas sem haver uma associação com quaisquer doses de adubo, enquanto a estaquia do material revigorado foi superior. Os resultados de brotação se justificam pela qualidade química pré-existente do solo, e a estaquia pelo maior vigor do material epicórmico. O objetivo do capítulo III foi testar a estaquia de duas populações, obtendo sete genótipos de cada em função das estações do ano e em dois ambientes de enraizamento. Todos os tratamentos foram significativos, em que o melhor enraizamento foi obtido durante o verão para ambas as populações no estufim. Estes resultados podem ser explicados pela maior e mais eficiente atividade fisiológica das plantas mãe, além da melhor capacidade em manter a umidade elevada para o ambiente citado. No capítulo IV foi avaliada a brotação epicórmica de galhos destacados de acordo com sua população de origem, diâmetro, e sentido de armazenamento. As variáveis avaliadas resultaram em medidas que diferiram entre os tratamentos de maneira mais evidente para os galhos de maior diâmetro, em que a maior vida útil foi presente em galhos dispostos horizontalmente, mas a maior e mais rápida produtividade ocorreu em galhos dispostos verticalmente. A maior reserva energética e a maior presença de gemas dormentes em galhos tortuosos podem explicar estes resultados. Por fim, o capítulo V objetivou avaliar o seu estabelecimento *in vitro*, utilizando brotações epicórmicas e da copa de duas populações, sob diferentes LED's. Todos os experimentos e tratamentos apresentaram elevadas porcentagens de oxidação e contaminação. Isto se justifica pela grande presença de contaminantes endógenos que a espécie apresenta, mesmo em material revigorado. Todavia, foi detectado uma possível utilização de LED azul para reduzir a contaminação bacteriana.

Palavras-chave: Resgate; Estaquia; Genótipos; Brotação de galhos; Erva-mate.

ABSTRACT

Title: Vegetative propagation of *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire of different populations. This thesis aimed to evaluate the rescue and vegetative propagation of *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire from different populations in the State of Santa Catarina. Thus, five chapters were prepared contemplating this purpose. Chapter I aimed to rescue ten genotypes from five populations, using canopy sprouts for cutting. A low survival and a considerably null rooting was observed for the populations, while only 20 of the 50 tested genotypes survived. The possible reason for these results was due to the high temperatures of the rooting environment and the maturation degree of the material. The study of chapter II aimed to evaluate the epicormic sprouting from the complete girdling and its cuttings compared to the canopy material, associated with NPK fertilization. All the variables resulted in high percentages of sprouting, but without any association with any fertilizer doses, while the cutting of the reinvigorated material was superior. The sprouting results are justified by the pre-existing chemical quality of the soil, and the cutting by the greater vigor of the epicormic material. The objective of chapter III was to test the cuttings of two populations, obtaining seven genotypes of each according to the seasons and in two rooting environments. All treatments were significant, which the best rooting was obtained during the summer for both populations in the mini tunnel. These results can be explained by the greater and more efficient physiological activity of the mother plants, in addition to the better ability to maintain high humidity in the mentioned environment. In chapter IV, the epicormic sprouting of detached branches was evaluated according to their population of origin, diameter, and storage direction. The variables evaluated resulted in measures that differed between treatments more evidently for branches of larger diameter, in which the longest shelf life was present in branches arranged horizontally, but the highest and fastest productivity occurred in branches arranged vertically. The greater energy reserve and the greater presence of dormant buds in crooked branches may explain these results. Finally, chapter V aimed to evaluate its establishment *in vitro*, using epicormic and canopy sprouts from two populations, under different LEDs. All experiments and treatments showed high percentages of oxidation and contamination. This is justified by the large presence of endogenous contaminants that the species presents, even in reinvigorated material. However, a possible use of blue LED to reduce bacterial contamination was detected.

Keywords: Rescue; Cuttings; Genotypes; Sprouting of branches; Yerba-mate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Dados das temperaturas (°C) médias, máximas e mínimas, e umidade relativa do ar (%) para o tempo de ocorrência de experimentos de estaquia e galhos destacados (de setembro de 2019 a fevereiro de 2020 e de setembro de 2020 a novembro* de 2021) no município de Lages, Santa Catarina	49
Figura 2 — Dados das temperaturas (°C) médias, máximas, mínimas, e umidade relativa do ar (%) para o tempo de ocorrência de experimentos de estaquia e brotação de galhos destacados, de setembro* de 2019 a fevereiro* de 2020, e de setembro de 2020 a novembro de 2021, no estufim (ambiente I) e casa de vegetação com irrigação por nebulização intermitente (ambiente II)	52
Figura 3 — Fluxograma dos experimentos realizados, de acordo com os seus reajustes e formulação de novas hipóteses	55
Figura 4 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> de cinco populações em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm e menores do que 2 cm	64
Figura 5 — Estaquia de <i>I. paraguariensis</i> após a instalação do experimento (a) e na sua avaliação final aos 150 dias (b)	66
Figura 6 — Exemplos de brotação epicórmica de <i>I. paraguariensis</i> a partir de galhos destacados finos (a), finos e pouco lignificados (b), grossos aos 30 dias (c) e grossos aos 60 dias (d)	68
Figura 7 — Exemplos de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> considerados não mais produtíveis, seja pelo possível desgaste energético em galhos finos (a e b) ou pela excessiva oxidação das brotações epicórmicas em galhos grossos (c e d)	69
Figura 8 — Exemplos de seleção de plantas mãe de <i>I. paraguariensis</i> à campo com fitas de diferentes colorações (a e b), do seu posterior anelamento completo do caule (b), da aplicação dos tratamentos de adubação (c) e sua incorporação ao solo (d).....	75
Figura 9 — Sobrevida (%) de galhos destacados de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d)	111
Figura 10 — Brotação (%) de galhos destacados de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d).....	111

Figura 11 — Início da brotação de galhos destacados grossos de <i>I. paraguariensis</i> da população de TB.....	112
Figura 12 — Número de brotações de galhos destacados de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d)	112
Figura 13 — Comprimento de brotações (cm) de galhos destacados de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d)	113
Figura 14 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> da população de TB de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm.....	114
Figura 15 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> da população de UR de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm.....	114
Figura 16 — Sobrevida (%) de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d)	115
Figura 17 — Brotão (%) de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d). .	116
Figura 18 — Número de brotações de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d)	117
Figura 19 — Comprimento de brotações (cm) de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d)	117
Figura 20 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> mantidos verticalmente de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm.....	118

Figura 21 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> mantidos horizontalmente de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm	118
Figura 22 — Exemplos do estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>I. paraguariensis</i> em vidros sem contaminação (a), com contaminação intermediária (b) e elevada (c), e tubos de ensaio com somente contaminação bacteriana intermediária (d), bacteriana e fúngica intermediária (e) e bacteriana e fúngica elevada (f)	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Relação de capítulos e experimentos dos estudos propagação vegetativa de <i>I. paraguariensis</i> de diferentes populações.....	45
Tabela 2 — Resumo das características meteorológicas e ambientais, de tipologia florestal e de solos das populações de <i>I. paraguariensis</i> de estudo	46
Tabela 3 — Resumo das principais características dos experimentos e análises da propagação vegetativa de <i>I. paraguariensis</i>	56
Tabela 4 — Diâmetro na altura do peito (DAP) dos indivíduos de <i>I. paraguariensis</i> de cinco populações (CT, CM, PL, TB e UR), em que foram coletadas brotações para elaboração de experimento de estaquia e coleta de galhos destacados para produção de brotações epicórmicas	60
Tabela 5 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), brotação (%) e permanência das folhas originais (%) em estacas de <i>I. paraguariensis</i> de cinco populações e seus genótipos	62
Tabela 6 — Médias de brotação (%), número de brotações e comprimento de brotações (cm) de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i> de cinco populações.	63
Tabela 7 — Diâmetro na altura do peito (DAP) dos indivíduos de <i>I. paraguariensis</i> adubados, em que houve aplicação da técnica de anelamento completo para produção de brotações epicórmicas.....	73
Tabela 8 — Análise química do solo previamente à adubação de <i>I. paraguariensis</i>	74
Tabela 9 — Composição (g) de N, P e K para cada tratamento de adubação aplicado em <i>I. paraguariensis</i>	74
Tabela 10 — Médias de brotação (%), número de brotações e comprimento de brotações (cm) da brotação epicórmica de <i>I. paraguariensis</i> adubadas com NPK e aneladas	77
Tabela 11 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> para a relação entre a adubação com NPK, brotações de copa e epicórmicas em duas épocas de coleta	78
Tabela 12 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> para a relação entre brotações de copa e epicórmicas em duas épocas de coleta	79

Tabela 13 — Diâmetro na altura do peito (DAP) dos indivíduos de <i>I. paraguariensis</i> de acordo com duas populações (TB e UR) nas quatro estações do ano, utilizadas para a obtenção de brotações de copa para a estaqueia.....	89
Tabela 14 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> para a relação entre a estação do ano e duas populações em os ambientes de enraizamento	91
Tabela 15 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> para a relação entre duas populações em dois ambientes de enraizamento	92
Tabela 16 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> da população de Três Barras (TB) obtidas na primavera e verão para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento	94
Tabela 17 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> da população de Três Barras (TB) obtidas no outono e inverno para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento	95
Tabela 18 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> da população de Urupema (UR) obtidas na primavera e verão para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento	97
Tabela 19 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de <i>I. paraguariensis</i> da população de Urupema (UR) obtidas no outono e inverno para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento	98
Tabela 20 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de brotações de copa de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i>	119

Tabela 21 — Médias de oxidação (%), contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) de propágulos de uma população de <i>I. paraguariensis</i> utilizados no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes lâmpadas LED	132
Tabela 22 — Relação entre as porcentagens de oxidação (%) e contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) para o número de propágulos de <i>I. paraguariensis</i> estabelecidos <i>in vitro</i> sem estas condições, de acordo com duas populações e diferentes lâmpadas LED	133
Tabela 23 — Médias de oxidação (%), contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) de propágulos de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> utilizados no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes lâmpadas LED	134
Tabela 24 — Médias de oxidação (%), contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) de propágulos de material revigorado de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> utilizados no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes lâmpadas LED	135

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de cinco populações de <i>I. paraguariensis</i> e seus genótipos	159
ANEXO B — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de brotação epicórmica de galhos destacados de cinco populações de <i>I. paraguariensis</i>	159
ANEXO C — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de adubação de <i>I. paraguariensis</i> para o resgate de brotações epicórmicas oriundas da técnica de anelamento completo.	160
ANEXO D — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de <i>I. paraguariensis</i> de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas	160
ANEXO E — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento	161
ANEXO F — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de genótipos de <i>I. paraguariensis</i> da população de TB de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento.....	162
ANEXO G — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de genótipos de <i>I. paraguariensis</i> da população de UR de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento.....	163
ANEXO H — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de brotações obtidas de galhos destacados de <i>I. paraguariensis</i>	164
ANEXO I — Significância estatística das variáveis observadas para a fonte de variação do experimento de estabelecimento in vitro de uma população de <i>I. paraguariensis</i> sob diferentes lâmpadas LED	164
ANEXO J — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estabelecimento in vitro de duas populações de <i>I. paraguariensis</i> sob diferentes lâmpadas LED	164
ANEXO K — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estabelecimento in vitro de duas populações de <i>I.</i>	

<i>paraguariensis</i> com uso de material revigorado sob diferentes lâmpadas LED	165
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ad	Experimento de adubação
AE%	Acurácia Experimental em porcentagem
CAP	Circunferência à altura do peito (1,3 m)
CM	Cruz Machado
CM n	Número (n) do genótipo da população de Cruz Machado
CT	População de Catanduvas
CT n	Número (n) do genótipo da população de Catanduvas
CVNI	Casa de vegetação com nebulização intermitente
DAP	Diâmetro à altura do peito (1,3 m)
EsAd	Experimento de estaquia com material previamente adubado
EsEpi	Experimento de estaquia com material de origem epicórmica
Esn	Número de ordem (n) de experimentos de estaquia
eTB	Estação do ano (e) da população/genótipo de Três Barras
eUR	Estação do ano (e) da população/genótipo de Urupema
Gan	Número de ordem (n) de experimentos de galhos destacados
Gg	Experimento de análise genética utilizando SELEGEN
LAPROMEF	Laboratório de Propagação e Melhoramento Florestal
Min	Número de ordem (n) de experimentos de estabelecimento <i>in vitro</i>
PL	Painel
PL n	Número (n) do genótipo da população de Painel
TB	Três Barras
TB n	Número (n) do genótipo da população de Três Barras
UR	Urupema
UR n	Número (n) do genótipo da população de Urupema

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	23
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1	SOBRE A ESPÉCIE	27
2.1.1	Área de ocorrência	27
2.1.2	Dendrologia.....	27
2.1.3	Morfotipos.....	28
2.2	USOS DA ESPÉCIE.....	30
2.2.1	Produtos	30
2.2.2	Relação entre espécie e produtor	31
2.2.3	Fatores econômicos	32
2.3	PRODUÇÃO DE MUDAS DA ESPÉCIE A PARTIR DE SEMENTES	33
2.3.1	Dormências e outras dificuldades de germinação	33
2.4	PRODUÇÃO DE MUDAS DA ESPÉCIE A PARTIR DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	34
2.4.1	Maturação e técnicas de revigoramento para o resgate vegetativo	35
2.4.2	Resgate de galhos destacados para produção de brotações	38
2.4.3	Estaquia e miniestaquia.....	38
2.4.4	Micropropagação	41
3	METODOLOGIAS COMUNS	45
3.1	ORDEM DE CAPÍTULOS E EXPERIMENTOS	45
3.2	METODOLOGIAS COMUNS	45
3.2.1	Caracterização das populações de origem	46
3.2.2	Seleção dos indivíduos	47
3.2.3	Coleta de brotações e de galhos	48
3.2.4	Transporte do material vegetal.....	48
3.2.5	Processamento do material vegetal.....	50
3.2.6	Acondicionamento das estacas e galhos destacados.....	50
3.2.7	Variáveis analisadas.....	53
3.2.8	Análise estatística comum a todos os experimentos	54
3.3	RESUMO DOS EXPERIMENTOS.....	54
4	CAPÍTULO I – RESGATE E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> DE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	57
4.1	RESUMO	57

4.2	ABSTRACT	57
4.3	INTRODUÇÃO	58
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.4.1	Estaquia de diferentes populações e genótipos	60
4.4.2	Brotação epicórmica de galhos destacados de cinco populações	61
4.5	RESULTADOS	61
4.5.1	Estaquia em diferentes populações e genótipos	61
4.5.2	Brotação epicórmica de galhos destacados de cinco populações	63
4.6	DISCUSSÃO	65
4.6.1	Estaquia de diferentes populações e genótipos	65
4.6.2	Brotação epicórmica de galhos destacados de cinco populações	67
4.7	CONCLUSÃO	69
5	CAPÍTULO II – ADUBAÇÃO DE <i>Ilex paraguariesis</i> PARA O RESGATE VEGETATIVO E SUA PROPAGAÇÃO POR ESTAQUIA	70
5.1	RESUMO	70
5.2	ABSTRACT	70
5.3	INTRODUÇÃO	71
5.4	MATERIAIS E MÉTODOS	73
5.4.1	Adubação para o resgate de brotações epicórmicas	73
5.4.2	Estaquia de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas	75
5.5	RESULTADOS	76
5.5.1	Adubação para o resgate de brotações epicórmicas	76
5.5.2	Estaquia de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas	77
5.6	DISCUSSÃO	80
5.6.1	Adubação para o resgate de brotações epicórmicas	80
5.6.2	Estaquia de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas	82
5.7	CONCLUSÃO	84
6	CAPÍTULO III – INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS E AMBIENTES NA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE <i>Ilex paraguariensis</i> POR ESTAQUIA	85
6.1	RESUMO	85
6.2	ABSTRACT	85
6.3	INTRODUÇÃO	86
6.4	MATERIAIS E MÉTODOS	88
6.4.1	Estaquia de duas populações de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento	88

6.4.2	Estaquia de genótipos da população de Três Barras e Urupema de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento	89
6.5	RESULTADOS	90
6.5.1	Estaquia de duas populações de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento	90
6.5.2	Estaquia de genótipos da população de Três Barras de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento	93
6.5.3	Estaquia de genótipos da população de Urupema de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento	96
6.6	DISCUSSÃO	99
6.6.1	Estaquia de duas populações e seus genótipos em função das estações do ano e dois ambientes de enraizamento	99
6.7	CONCLUSÃO	104
7	CAPÍTULO IV – BROTAÇÃO EPICÓRMICA DE GALHOS DESTACADOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> PARA A PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	105
7.1	RESUMO	105
7.2	ABSTRACT	106
7.3	INTRODUÇÃO	106
7.4	MATERIAIS E MÉTODOS	108
7.4.1	Brotação epicórmica de galhos destacados de duas populações de acordo com seu diâmetro	109
7.4.2	Brotação epicórmica de galhos destacados de acordo com seu diâmetro e sentido de armazenamento	109
7.4.3	Estaquia de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados	110
7.5	RESULTADOS	110
7.5.1	Brotação epicórmica de galhos destacados de duas populações de acordo com seu diâmetro	110
7.5.2	Brotação epicórmica de galhos destacados de acordo com seu diâmetro e sentido de armazenamento	115
7.5.3	Estaquia de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados	119
7.6	DISCUSSÃO	120
7.6.1	Brotação epicórmica de galhos destacados	120
7.6.2	Estaquia de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados	123
7.7	CONCLUSÃO	125
8	CAPÍTULO V – ESTABELECIMENTO IN VITRO DE <i>Ilex paraguariensis</i> SOB DIFERENTES FONTES DE ILUMINAÇÃO ARTIFICIAL	126
8.1	RESUMO	126
8.2	ABSTRACT	126

8.3	INTRODUÇÃO	127
8.4	MATERIAIS E MÉTODOS	129
8.4.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de uma população sob diferentes lâmpadas LED	131
8.4.2	Estabelecimento <i>in vitro</i> de duas populações sob diferentes lâmpadas LED.....	131
8.4.3	Estabelecimento <i>in vitro</i> de duas populações sob diferentes lâmpadas LED a partir de brotações epicórmicas de galhos destacados.....	131
8.5	RESULTADOS	132
8.5.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de uma população sob diferentes lâmpadas LED	132
8.5.2	Estabelecimento <i>in vitro</i> de duas populações sob diferentes lâmpadas LED.....	133
8.5.3	Estabelecimento <i>in vitro</i> de duas populações sob diferentes lâmpadas LED a partir de brotações epicórmicas de galhos destacados.....	134
8.6	DISCUSSÃO	135
8.6.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes lâmpadas de LED	135
8.7	CONCLUSÃO	139
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
	REFERÊNCIAS	143
	ANEXOS	159

1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae) é naturalmente distribuída pelo Sul da América do Sul, sendo sua maior distribuição no Brasil, principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, mas também no Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (ESMELINDRO *et al.*, 2002; LORENZI, 2016; FLORA DO BRASIL, 2020). No Sul do país, está inserida nas Florestas Ombrófila Mista com característica Montana, Altomontana e Estacional Semidecidual, comumente em locais com a presença de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze (MARTINS-RAMOS *et al.*, 2011).

Trata-se de uma espécie muito explorada para o consumo regional, na elaboração de chimarrão e chás (REICHERT *et al.*, 2013), mas possui grande potencial farmacêutico e alimentício devido à presença de fitoquímicos, como a cafeína e teobromina (DARTORA *et al.*, 2013). Por isto, é um dos principais produtos florestais não madeireiros produzidos no país e tem apresentado contínuo crescimento econômico e de produção nos últimos anos. Em relação à última década, embora não ajustado, o valor econômico da produção cresceu em mais de cinco vezes, com um aumento superior a 80% na produtividade (IBGE, 2021).

A utilização da matéria-prima de *I. paraguariensis* é de extrema importância para o pequeno produtor rural, o qual utiliza suas folhas como fonte de renda familiar em períodos em que não há produção agrícola (LOURENÇO *et al.*, 1997). Por se tratar de uma atividade no âmbito familiar (VASCONCELLOS, 2012), pode ser comum que a falta de conhecimento técnico acarrete problemas de manejo (MEDRADO *et al.*, 2002, 2005), ocasionando em uma diminuição geral da produtividade ao longo do tempo. Umas das principais formas de superar esta problemática está na utilização de novas mudas para recompor ou renovar o erval (MEDRADO *et al.*, 2005), preferencialmente com características superiores, a fim de melhorar a qualidade do produto final (WENDLING e BRONDANI, 2015).

É comum que pequenos produtores rurais utilizem sementes próprias ou de vizinhos para produzir novas mudas de *I. paraguariensis*, ou ainda adquiram mudas prontas de viveiros locais de origem seminal, visto o baixo custo e a aceitável produtividade (SCHUMANN, 2002; OLIVEIRA e WAQUIL, 2015). Entretanto, existem certas dificuldades na utilização desta via propagativa, sendo em função de problemas com a semente e na própria diversidade genética.

Corriqueiramente, a semente desta espécie pode estar vazia, com resquícios de predação ou de deterioração (CARVALHO, 2003; OLIVEIRA, 2013; SOUZA *et al.*, 2020). Em relação às sementes sem estes problemas, o principal problema na sua germinação ocorre em função da presença de dormências. De forma constatada, as sementes podem possuir a dormência física,

em que não há absorção de água devido à rigidez tegumentar (FOWLER e STURION, 2000), dormência fisiológica, existindo alguma substância que impede que o embrião se desenvolva mesmo na presença de água (SOUZA, 2018), e dormência morfológica, em que mesmo sob condições favoráveis e na absorção de água a semente não germina, visto que o embrião ainda não está maduro (CUQUEL *et al.*, 1994; FOWLER e STURION, 2000).

O uso de sementes de *I. paraguariensis* para produção de mudas amplia sua diversidade genética, sendo extremamente importante para sua seleção natural e adaptação ao ambiente (XAVIER *et al.*, 2013). Entretanto, em termos de produção, áreas naturais ou de plantios de indivíduos com elevada variabilidade genética podem dificultar a padronização da qualidade do material e da produtividade. A baixa disponibilidade de sementes passíveis de germinação e o aumento do consumo do mercado interno e externo, força os produtores a utilizar material de baixa qualidade, ou ao menos com origem genética desconhecida (MEDRADO *et al.*, 2000; WENDT, 2005).

Uma possível maneira de superar os problemas de dormências e da variabilidade genética das sementes para a produção de mudas está na utilização de técnicas de propagação vegetativa, selecionando indivíduos específicos com características de interesse (WENDLING e BRONDANI, 2015). Entretanto, existem diversos fatores que podem dificultar a utilização desta técnica, como o grau de maturação, plantas mãe bem nutritas ou não, a técnica de propagação propriamente dita, populações de origem, os genótipos de uma mesma população e o ambiente de enraizamento. Ainda, torna-se importante ressaltar as diferenças entre resgate vegetativo e propagação vegetativa, sendo a primeira quaisquer métodos de obtenção de brotos, podendo apresentar características de maior ou menor vigor vegetativo, enquanto o segundo se tratam de técnicas aplicadas nas brotações obtidas a fim de produzir raízes nos propágulos, obtendo assim novos indivíduos (STUEPP *et al.*, 2018).

O elevado grau de maturação presente em indivíduos adultos é considerado como uma das principais causas do baixo enraizamento de propágulos de *I. paraguariensis* (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2018), visto que é na fase madura que são determinadas características superiores. Isto ocorre devido à diminuição da atividade fisiológica com o passar do tempo, ocasionada pelo aumento da idade ontogenética, resultando em uma menor atividade metabólica e consequentemente menor diferenciação celular (HARTMANN *et al.*, 2011). Entretanto, vários estudos vêm sendo realizados visando a superação desta maturação, com resultados muito positivos, principalmente pela emissão de brotações epicórmicas, com maior vigor (WENDLING *et al.*, 2013; STUEPP *et al.*, 2015, 2017a, 2017b, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2018, 2019a, 2019b). Dentre todas as técnicas de resgate para a superação da maturidade,

o anelamento completo do caule, corte da planta mãe, e a utilização de galhos destacados possuem destaque para a espécie.

É comum que a erva-mate esteja presente em locais onde o solo possui elevada acidez e baixa fertilidade, ainda não sendo completamente entendidas suas necessidades nutricionais (SANTIN *et al.*, 2015). Sabe-se que os elementos N, P e K possuem elevada importância em todas as etapas do desenvolvimento vegetativo das plantas, sendo N considerado o mais importante visto sua participação na síntese hormonal. Este elemento pode refletir em uma maior produtividade de hormônios vegetais, podendo interferir diretamente no resgate e na propagação vegetativa (HARTMANN *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2019a).

Dentre as técnicas de propagação vegetativa, as mais estudadas para *I. paraguariensis* podem ser consideradas a estaquia, miniestaquia e micropropagação. A estaquia consiste na obtenção de brotações de plantas mãe a campo, podendo ou não serem utilizadas técnicas de maneira prévia que visem o revigoramento do material, aumentando suas chances de enraizamento na propagação vegetativa (WENDLING e BRONDANI, 2015). Diferentemente da estaquia, a miniestaquia consiste na propagação vegetativa de materiais de maior vigor, mantidos em ambiente propício, a partir de minicepas originadas de sementes ou de propagação vegetativa com clones pré-estabelecidos de características desejáveis (BISOGNIN *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2021). Na micropropagação há maior controle das variáveis que promovem o enraizamento dos propágulos, possibilitando a produção de maiores quantidades de indivíduos selecionados em um curto prazo, mas que possui determinadas dificuldades, principalmente quanto a sua porcentagem de oxidação (DUTRA e SILVA, 2009).

Esta espécie está presente em diversas regiões, sob diferentes características ambientais que exercem pressão da seleção natural, fazendo com que haja populações adaptadas aos seus ambientes. Tais diferenças entre populações e seus genótipos, visto que se trata de uma espécie com grande variação genética entre indivíduos de mesmas regiões (SILVA, 2019; STEDILLE, 2020), podem servir como um fator determinante no sucesso desta propagação (WENDLING e BRONDANI, 2015). Isto está presente desde a propagação via estaquia a partir do resgate de plantas mãe em ambientes naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2020), quanto para a miniestaquia, com clones bem estabelecidos (BISOGNIN *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2020). Portanto, a seleção correta dos indivíduos a campo é crucial para o sucesso do enraizamento de propágulos, principalmente para a estaquia, embora esta ocorra comumente em função das características desejáveis, tais como uma elevada produtividade, o que pode não necessariamente refletir em uma efetiva propagação vegetativa.

Influenciando diretamente na propagação vegetativa, o ambiente de enraizamento pode influenciar diretamente na capacidade de enraizamento dos propágulos, em que condições mínimas de umidade e temperatura devem ser atendidas (XAVIER *et al.*, 2013). A estquia de *I. paraguariensis*, em uma perspectiva geral, tende a não exigir ambientes de enraizamento com controle das variáveis ambientais, sendo favorecida pela umidade e temperaturas elevadas e homogêneas (BRONDANI *et al.*, 2008, 2009). Entretanto, quando se considera diferentes genótipos, os resultados podem ser diferenciados em função de diferentes ambientes, em que a maior umidade pode garantir a maior sobrevivência, mas talvez não correspondendo ao melhor enraizamento (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Desta forma, como hipótese fundamental deste trabalho, considera-se que diferentes populações desta espécie podem apresentar diferentes capacidades de propagação vegetativa, podendo ser afetadas pelo grau de maturação dos indivíduos, pela sua nutrição, técnica de resgate e propagação utilizadas, e o ambiente de enraizamento. Assim, o objetivo desta tese foi avaliar o resgate e a propagação vegetativa de diferentes populações de *I. paraguariensis*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SOBRE A ESPÉCIE

2.1.1 Área de ocorrência

Erva-mate, mate ou yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire), é uma espécie arbórea pertencente à família Aquifoliaceae. Possui ampla distribuição na região Sul da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (OLIVERIA e ROTA, 1985; CARVALHO, 1994; 2003; GUGLIUCCI e STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996; DARTORA *et al.*, 2013). Ocorre predominantemente no Sul do Brasil, contemplando principalmente os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, mas em menores proporções nos Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (SAINT-HILAIRE, 1995; CARVALHO, 1994, 2003; ESMELINDRO *et al.*, 2002; LORENZI, 2016; FLORA DO BRASIL, 2020).

Esta espécie ocorre comumente nas Florestas Ombrófila Mista Montana, Altomontana e Estacional Semidecidual, mas pode ocorrer naturalmente em ambientes isolados a partir de condições ambientais favoráveis ou de plantios, estando comumente associada à espécie *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze (OLIVEIRA e ROTA, 1985; CARVALHO, 1994, 2003; MARTINS-RAMOS *et al.*, 2011). Pode ser encontrada em campos naturais desde que estes locais tenham tido algum meio de contato com matas nativas anteriormente. Sua distribuição corresponde à 3% da área da América do Sul (540 mil km²) e aproximadamente 5% da área do Brasil (450 mil km²), ocorrendo em altitudes entre 500,0 e 1.500,0 m do nível do mar (OLIVEIRA e ROTA, 1985).

2.1.2 Dendrologia

Possui tronco cilíndrico reto ou tortuoso, podendo atingir até 15 m de altura com copa baixa e folhagem de cor verde escura. Suas folhas são obovadas, estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice, com aproximadamente 10 cm de comprimento, 5 cm de largura, e com pecíolo de até 1,5 cm, sendo coriáceas, espessas e de característica discolor. Sua filotaxia é alterna simples, sendo uma espécie de hábito principalmente do tipo árvore e de classificação do tipo clímax (EDWING e REITZ, 1967; REITZ *et al.*, 1979; MATTOS, 1985; MAZUCHOWSKI, 1991; DA CROCE, 1999). É recomendada para a arborização devido seu

porte e forma, para a recuperação de ecossistemas degradados por sua adaptação e na restauração de matas ciliares (CARVALHO, 2003).

No desenvolvimento inicial os indivíduos possuem ambos os sexos, mas um é abortado ou malformado, gerando indivíduos com flores pistiladas e outros com flores estaminadas (CATAPAN, 1998; CARVALHO, 2003; PIRES *et al.*, 2014). A proporção entre os sexos pode variar de acordo com o local, entre oito masculinas para cinco femininas em locais do Paraná (STURION *et al.*, 1995), de um para um no planalto catarinense (PIRES, 2012; PIRES *et al.*, 2014), e sete masculinos para cinco femininos em ervais do Rio Grande do Sul (FERREIRA *et al.*, 1983). O início da floração ocorre em média aos cinco anos de idade, comumente entre os meses de setembro e dezembro, mas mais predominantemente em outubro (REITZ *et al.*, 1988; CARVALHO, 1994, 2003; LIEBSCH e MIKICH, 2009). A polinização ocorre principalmente pela via entomófila, sendo realizada por inúmeros insetos (PIRES *et al.*, 2014), embora a possibilidade de transporte de pólen pelo vento não esteja descartada (FERREIRA *et al.*, 1983).

Os frutos maduros podem ser encontrados entre os meses de dezembro a abril, passando de uma cor esverdeada para um violeta-escuro (ZANON, 1988; CARVALHO, 1994). O amadurecimento dos frutos é heterogêneo dentro de uma mesma planta, podendo ser encontrados verdes, maduros e frutos que ultrapassaram o período de maturação, ainda ligados à planta mãe (ZANON, 1988). O fruto é o endocarpo onde está aderida internamente a semente, possuindo tegumento membranáceo de forma variável e coloração clara, sendo o embrião minúsculo e rudimentar (KUNIYOSHI, 1983). A semente em si é considerada dura sendo um pirênio trigonal, de tegumento fino de coloração amarelo-clara ou parda, com três saliências no dorso convexo (FERREIRA, 1995). A dispersão de suas sementes é zoocórica, comumente realizada por pequenos pássaros, como sabiás, os quais se alimentam dos frutos maduros (CARVALHO, 1994; CARVALHO 2003; DICKELE *et al.*, 2011).

2.1.3 Morfotipos

A espécie pode apresentar diferentes morfotipos, que consistem em singelas alterações que podem ocorrer na morfologia de órgãos específicos de uma mesma espécie, variando de acordo com as populações ou variedades. Estas diferenças morfológicas podem refletir em diferentes quantidades de determinados compostos químicos, como taninos, cafeína e teobromina (SANTIN *et al.*, 2015). No Estado do Paraná foram identificados morfologicamente três tipos de *I. paraguariensis* (REISSMAN *et al.*, 2003; DÜNISCH *et al.*, 2004; SANTIN *et al.*, 2015): I) Morfotipo amarelinha: o limbo foliar apresenta uma tonalidade mais clara e as

nervuras principais e secundárias mais amareladas; II) Morfotipo cinza: o limbo apresenta uma tonalidade mais cinza-esverdeada sendo as nervuras mais amareladas; III) Morfotipo sassafrás: o limbo apresenta uma tonalidade verde-escuro brilhante e as nervuras em tom mais claro, podendo lembrar a coloração do limbo de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer.

De forma geral, também pode apresentar variações morfológicas em grande escala para a Argentina e os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MATTOS, 1985). A Argentina pode apresentar variedades de folhas largas, sendo as *yerba caá blanca*, *yerba caá amarilla* e a *yerba caá colorada*, e uma variedade de folhas pequenas, *yerba caá mini*. Para Santa Catarina, os morfotipos consistem em: I) folhas pequenas, coriáceas e talo branco; II) folhas pequenas, coriáceas e talo roxo; III) folhas grandes, membranáceas e talo roxo, e; IV) folhas grandes, membranáceas e talo branco. Para o Rio Grande do Sul, podem consideradas três morfologias principais: I) do talo roxo, de folhas obovado-oblongas com ápice obtuso ou agudo, ou folhas oblanceadas com ápice agudo, e; II) do talo branco, mas com demais características semelhantes da anterior, e; III) piriquita, de folhas obovado-oblongas com ápice subarredondado ou obtuso.

Os morfotipos podem estar diretamente relacionados à composição química das folhas (REISSMANN *et al.*, 2003; BORILLE *et al.*, 2005; KASEKER *et al.*, 2010), assim como a própria morfologia de acordo com a procedência do material (OLIVA, 2007). Para tanto, a condição nutricional da planta está relacionada com diversos fatores, desde seu genótipo, sua forma e arquitetura, idade da folha e da planta, condições climáticas, de solo e de manejo, e na presença de pragas e agentes patogênicos (MARSCHNER, 1986; JONES JUNIOR *et al.*, 1991). É possível que a relação entre morfotipos e suas diferenças nutricionais estejam ligadas à população de origem ou até mesmo ao genótipo, uma vez que fatores como incidência de luz e idade são facilmente controláveis nesta espécie (KASEKER *et al.*, 2010). Aparentemente, alguns nutrientes foliares podem ser reflexo direto dos nutrientes encontrados no solo, principalmente no morfotipo cinza, podendo este fator ser melhor manejado para obtenção de compostos fitoquímicos em maior quantidade (BORILLE *et al.*, 2005).

Esta relação entre a composição química e a morfologia pode sofrer variação de acordo com os períodos de colheita de *I. paraguariensis*, que podem representar condições ecofisiológicas distintas. Além das variações químicas das folhas presentes nos morfotipos, estes podem apresentar níveis de compostos fitoquímicos como cafeína, teobromina e taninos de maneira diferenciada (REISSMANN *et al.*, 2003; SANTIN *et al.*, 2015).

2.2 USOS DA ESPÉCIE

O uso de *I. paraguariensis* ocorria previamente à colonização da América do Sul, sendo suas folhas consumidas nas formas de chá e extratos pelos povos habitantes, principalmente os Guaranis, os quais já conheciam suas propriedades estimulantes (EVANS, 1998; BURTNIK, 2006). Com a presença dos jesuítas na região e com auxílio dos nativos, houve considerável avanço no conhecimento da espécie, principalmente a fatores vegetativos, dando início aos primeiros plantios no século XVII (MAZUCHOWSKI e RÜCKER, 1993). A colonização do continente promoveu um aperfeiçoamento tecnológico da sua produção, visando novos produtos a partir das folhas como principal matéria-prima (BONDARIK *et al.*, 2006). O seu cultivo representa um forte vínculo econômico, social e cultural com a região Sul do Brasil, envolvendo aproximadamente 600 municípios dos estados produtores, distribuídas em mais de 180 mil propriedades rurais, gerando mais de 700 mil empregos diretos e indiretos (MACCARI JUNIOR e MAZUCHOWSKI, 2000; PASSINATO *et al.*, 2003).

2.2.1 Produtos

Cerca de 80% da produção de *I. paraguariensis* no Brasil é utilizada em consumo local (REICHERT *et al.*, 2013), sendo que os principais produtos consumidos da espécie passam por pouco ou nenhum processamento industrial, sendo utilizados na forma de extratos como chimarrão e chás (CARVALHO, 2003). O nacionalmente conhecido chimarrão possui um singular vínculo cultural singular com o Rio Grande do Sul, sendo um produto símbolo do Estado (LORENZI e MATOS, 2002; BACKES e IRANG, 2002). De maneira rudimentar, a madeira da espécie pode ser utilizada na construção civil (MACCARI JUNIOR e MAZUCHOWSKI, 2000), na produção de painéis de aglomerado (GUIOTOKU *et al.*, 2008), e até na produção de carvão vegetal para fins específicos de filtragem (GONÇALVES *et al.*, 2007).

O maior foco de uso desta espécie está relacionado às suas propriedades químicas e fitoquímicas presentes principalmente nas folhas. Possui grande potencial na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, participando na elaboração de produtos de higiene, cosméticos, corantes, conservantes de alimentos, bebidas gaseificadas e medicamentos convencionais e de característica homeopática (MACCARI JUNIOR e MAZUCHOWSKI, 2000; CARVALHO, 2003). Os produtos mais beneficiados estão se tornando comuns em outros países, como Estados Unidos, Alemanha, Síria, Espanha, Itália, Austrália, França, Japão e

Rússia, principalmente no uso para bebidas energéticas, de sabor e de estímulos (CARDOZO JUNIOR e MORAND, 2016).

É uma espécie que vem sendo amplamente estudada mundialmente, visto sua grande gama de produtos benéficos para a saúde humana em nível industrial (DA CROCE, 2000). Extratos de *I. paraguariensis* vem sendo utilizados como um complemento a tratamentos medicinais, visto o seu elevado potencial de compostos fitoquímicos (DARTORA *et al.*, 2013). Existem diversos compostos fitoquímicos presentes nesta espécie, incluindo flavonoides, terpenoides, metilxantinas, saponinas, taninos, carotenoides, aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, glicídios, vitaminas e minerais (BORILLE *et al.*, 2005; GNOATTO *et al.*, 2007; REISSMANN e CARNEIRO, 2004; BIASI *et al.*, 2008). Possui também várias propriedades nutritivas de caráter farmacêutico, como capacidade antioxidant, antimicrobiana, diurética, digestiva, cicatrizante e estimulante (ASOLINI *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2005; KOWALCZYK *et al.*, 2006), demonstrando também ser eficaz na inibição da proliferação de certas células cancerígenas (MEJÍA *et al.*, 2010).

2.2.2 Relação entre espécie e produtor

Por estar presente principalmente em pequenas propriedades, a colheita da matéria-prima de *I. paraguariensis* é capaz de produzir uma renda extra ao pequeno produtor. Além de ser uma cultura permanente, possui período de colheita e extração em períodos de estagnação de outras culturas agrícolas, gerando trabalho, receita e auxiliando na permanência do homem no campo (LOURENÇO *et al.*, 1997). A espécie pode se desenvolver naturalmente em áreas nativas ou de maneira consorciada, em que a mão-de-obra responsável pela execução das atividades relacionadas a esta cultura é comumente por parte do próprio produtor e seus familiares (VASCONCELLOS, 2012).

É uma espécie que possui grande relação com o extrativismo, inclusive nos tempos atuais. Não é comumente considerada como fonte de renda primária pelos seus produtores, embora possua um dos melhores padrões tecnológicos entre os produtos florestais não madeireiros (BALZON *et al.*, 2004). Entretanto, em algumas regiões ao sul do estado do Paraná e norte de Santa Catarina há a presença de propriedades particulares de pequenos produtores rurais focadas unicamente na produção e extração da espécie. Paralelamente ao extrativismo, plantios comerciais de *I. paraguariensis* têm se tornado necessários para atender à demanda do mercado consumidor (FOSSATI, 1997). Todavia, existem variações relevantes no preço da matéria-prima desta espécie de acordo com o sistema de cultivo utilizado. Plantios homogêneos

tendem a permanecer em ambientes com insolação direta, o que torna seus produtos menos desejados pelo mercado devido a sua característica de amargor. Isto dificulta a comercialização do material originário de plantios homogêneos em comparação com o nativo (DA CROCE, 1996). Todavia, plantios comerciais mais recentes têm sido instalados em áreas com algum grau de sombreamento, visto a maior qualidade da matéria-prima, do produto final e de interesse pelo mercado consumidor.

2.2.3 Fatores econômicos

Economicamente, a produção de *I. paraguariensis* em 2020 obteve um valor superior a R\$ 550 milhões em nível nacional, um aumento de quase 30% em relação ao ano anterior (aproximadamente R\$ 400 milhões), enquanto a produção ultrapassou mais de 425 mil toneladas, um aumento de aproximadamente 13% para o mesmo período (cerca de 370 mil toneladas). Nos últimos dez anos houve um aumento superior a 80% na produção e mais do que cinco vezes no seu valor econômico (não ajustado), sendo o Estado do Paraná responsável por mais de 85% destes incrementos (IBGE, 2021).

Ainda que constatada esta expansão, ela permaneceu sendo restrita ao Sul do Brasil, baseada no extrativismo por longo tempo (BALZON *et al.*, 2004) mas, por possuir um dos melhores padrões tecnológicos entre os produtos florestais não madeireiros, há um atual desenvolvimento de empresas florestais focadas de produção desta espécie na forma de plantios comerciais. Cerca de 80% das variações no preço do quilograma desta cultura estão associadas aos pequenos produtores, possivelmente por se tratar de uma atividade de características extrativistas em sua maior parte (OLIVEIRA e WAQUIL, 2015).

Embora denotada a importância econômica, diversos fatores ligados ao manejo podem diminuir a produtividade da espécie, tais como: competição por recursos com plantas invasoras, ataque de pragas, fatores ligados ao solo como a compactação e falta de nutrientes, podas malfeitas e colheitas sucessivas, condições climáticas adversas e envelhecimento fisiológico das plantas produtoras (MEDRADO *et al.*, 2002). É comum que uma ou mais destas condições estejam presentes em ervais do Brasil, sendo necessária e recomendada a aplicação de procedimentos que visem o revigoramento das plantas a partir de técnicas de recuperação ou até pela própria renovação completa do erval, com a inserção de novos indivíduos (MEDRADO, 2005).

Embora não haja dados atuais quanto à demanda por mudas de *I. paraguariensis* para sua cadeia produtiva (OLIVEIRA e WAQUIL, 2015), em 2005 estimava-se uma produção

anual de 15 milhões de novas plantas no Sul do Brasil (WENDT, 2005), sendo ainda possível que os produtores produzam suas próprias mudas, recorram a viveiros comerciais ou a outros produtores que possuam mudas da espécie (SCHUCHMANN, 2002). Para inserção de novos indivíduos e na constituição de novos ervais devem ser selecionadas plantas que possuam características desejáveis conhecidas, como a maior produtividade, seja a partir de sementes ou por técnicas de propagação vegetativa (WENDLING e BRONDANI, 2015).

2.3 PRODUÇÃO DE MUDAS DA ESPÉCIE A PARTIR DE SEMENTES

No melhoramento genético desta espécie tem aumentado a seleção de indivíduos com maior produtividade, bem como com elevada qualidade da matéria-prima. Além disto, a aplicação de técnicas que avaliam a qualidade fitoquímica, como metabólicos secundários, têm sido mais empregadas para seleção de plantas superiores além da própria produtividade geral (DONADUZZI *et al.*, 2000; SANTIN *et al.*, 2017). Todavia, é comum que mudas produzidas pela via seminal apresentem variações de produtividade e de fitoquímicos (MEDRADO *et al.*, 2000; CANSIAN *et al.*, 2003).

2.3.1 Dormências e outras dificuldades de germinação

O uso de sementes de *I. paraguariensis* para produção de mudas se destaca como técnica mais utilizada por produtores visto a facilidade de produção e o baixo custo. Entretanto, as sementes podem apresentar as dormências física, fisiológica e morfológica (CARVALHO, 2003; WENDLING, 2004; WENDLING e BRONDANI, 2015; GALÍNDEZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020) além de outros problemas, podendo em alguns casos não ultrapassar 5% de germinação (CUQUEL *et al.*, 1994).

A presença da dormência física impede a absorção de água pelos tecidos internos da semente devido ao tegumento de caráter rígido e lenhoso desta espécie (MEDEIROS, 1998; FOWLER e STURION, 2000). Possui também a dormência morfológica, caracterizada pelo embrião imaturo presente em sementes de frutos já maduros, sendo ainda uma massa celular não diferenciada (KUNIYOSHI, 1983; CUQUEL *et al.*, 1994; CATAPAN, 1998; FOWLER e STURION, 2000). Por fim, a dormência fisiológica, relatada na presença de alguma substância que impede a germinação, mesmo na absorção de água pela semente e com o embrião estando maduro (MEDEIROS, 1998; SOUZA, 2018).

A associação entre estas dormências pode resultar em longos períodos de estratificação, atingindo meses de duração, principalmente devido à dormência morfológica (CUQUEL *et al.*, CATAPAN, 1998; 1994; FOWLER e STURION, 2000; WENDLING, 2004). Estima-se que somente entre 0,9% e 10% das sementes da espécie possuam embrião maduro após a colheita (CUQUEL *et al.*, 1994; FOWLER e STURION, 2000).

Além das dormências constatadas para as sementes, ainda podem ocorrer a presença de sementes vazias, predadas ou deterioradas (SOUZA *et al.*, 2020). A presença de sementes vazias está possivelmente relacionada a fatores como polinização, distância entre plantas mãe e eficiência dos polinizadores (CARVALHO, 2003). Em aproximadamente 50,0% das sementes com resquícios de predação, tem sua origem himenóptera (ZANON, 1988), principalmente causado por pequenas vespas (SOUZA *et al.*, 2020). A deterioração das sementes provavelmente ocorre em função do tempo associado à presença de certos patógenos, principalmente fungos (OLIVEIRA, 2013).

O uso de sementes sem garantia de origem de *I. paraguariensis* foi amplamente usado de forma proporcional ao aumento do consumo interno e externo, seguida da queda de produtividade dos ervais nativos, do desmatamento e da expansão agrícola (WENDT, 2005). O uso de sementes sem qualidade genética e fitossanitária pode prejudicar o seu desenvolvimento tecnológico, em termos de seleção para o melhoramento genético. É comum a menor qualidade genética e fisiológica das mudas produzidas por esta via, seja pela escassez de plantas mãe com boa qualidade e pelo baixo percentual da germinação (CUQUEL *et al.*, 1994; STURION, 1988; MEDRADO *et al.*, 2000). A propagação sexuada pode conferir uma maior amplitude adaptativa a determinados genótipos da nova geração, em contrapartida, há a menor qualidade e uniformidade das mudas produzidas (XAVIER *et al.*, 2013). Entretanto, quando é efetuada a fecundação controlada com conhecimento das características dos progenitores, na produção da chamada progênie bicolonial, é possível se obter indivíduos de qualidade e produtividades superiores, tal como exemplo a *Cambona 4* (CORREA *et al.*, 2011).

2.4 PRODUÇÃO DE MUDAS DA ESPÉCIE A PARTIR DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

Uma possível solução para os problemas encontrados na via seminal está no uso de técnicas de propagação vegetativa, a partir da seleção de plantas mãe com características de interesse (WENDLING e BRONDANI, 2015), para constituição das primeiras fontes de propágulos (CARPANEZZI e CARPANEZZI, 2006), como jardins clonais, por exemplo.

Porém, é necessário o completo entendimento do funcionamento destas técnicas, que pode ter inúmeras fontes de variação de acordo com a espécie, desde técnicas de resgate ao estabelecimento de processos padronizados, como protocolos específicos de enraizamento (STUEPP *et al.*, 2018), os quais podem apresentar variações e adaptações de acordo com o tipo e origem de material utilizado. Todavia, uma vez que ocorra um aperfeiçoamento e a definição de um protocolo eficiente, esta técnica permite a reprodução de indivíduos que possuam características superiores mesmo sob diferentes condições fisiológicas (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2017a, 2018).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos na propagação vegetativa de *I. paraguariensis*, tanto de maneira *in vitro* e *ex vitro*, a fim de se obter materiais enraizados com maior facilidade e de melhor qualidade fisiológica (WENDLING *et al.*, 2013). Embora os possíveis ganhos em curtos espaços de tempo (GRAÇA *et al.*, 1990), faltam ainda protocolos específicos para a sua propagação vegetativa para produção de clones a nível comercial, visto que existe uma elevada variação na capacidade de enraizamento entre indivíduos (PRAT KRIKUN *et al.*, 1986; SAND, 1989; TAVARES *et al.*, 1992; WENDLING *et al.*, 2004; WENDLING e BRONDANI, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021), tendo como perspectiva a continua necessidade de obtenção de novos materiais, a fim de evitar um possível afunilamento genético.

É importante ressaltar que, além dos ganhos em produtividade, a propagação vegetativa a partir da seleção de genótipos superiores também se trata de uma forma de conservação florestal. A partir da clonagem de indivíduos adultos e o seguinte estabelecimento de florestas plantadas com características desejáveis, é possível afirmar a ocorrência de uma diminuição na exploração irregular, garantindo a manutenção da diversidade no meio natural (SILVA *et al.*, 2021).

2.4.1 Maturação e técnicas de revigoramento para o resgate vegetativo

As características desejadas por uma planta normalmente só são expressas após atingir certos níveis de maturação (HARTMANN *et al.*, 2011), mas é comum que indivíduos com características superiores selecionados a campo possuam elevado grau de maturação, o que pode dificultar o resgate do material e sua propagação (COSTA *et al.*, 2005; SANTIN *et al.*, 2008a; BRONDANI *et al.*, 2009; WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2018). Isto se deve ao fato de que tecidos maduros possuem menor capacidade de diferenciação celular, principalmente em espécies lenhosas (TARRAGÓ *et al.*, 2005). Brotações apicais,

principalmente de plantas maduras, podem possuir grande dificuldade de se propagar vegetativamente devido à sua baixa atividade fisiológica e menor divisão celular. Por vezes, podem ser aplicadas técnicas que visem o revigoramento do material vegetal, aumentando as chances de enraizamento dos propágulos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; HARTMANN *et al.*, 2011; WENDLING *et al.*, 2013; WENDLING e BRONDANI, 2015; STUEPP *et al.*, 2015, 2017a, 2017b, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2018, 2019a, 2019b).

Um dos maiores desafios para a propagação vegetativa de *I. paraguariensis* está na obtenção de material de caráter juvenil ou de maior vigor de plantas selecionadas sem a necessidade do seu corte, visando mantê-la produtiva e viva para preservação de suas características genéticas (WENDLING *et al.*, 2013). Em plantas lenhosas, há maior vigor armazenado na porção mais basal do caule, visto que os meristemas nesta região se formam nos períodos mais próximos à germinação, mantidos dormentes com o desenvolvimento da planta, ou seja, em função da sua idade ontogenética (HARTMANN *et al.*, 2011). Para tanto, podem ser aplicadas técnicas que visem promover a brotação destas gemas adormecidas, mas estas podem ter resultados variantes na qualidade de suas brotações epicórmicas entre si (XAVIER *et al.*, 2013).

Tais técnicas utilizadas nesta espécie podem partir do anelamento do caule em diferentes alturas (WENDLING *et al.*, 2014b; NASCIMENTO, 2018) ou diferentes proporções e alturas (STUEPP *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2018), aplicação de podas drásticas da copa (SANTIN *et al.*, 2008b) e a partir da própria decepa da planta (WENDLING *et al.*, 2014a; STUEPP *et al.*, 2015; 2016). Em suma, estas técnicas têm como objetivo ocasionar o desbalanço hormonal, em que ocorre um acúmulo de citocinina na área injuriada, reativando o desenvolvimento vegetativo nesta região, promovendo a brotação (TAIZ e ZEIGER, 2009; HARTMANN *et al.*, 2011). A aplicação de técnicas de anelamento são eficientes na promoção de brotações basais em *I. paraguariensis*, possuindo uma grande capacidade de cicatrização destes ferimentos (SANTIN *et al.*, 2008b; WENDLING *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2018, 2019a, 2019b), garantindo ainda sua integridade (KRATZ *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2018).

Entretanto, a idade da planta mãe e a época em que esta técnica é aplicada afeta diretamente a capacidade de brotação. O anelamento do caule favorece a brotação em plantas fisiologicamente jovens e quando efetuado no período de dormência da planta mãe (SANTIN *et al.*, 2008b; BITENCOURT *et al.*, 2009; STUEPP *et al.*, 2016). Embora a indução do desenvolvimento de brotos epicórmicos seja possível mesmo em plantas com idades avançadas (XAVIER *et al.*, 2013), estes ainda são de certa forma dependentes da fisiologia atual da planta

mãe, o qual pode estar menos ativo (HARTMANN *et al.*, 2011). A aplicação desta técnica em épocas em que o material está dormente, especialmente pouco tempo antes do retorno do aumento das temperaturas, pode significar que a energia utilizada para a emissão de novas brotações de copa, tal como as citocininas, serão redirecionadas para novos drenos, como as gemas dormentes (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Outro fator associado à técnica de anelamento que pode favorecer a formação de brotações epicórmicas está na nutrição da planta mãe. *I. paraguariensis* é uma espécie que possui alta tolerância à solos de baixa fertilidade e elevada acidez (CARVALHO, 2003). Atualmente, estudos têm sido elaborados tratando das necessidades nutricionais desta espécie, tanto para macronutrientes como para micronutrientes, especialmente para a produção de massa verde (SANTIN *et al.*, 2015; BENEDETTI *et al.*, 2019). Neste quesito, a aplicação prévia de adubos nitrogenados tende a favorecer a produção de brotações epicórmicas pela técnica de anelamento completo, sem uma formulação ou dosagem específica (NASCIMENTO *et al.*, 2019a).

Existe uma forte relação entre a produção hormonal e a nutrição da planta, principalmente quanto aos elementos N, P e K, sendo o primeiro considerado o mais importante (HARTMANN *et al.*, 2011). O nitrogênio (N) aparentemente é o elemento mais importante na síntese hormonal em plantas, correlacionando desenvolvimento vegetativo em função da sua ausência, presença e quantidade (TAIZ e ZEIGER, 2009; HARTMANN *et al.*, 2011; KIBA *et al.*, 2011). Este também é considerado como o elemento mais importante para *I. paraguariensis* no seu crescimento e desenvolvimento (BELLOTTE e STURION, 1983; ZAMPIER, 2001). Este está associado à produção e transporte de citocininas, hormônio responsável pelo desenvolvimento de novas brotações (TAIZ e ZEIGER, 2009; HARTMANN *et al.*, 2011). Ao utilizar do elemento N, a planta aumenta consideravelmente sua quantidade de citocinina de maneira rápida, indicando que há um sistema comunicador entre raízes e parte aérea, aumentando a eficiência do uso deste elemento (TAKEI *et al.*, 2001; SAKAKIBARA, 2006). O fósforo (P) tem elevada importância para o desenvolvimento da espécie, especialmente quando associado aos elementos N e potássio (K) (SANTIN *et al.*, 2008a; SANTIN *et al.*, 2013), mas não sendo exigente em grandes quantidades deste (REISSMAN *et al.*, 1983; RADOMSKI *et al.*, 1992).

2.4.2 Resgate de galhos destacados para produção de brotações

Alternativamente, é possível manter um propágulo produtor de brotações epicórmicas a partir do armazenamento de galhos destacados, acondicionados em local sob condições ambientais favoráveis (ROSA *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007; WENDLING *et al.*, 2009; WENDLING *et al.*, 2013; MENEGUZZI, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2018). Esta técnica se trata da coleta direta de galhos fisiologicamente ativos das plantas mãe, podendo possuir tamanhos e formas variadas, acondicionados em casa de vegetação com condições ambientais propícias para o desenvolvimento vegetativo da parte aérea de maneira contínua (HARTMANN *et al.*, 2011).

Nesta técnica não há o abate da planta mãe, há facilidade do manejo do material, no preparo e na coleta das brotações produzidas, uma vez que se encontram em locais de fácil acesso e manutenção (WENDLING e BRONDANI, 2015). Em contrapartida, os galhos estão diretamente relacionados com a questão ontogenética (XAVIER *et al.*, 2013), dependendo de sua posição em altura na planta mãe, o que pode comprometer o vigor do material (ALMEIDA *et al.*, 2007). Também, certas dificuldades como a manutenção da sobrevivência dos galhos e produção de brotações de maior comprimento podem ser encontradas para *I. paraguariensis* (WENDLING *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2018), possivelmente associadas a fatores como o genótipo utilizado (SILVA *et al.*, 2021), local de origem, tamanho, forma e disposição no ambiente de acondicionamento.

2.4.3 Estaquia e miniestaquia

Quanto ao processo de propagação vegetativa propriamente dita, existem diversas técnicas que podem ser utilizadas em *I. paraguariensis*, sendo as mais utilizadas a estaquia e a miniestaquia. A estaquia consiste na produção de mudas a partir de propágulos oriundos de uma planta mãe, comumente a partir de brotações, sendo de fácil aplicação, enquanto o material para miniestaquia é proveniente de um minijardim clonal, com o uso de indivíduos superiores pré-estabelecidos ou a partir de mudas originadas de sementes, com características de seleção ou não (WENDLING e BRONDANI, 2015). O principal requisito para o sucesso destas técnicas está na formação de raízes adventícias nos propágulos, mas é comum que muitas espécies lenhosas tenham dificuldades de enraizamento (HARTMANN *et al.*, 2011). Baixos índices de enraizamento de *I. paraguariensis* e a ausência de um protocolo eficiente comprometem o uso a nível comercial, principalmente pela estaquia (WENDLING e BRONDANI, 2015).

Existem vários fatores interferentes no sucesso do enraizamento para esta espécie. Estes fatores vão desde as características genotípicas e ambientais do material de origem e seu grau de maturação, a época de coleta de material vegetal, a nutrição da planta mãe e por consequência da estaca produzida, o tipo e forma de propágulos produzido, o uso de hormônios promotores de enraizamento, o ambiente de enraizamento, entre outros. Além dos fatores mais conhecidos, também há mecanismos epigenéticos, anteriormente conhecidos como fator “C” (RADOSTA *et al.*, 1994), responsável por alterar a função de genes sem haver alteração do material genético, capaz de promover diferentes atividades fisiológicas com igualmente diferentes respostas morfológicas dos propágulos, mesmo estes sendo clones (RAPP e WENDEL, 2005).

As populações de origem do material vegetal, as épocas de coleta, assim como os genótipos inseridos em cada população, podem ter diferentes índices de enraizamento (HARTMANN *et al.*, 2011). *I. paraguariensis* possui uma vasta área de ocorrência em diferentes tipologias florestais, pressupondo que adaptações genéticas aos diferentes ambientes tenham ocorrido e ainda estejam presentes a partir do processo de seleção natural, proporcionadas pela reprodução cruzada. Em termos genéticos, esta espécie apresenta maior variância entre indivíduos de uma mesma população do que entre populações (SILVA, 2019; STEDILLE, 2020), podendo apresentar diferentes genótipos com boa capacidade de enraizamento. Assim, de maneira indireta, o ambiente exerce forte influência na capacidade de sua propagação vegetativa (WENDLING e BRONDANI, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Semelhantemente, existe relação com as estações do ano para a coleta de material, não havendo uma época definida para tanto, em que os resultados podem ser muito variantes. O aumento das temperaturas promove o retorno do crescimento vegetativo das plantas, reativando a divisão e diferenciação celular (HARTMANN *et al.*, 2011; STUEPP *et al.*, 2017a). Em contrapartida, propágulos coletados durante o outono e inverno apresentam maior sobrevivência, possuindo maiores quantidades de acumuladas de reservas energéticas (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PIMENTEL *et al.*, 2017, 2019).

O próprio grau de maturação das plantas mãe e a aplicação de técnicas de revigoramento das mesmas, para formação de brotações epicórmicas ou adventícias, aparenta ser essencial no sucesso de enraizamento por estquia. Embora o material revigorado aparente ser mais sensível, este pode possuir um melhor enraizamento, com maior número de raízes e de maior comprimento quando comparadas com estacas produzidas a partir de brotações do ano (BITENCOURT *et al.*, 2009; WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2015, 2016, 2017a, 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018). Embora eficiente para propagação vegetativa desta espécie (WENDLING *et al.*, 2013), é necessário ficar atento para a região de indução de

brotações epicórmicas. A maior altura de coleta de material vegetal pode significar uma idade ontogenética mais madura, o que pode inutilizar a técnica de resgate, obtendo um material de baixo vigor (ALMEIDA *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2011).

A nutrição das plantas mãe também aparenta ser um fator importante, em que a estquia apresenta melhores resultados quando ocorre a adubação nitrogenada de maneira previa à coleta de propágulos (PICOLOTTO *et al.*, 2015 NASCIMENTO *et al.*, 2019a; DUARTE *et al.*, 2020). Estacas de *I. paraguariensis* produzidas a partir de brotações epicórmicas de plantas adubadas com tratamentos nitrogenados podem apresentar um enraizamento considerável (NASCIMENTO *et al.*, 2019a). Isto ocorre, pois, uma planta melhor nutrida tende a produzir uma maior quantidade de hormônios de crescimento, dentre eles as auxinas, promovendo o crescimento e desenvolvimento de raízes (TAKEI *et al.*, 2001; SAKAKIBARA, 2006).

Fatores diretamente relacionados à morfologia da estaca e miniestaca produzida, como o número de folhas, o seu tamanho e seção de origem desta da brotação podem garantir um melhor enraizamento. As folhas são as principais responsáveis pela produção de auxinas na planta (TAIZ e ZEIGER, 2009; HARTAMNN *et al.*, 2011), sendo a sua permanência essencial para o enraizamento. Existe uma forte relação entre a posição da folha e o local de formação de raízes, sendo estas formadas no mesmo sentido axial da folha. Portanto, o maior número de folhas em uma mesma estaca pode proporcionar seu melhor enraizamento (TARRAGÓ *et al.*, 2005). Entretanto, a remoção do maior número de folhas e a redução de sua área foliar é uma atividade essencial para a manutenção da sobrevivência dos propágulos, reduzindo a sua transpiração excessiva, podendo afetar indiretamente o enraizamento. Ainda, é comum que em decorrência ao estresse ocasionado pelo processo de estquia e miniestquia, os propágulos percam suas folhas originais, sendo dependentes de novas brotações para produção de auxinas e dos consequentes processos para o seu enraizamento.

O uso de reguladores de crescimento foi considerado um dos fatores de maior influência no enraizamento de propágulos de espécies lenhosas, e dentre os principais está o indol-3-butírico (AIB) (HARTMANN *et al.*, 2011). Este regulador foi vastamente utilizado em estudos visando a propagação vegetativa de *I. paraguariensis* (BITENCOURT *et al.*, 2009; WENDLING *et al.*, 2013; NAGAOKA *et al.*, 2013; STUEPP *et al.*, 2017a; BISOGNIN *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Mesmo na utilização exógena de doses consideradas elevadas de AIB, de 6.000 mg L⁻¹ (BITENCOURT *et al.*, 2009; STUEPP *et al.*, 2017a) a até 10.000 mg L⁻¹ (NASCIMENTO *et al.*, 2020), este não influenciou significativamente no enraizamento de propágulos desta espécie, podendo a formação de raízes estar mais associada com o grau de maturação da planta mãe (WENDLING *et al.*, 2015; STUEPP *et al.*, 2017a).

Além disto, a presença de álcool para produzir a solução pode afetar a sobrevivência de propágulos devido suas características surfactantes e desidratantes (HARTMANN *et al.*, 2011).

O ambiente de acondicionamento dos propágulos também influencia seu enraizamento, em que ambientes com umidade relativa do ar sempre superior a 90% garantem sua maior sobrevivência e enraizamento (BRONDANI *et al.*, 2008; BRONDANI *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Neste quesito, ambientes com controle de temperatura e irrigação por nebulização garantem uma maior sobrevivência e enraizamento desta espécie (BRONDANI *et al.*, 2008). O genótipo da planta mãe pode ser um fator determinante para o sucesso no enraizamento, requerendo diferentes condições de acondicionamento para propágulos de diferentes plantas mãe (MOKODETI *et al.*, 2000; BISOGNIN *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021).

I. paraguariensis possui seu enraizamento preferencialmente de forma direta, também chamada de via primária, não sendo comum que haja a formação de calos para tanto, sendo comum o não enraizamento na sua presença (TARRAGÓ *et al.*, 2005). Esta variável apresenta estar ligeiramente relacionada com o grau de maturação da planta mãe. Plantas mãe mais jovens desta espécie tendem a possuir um enraizamento direto, enquanto as mais maduras produzem mais calos (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2017a). A formação de calos em propágulos se trata do início da divisão celular, formando uma massa celular em sua base sem definição específica. Todavia, por algum motivo a diferenciação celular é incompleta, possivelmente ocasionada pela insuficiência de auxinas (TAIZ e ZEIGER, 2009; HARTMANN *et al.*, 2011). Em contrapartida, é possível que propágulos com calos produzam raízes se estes permanecerem por maiores períodos no ambiente de enraizamento, visto que os processos fisiológicos ainda ocorrem neste material (STUEPP *et al.*, 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

2.4.4 Micropropagação

Outra via de propagação vegetativa é a micropropagação, em que há um maior controle das variáveis que podem afetar o enraizamento do material vegetal, sendo uma das técnicas mais utilizadas para regeneração de plantas de alto interesse (HARTMANN *et al.*, 2011). Este método é largamente recomendado como técnica biotecnológica para multiplicação de plantas selecionadas (HU, 1989; MROGINSKI *et al.*, 1997). É capaz de produzir uma grande quantidade de indivíduos a partir de poucas plantas mãe, em um curto prazo de tempo e em pequenos espaços labororiais, podendo acelerar os programas de melhoramento, antecipando em anos os resultados e seleção de clones (DUTRA e SILVA, 2009; HARTMANN *et al.*, 2011;

OLIVEIRA *et al.*, 2013), considerando que as células vegetais possuem autonomia potencial para sua própria regeneração quando submetidas aos tratamentos adequados para tanto (KERBAUY, 1999). Apesar de haver diversos trabalhos com o gênero *Ilex* ou com a própria *I. paraguariensis*, ainda é inexistente um protocolo definido para a sua micropopulação (MORANDI, 2020), algo comum para parte das espécies florestais (OLIVERIA *et al.*, 2013).

Assim como para outros meios de propagação vegetativa, existem certos desafios na micropopulação desta espécie. Semelhantemente à estaquia e miniestaquia, esta técnica é influenciada pelo grau de maturação do material vegetal utilizado, da época de coleta de material, do genótipo utilizado, além do meio de cultura, o tipo e a concentração correta de reguladores de crescimento e os tratamentos de descontaminação. Este último aparenta ser uma das principais causas da baixa sobrevivência de explantes desta espécie, com elevadas porcentagens de contaminação por bactérias e fungos (DUTRA e SILVA, 2009). Além da contaminação, a elevada oxidação dos propágulos também torna esta técnica desafiadora para a espécie (SANSBERRO *et al.*, 1998, 2001; MROGINSKI *et al.*, 2011; STACHEVSKI *et al.*, 2013; MENEGUZZI *et al.*, 2016; MORANDI, 2020).

O atual grau de maturação e a época em que são coletados os explantes e estabelecidos *in vitro* afetam consideravelmente a sobrevivência dos propágulos. De mesma forma como a estaquia, há a influência da idade fisiológica do material utilizado, sendo que, quanto mais maduro, maior é a dificuldade de propagação (SANSBERRO *et al.*, 2000). É comum que plantas a campo apresentem maior maturidade, sendo esta uma das principais causas das elevadas porcentagens de contaminação endógena e rápida oxidação em *I. paraguariensis* (REY e MROGINSKI, 1988; SANTOS e WENDLING, 2003). Visto isto, alguns estudos objetivaram diminuir este problema pela utilização de propágulos de plantas mantidas em viveiro, considerando que as brotações mais apicais apresentariam uma menor porcentagem de contaminantes, podendo ainda ser tratados periodicamente com fungicidas (BERNASCONI *et al.*, 1998; ZANIOLO e ZANETTE, 1999).

Os propágulos também podem ter sua sobrevivência afetada pela época de sua coleta, que, quando estabelecidos durante o inverno, possuem uma maior porcentagem de resiliência e menor porcentagem de contaminação por bactérias (ROSA *et al.*, 2006). A maior sobrevivência de propágulos obtidos nas estações frias está diretamente relacionada a suas maiores reservas energéticas, mantidas para o retorno do aumento das temperaturas (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Estas mesmas estações frias retardam o desenvolvimento de bactérias, exigentes de temperaturas mais elevadas (AGRIOS, 1978). Além da maior contaminação obtidas nas estações quentes também há a maior oxidação dos explantes, justificado pela maior atividade

fisiológica devidos às maiores temperaturas e pelo acúmulo de compostos fenólicos (MROGINSKI *et al.*, 1997; ROSA *et al.*, 2006). Ainda, para esta espécie, é possível que haja uma associação entre a época de coleta e os clones utilizados, sendo uns mais responsivos do que outros de acordo com as estações do ano testadas (BERNASCONI *et al.*, 1998).

O tipo de meio de cultura utilizado, em função das quantidades corretas de reguladores de crescimento e de outras substâncias, pode afetar o desenvolvimento dos propágulos (FERREIRA *et al.*, 1991; SANSBERRO *et al.*, 2000; LUNA *et al.*, 2003; HORBACH, 2008; DUTRA e SILVA, 2009), mas não é responsável pela manutenção da sobrevivência dos explantes, havendo a outros fatores (DUTRA e SILVA, 2009). Para garantir o sucesso no enraizamento por micropropagação na erva-mate, pode ser necessário promover a troca de meios, entre um meio indutor e um meio específico para o desenvolvimento das raízes. Porém, o excesso de AIB pode ser prejudicial para o enraizamento de explantes, mas pode aumentar em proporção o número de raízes do material efetivamente enraizado (ZANIOLO e ZANETTE, 2001). Este mesmo efeito é percebido no estabelecimento de segmentos nodais de *I. paraguariensis* em meios contendo sacarose, obtendo um valor ideal (SANSBERRO *et al.*, 2000).

Os tratamentos prévios contra agentes contaminantes aparenta ser uma das causas mais importantes da baixa sobrevivência de explantes nesta espécie (DUTRA e SILVA, 2009), se relacionado diretamente com a qualidade fitossanitária da planta mãe (CHALUPA, 1981). A contaminação por fungos pode ser eficientemente controlada com o uso de tratamentos periódicos com fungicidas previamente à coleta de propágulos (PANICK, 1995; ZANIOLO e ZANETTE, 2001). Para descontaminação antes do estabelecimento *in vitro* em si, comumente é utilizado NaOCl com doses variando entre 1% e 5% com tempos entre cinco e 30 minutos de exposição, sendo solúvel em água, o que facilita também a sua remoção (BARRUETO CID e ZIMMERMAMM, 2006). Elevados tempos de exposição ao NaOCl diminuem consideravelmente a contaminação por fungos e bactérias em explantes de *I. paraguariensis*, mas de maneira inversamente proporcional, aumentam a sua oxidação, com perdas de material por fitotoxidez (ZANIOLO e ZANETTE, 2001; BARRUETO CID e ZIMMERMAMM, 2006). Embora ainda sejam aplicados tratamentos considerados abrasivos, os propágulos desta espécie podem apresentar uma grande quantidade de bactérias e fungos endofíticos, dificultando muito sua desinfestação e aumentando sua oxidação (PENNA, 2000; PIMENTEL *et al.*, 2006).

Não foram encontrados trabalhos referentes à utilização de diferentes tipos de radiação luminosa no estabelecimento *in vitro* de *Ilex paraguariensis* ou do gênero *Ilex*, podendo ser importante a avaliação deste tipo de tratamento. Entretanto, trabalhos com este tema em outras

espécies vegetais demonstram que as lâmpadas do tipo LED podem ser significativamente superiores às incandescentes ou fluorescentes convencionais. Na micropropagação de *Musa* spp., as lâmpadas LED de cor branca ou vermelha são eficientes para um aumento no número de brotações de seus propágulos (FAÇANHA *et al.*, 2018), enquanto para *Gossypium hirsutum* L. (LI *et al.*, 2010), a associação entre as lâmpadas LED vermelhas e azuis promoveu um desenvolvimento mais saudável dos propágulos, obtendo ainda maior biomassa do que outros tratamentos. Em *Fragaria x ananassa* Duch (ROCHA *et al.*, 2010) a utilização de lâmpadas LED vermelha ou verde promove um aumento de suas brotações, em que a vermelha também é capaz de aumentar a quantidade de clorofila *a* e *b*. Para *Onicidium baueri* Lindl. (CAMARGO *et al.*, 2015), a utilização de filtros de acetato de celulose sobre as lâmpadas comuns não altera significativamente o seu desenvolvimento de forma geral, com resultados semelhantes com o tratamento sem este tipo de material.

Algumas das razões pela utilização de lâmpadas que não sejam as do tipo convencionais são a economia de energia ao se utilizar lâmpadas do tipo LED, sua baixa emissão de calor, longo período de vida, eficiência luminosa e especificidade do comprimento de onda (ROCHA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010; FAÇANHA *et al.*, 2018). Os laboratórios de micropropagação de plantas clonais estão aos poucos substituindo as lâmpadas comuns por sistemas LED, uma vez que são capazes de promover um maior e melhor desenvolvimento dos propágulos com menor custo de produção (FAÇANHA *et al.*, 2018). Tais diferenças ocorrem, pois, a morfogênese é altamente dependente da intensidade luminosa, do seu comprimento de onda, densidade de fluxo e até do fotoperíodo, influenciado na diferenciação e crescimento das células vegetais (GEORGE *et al.*, 1993). A qualidade e a intensidade de luz são capazes de desencadear respostas fisiológicas nos vegetais, principalmente em *in vitro* visto sua maior sensibilidade aos fatores ambientais, sendo uma reação de fotorreceptores capazes de traduzir a luz recebida em processos bioquímicos (MORINI e MULEO, 2003). Estes aparelhos são capazes de traduzir, a partir de uma mesma luz, todos os comprimentos de ondas obtidos e de certa forma transformá-los anatomicamente e diferenciar tecidos, podendo por exemplo promover o acúmulo de carboidratos, desenvolver a parte aérea e alterar concentrações de determinados hormônios (DIGNART, 2006).

3 METODOLOGIAS COMUNS

3.1 ORDEM DE CAPÍTULOS E EXPERIMENTOS

Durante o período de estudo sobre resgate e propagação vegetativa de *I. paraguariensis* e através da observação, avaliação e interpretação de seus resultados, novos experimentos foram realizados com o objetivo de verificar causas e efeitos a partir de novas hipóteses em função da aplicação do método científico. Para tanto, estão apresentados quatro experimentos de estaquia da espécie (número de ordem (*n*) de experimentos de estaquia – Esn; Experimento de estaquia com material previamente adubado – EsAd; experimento de estaquia com material de origem epicórmica – EsEpi), cinco experimentos sobre seu resgate vegetativo a partir do anelamento completo ou de galhos destacados (experimento de adubação – Ad; número de ordem (*n*) de experimentos de galhos destacados – Gan) e três tratando de seu estabelecimento *in vitro* (número de ordem (*n*) de experimentos de estabelecimento *in vitro* – Min). Estes experimentos estão devidamente distribuídos em cinco capítulos (Tabela 1).

Tabela 1 — Relação de capítulos e experimentos dos estudos propagação vegetativa de *I. paraguariensis* de diferentes populações

Capítulo	Experimentos*	Título
I	Es1; Ga1	Resgate e propagação vegetativa de genótipos de <i>Ilex paraguariensis</i>
II	Ad; EsAd	Adubação de <i>Ilex paraguariesis</i> para o resgate vegetativo e sua propagação por estaquia
III	Es7	Interação entre genótipos e ambientes na propagação de <i>Ilex paraguariensis</i> por estaquia
IV	Ga2; Ga3; Ga4; EsEpi	Brotação epicórmica de galhos destacados de <i>Ilex paraguariensis</i> para o resgate vegetativo
V	Mi1; Mi2; Mi3	Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> sob diferentes fontes de iluminação artificial

*Um resumo das definições dos experimentos citados pode ser observado ao final do tópico 3.3 na Tabela 3.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

3.2 METODOLOGIAS COMUNS

Neste segmento, estão apresentadas as metodologias que foram comuns ou ao menos em parte para todos os experimentos. Estão contemplados a caracterização das populações estudadas, a seleção dos indivíduos, a coleta do material vegetal e seu transporte, o seu processamento e o seu acondicionamento, as variáveis analisadas e a estatística comum a todos

os experimentos. As particularidades e delineamentos estão apresentados separadamente em cada capítulo (itens 4, 5, 6, 7 e 8).

3.2.1 Caracterização das populações de origem

Foram estudadas, inicialmente, cinco populações de *I. paraguariensis* quanto à sua propagação vegetativa. Os locais de origem pertencem às municipalidades de Catanduvas (SC) ($28^{\circ}95'67''$ S; $52^{\circ}78'22''$ O), Cruz Machado (PR) ($26^{\circ}01'19''$ S; $51^{\circ}21'04''$ O), Painel (SC) ($27^{\circ}84'97''$ S; $49^{\circ}93'54''$ O), Três Barras (SC) ($26^{\circ}12'19''$ S; $50^{\circ}21'62''$ O) e Urupema (SC) ($27^{\circ}96'52''$ S; $49^{\circ}83'92''$ O). Desta forma, ficaram determinadas quatro populações da espécie no Estado de Santa Catarina e uma no Paraná, sob características ambientais específicas (Tabela 2). Após um experimento preliminar, foram utilizadas duas populações (Três Barras e Urupema) para os demais estudos visto suas maiores divergências em relação às condições climáticas

Tabela 2 — Resumo das características meteorológicas e ambientais, de tipologia florestal e de solos das populações de *I. paraguariensis* de estudo

Locais	Clima (Köppen)	Temp. máxima anual (°C)*	Temp. mínima anual (°C)*	Temp. média anual (°C)
Catanduvas	Cfb	26,3	5,5	16,2
Cruz Machado	Cfb	25,8	8,6	17,5
Painel	Cfb	23,6	6,7	14,7
Três Barras	Cfb	26,0	9,4	17,9
Urupema	Cfb	23,6	5,6	14,1
Locais	Pluviosi. média anual (mm)	Altitude média (m)	Tipologia florestal	Solos (predominância)
Catanduvas	1.895	945	FOM-FES/D	B. Estrut.
Cruz Machado	1.561	815	FOM	Cambissolos
Painel	1.656	1.123	FOM	Cambissolos
Três Barras	1.673	762	FOM	Cambissolos
Urupema	1.634	1.335	FOM	Cambissolos

Em que: FOM: Floresta Ombrófila Mista, FES: Floresta Estacionária Semideciduosa, FED Floresta Estacionária Decidual; *Médias das maiores e menores temperaturas mensais do ano. Fonte: pt.climate-data.org, 2022. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Estas populações se encontravam sob diferentes condições entre si no momento de aplicação de experimentos ou coleta de material vegetal, principalmente devido ao seu uso. Os indivíduos de *I. paraguariensis* das populações de Catanduvas (CT), Cruz Machado (CM) e Três Barras (TB) estavam em meio à vegetação mais aberta, sem adensamentos com outras espécies de mesmo porte, circundada por gramíneas, sendo sombreadas por indivíduos arbóreos de maior porte, principalmente *Araucaria angustifolia*. Excepcionalmente, a população de TB

possuía um espaçamento entre plantas melhor definido (1,5 m x 1,5 m), se tratando de um plantio em linha. Estas três populações são pertencentes a empresas privadas com objetivo de produção de folhas da espécie para comercialização, principalmente no estilo erva para chimarrão.

Os indivíduos das populações de Painel (PL) e Urupema (UR) estavam em condições mais adensadas com espécies nativas de portes diversos, menores do que os indivíduos da espécie, mas também sendo sombreadas principalmente por árvores de *A. angustifolia*. Estas duas populações se encontravam inseridas em propriedades particulares, em que o objetivo dos produtores estava no extrativismo para obtenção de renda extra.

Quanto à origem, a maior proporção dos indivíduos presentes nas populações estudadas é resultado da condução da regeneração natural em todas as populações, independente da finalidade do erval. Corriqueiramente, eram utilizadas sementes próprias e mudas de viveiros locais para enriquecimento da produção, sendo esta ocorrência maior na população de TB. De acordo com os produtores, a idade das plantas mãe variou entre 10 e 20 anos para CM, CT e TB, e 15 e 25 anos para PL e UR.

3.2.2 Seleção dos indivíduos

Tratando da seleção dos indivíduos para coleta de material vegetal dentro de cada população, certos critérios foram previamente estabelecidos. Uma distância mínima de 50 m entre indivíduos de interesse foi considerada para a coleta, a fim de diluir um possível grau de parentesco e maior representatividade populacional (SILVA, 2019; BITTENCOURT, 2021).

Não houve coleta do material vegetal de indivíduos que apresentassem algum tipo de dano às suas folhas, seja pela presença de algum agente xilófago ou por fator abiótico. Assim, indivíduos com suspeição ou na evidente presença de broca (*Hedypathes betulinus*), cochonilha (*Ceroplastes grandis*) ou lagarta (*Thelosia camina*) não foram coletados. Desta forma, uma similaridade entre indivíduos da mesma população foi respeitada, não sendo selecionados indivíduos muito divergentes.

O diâmetro à altura do peito (DAP) dos indivíduos de interesse foi obtido com fita métrica na circunferência à altura do peito (CAP), sendo transformados pela divisão por π . Indivíduos bifurcados obtiveram seus diâmetros transformados pela raiz da soma de seus quadrados, obtendo um único valor. Os dados de diâmetro estão apresentados separadamente de acordo com cada capítulo.

3.2.3 Coleta de brotações e de galhos

Quanto à coleta de material vegetal, as brotações das copas dos indivíduos de *I. paraguariensis* selecionados foram seccionadas com tesoura de poda. Como critério, foi coletado material vegetal posicionado acima de 1,3 m para todas as populações visando evitar variações demasiadas na sua idade ontogenética. As brotações foram devidamente separadas por genótipo e população.

Os galhos destacados para indução de brotações epicórmicas foram obtidos dos mesmos genótipos em que houve coleta de brotações ou de outros indivíduos da espécie em mesma área de coleta, desde que apresentassem características de interesse, como por exemplo, um maior diâmetro. Os galhos mais finos, com diâmetros variando entre 10 e 20 mm ($\pm 2,5$ mm) eram normalmente pertencentes ao ápice da planta, inteiramente retilíneos e sem bifurcações, significados de forma parcial ou completa. Os galhos grossos, com diâmetros variando entre 20 e no máximo 60 mm ($\pm 11,4$ mm) foram obtidos de regiões mais medianas na planta (acima de 1,3 m), os quais comumente possuíam bifurcações e ondulações/tortuosidades devido a antigas podas de coleta ou ao próprio desenvolvimento vegetativo, sendo completamente significados. Os galhos foram identificados em nível de população.

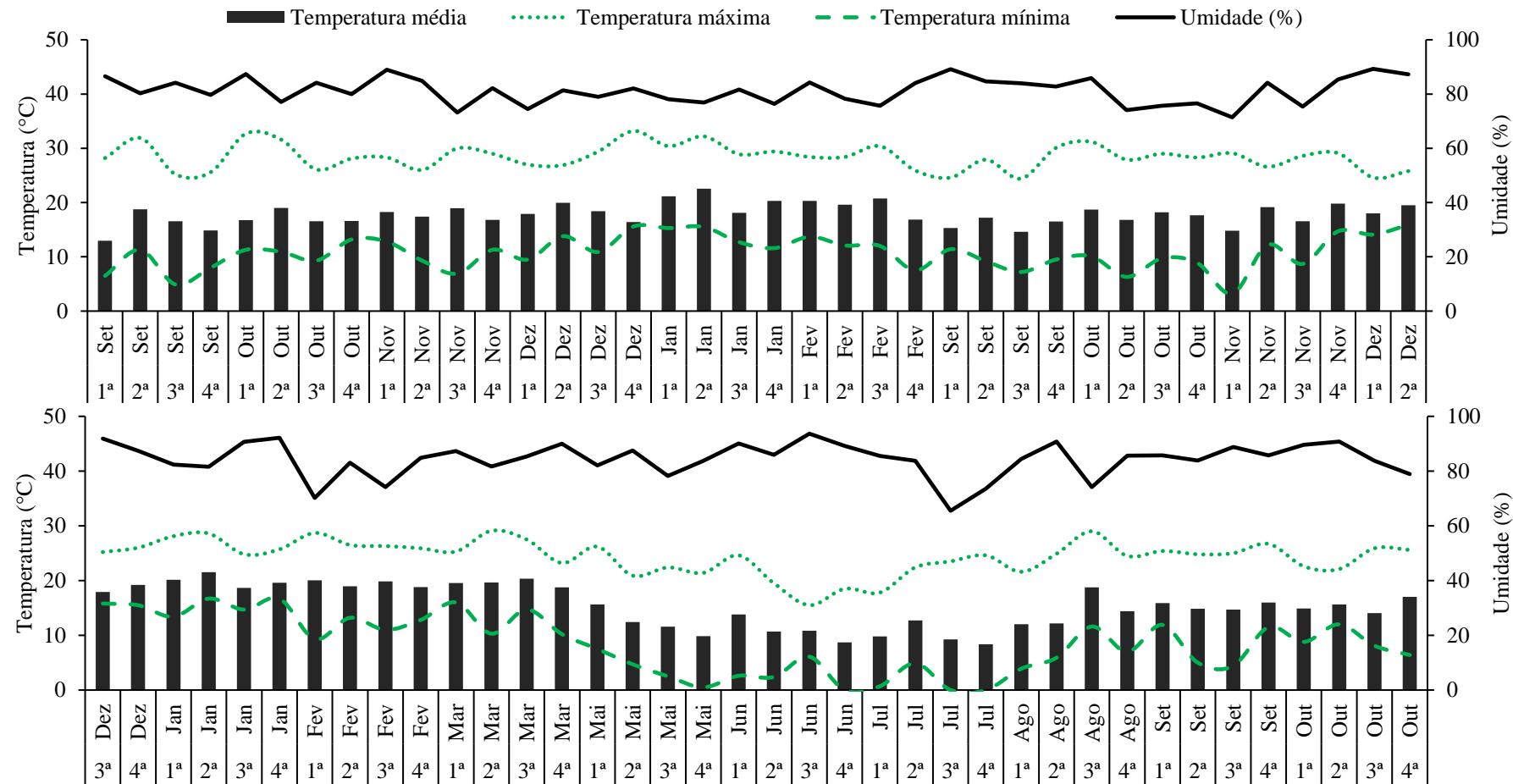
3.2.4 Transporte do material vegetal

Após a coleta, as brotações foram armazenadas em caixa de isopor ou em sacos plásticos (100 L), ambos com água resfriada para evitar a desidratação excessiva durante o transporte. Quando usada a caixa de isopor, parte do material permanecia parcialmente submerso em água com a tampa fechada, enquanto nos sacos ocorria borrifo de água no momento do armazenamento e durante o transporte de acordo com o tempo e necessidade, permanecendo sempre este aberto para evitar sobreaquecimento. Semelhantemente, os galhos destacados foram armazenados em sacos plásticos (100 L) com água, sendo estes selados posteriormente.

O material vegetal foi destinado ao Viveiro Florestal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) do Centro de Ciência Agroveterinárias (CAV) ($27^{\circ}47'33''$ S; $50^{\circ}18'04''$ O), no município de Lages (SC), que possui clima temperado (Cfb) e precipitação média anual de 1.441 mm (Figura 1), para posterior processamento.

Figura 1 — Dados das temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) médias, máximas e mínimas, e umidade relativa do ar (%) para o tempo de ocorrência de experimentos de estaquia e galhos destacados (de setembro de 2019 a fevereiro de 2020 e de setembro de 2020 a novembro* de 2021) no município de Lages,

Santa Catarina



Fonte: INMET, 2022; *Dados de abril e novembro de 2021 não estavam presentes no banco de dados; **Temperaturas mínimas abaixo de zero, chegando a até $-3,0^{\circ}\text{C}$; Valores de temperatura máxima e mínima foram consideradas aquelas maiores/menores obtidas na semana. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

3.2.5 Processamento do material vegetal

Ao chegar no Viveiro Florestal, as brotações foram separadas e processadas de acordo com cada genótipo. As brotações foram seccionadas em estacas (± 5 cm) com tesoura de poda, com corte em bisel, mantendo uma ou mais folhas com 50% de sua área reduzida para evitar a transpiração excessiva. Devido à escassez de material vegetal de alguns indivíduos, somente o ápice (região contendo as últimas folhas) e a base (quando muito significada) não foram utilizadas para produção de estacas. As estacas foram mantidas e água até o momento de sua implantação no substrato.

Os galhos destacados, quando necessário, foram redimensionados com serrote de poda em galhos de menor comprimento (entre 20 e 50 cm). Estes tiveram seus ápices selados com plástico para evitar a desidratação excessiva e prolongar sua vida útil. De todos os galhos foram removidas suas brotações e folhas remanescentes, assim como qualquer outro material vegetal não pertencente ao galho, oriundos de plantas vizinhas, musgos ou liquens.

Para micropagação, as brotações foram seccionadas em explantes ($\pm 2,0$ cm) com tesoura de poda, removendo as folhas, mas mantendo ao menos uma gema foliar. Este material foi armazenado em água até o momento do processo de desinfestação e micropagação propriamente dita no Laboratório de Propagação e Melhoramento da Engenharia Florestal (LAPROMEF) da UDESC. As demais etapas e procedimentos de micropagação, tal como meio, desinfestação e variáveis analisadas, estão apresentadas em um capítulo próprio (item 8).

3.2.6 Acondicionamento das estacas e galhos destacados

Para a estquia, foram utilizadas bandejas (20 L) ou tubetes (110 cm^3) contendo um dos seguintes substratos:

- I. Uma mistura homogênea e umedecida de substrato comercial, composto de uma mistura de casca de *Pinus* sp., cinzas, vermiculita, turfa, serragem e bioestabilizadores (aditivos: correção de acidez – 0,5%, fosfato natural – 0,5%, fertilizante mineral NPK – 0,6%; densidade: 310 kg m^{-3}), e vermiculita fina (1:1 ou 1:2 v/v), ou;
- II. Composto de uma mistura de turfa, vermiculita, resíduo orgânico classe “A” e calcário (densidade: 130 kg m^{-3}), não sendo adicionado mais vermiculita fina além da já presente no substrato comercial em função da sua baixa densidade.

Houve o acréscimo de 6 g L⁻¹ de fertilizante NPK (15-9-12) de liberação controlada em ambos os substratos, com o intuito de garantir a continuidade do desenvolvimento de estacas efetivamente enraizadas. O tipo de substrato utilizado para cada experimento está determinado em cada capítulo.

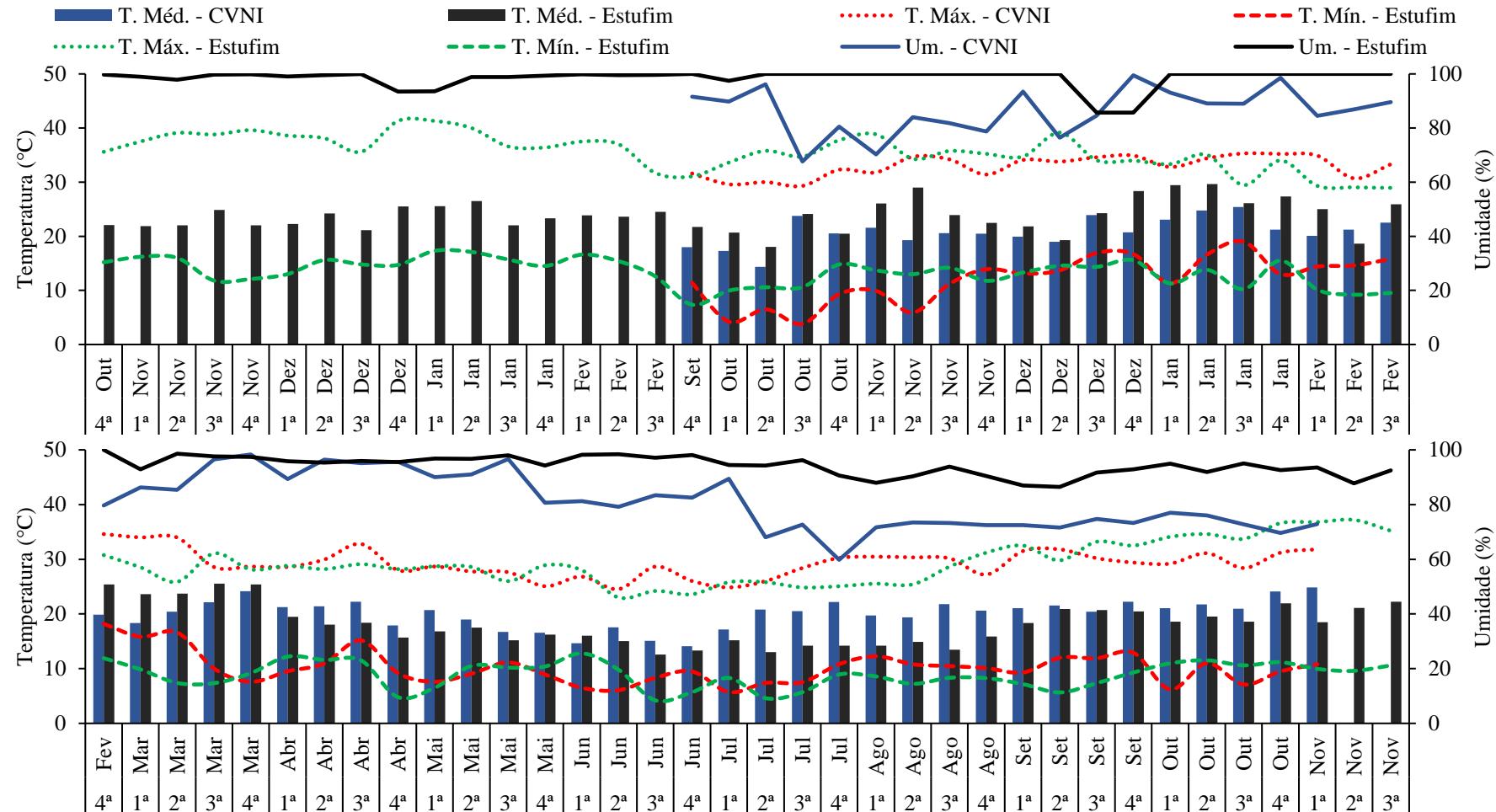
As bandejas (20 L) ou bandejas de tubetes (110 cm³) contendo as estacas foram acondicionadas em um dos seguintes ambientes:

- I. Um estufim inserido sob uma casa de vegetação com sombrite (50%) no Viveiro Florestal da UDESC, possuindo irrigação automática por microaspersão, composta de quatro irrigações diárias de dez minutos cada (9:00, 12:00, 15:00 e 18:00 horas) (PEREIRA *et al.*, 2019), sendo que porções ou lados inteiros deste podem ser abertos a fim de diminuir a temperatura em dias de calor excessivo, ou;
- II. Uma casa de vegetação com irrigação por nebulização intermitente (CVNI) de uma empresa florestal localizada no município de Otacílio Costa (SC) (27°31'18" S; 50°06'07" O) (NASCIMENTO *et al.*, 2020), o qual possui clima temperado (Cfb), com temperatura média de 16,3 °C e precipitação média anual de 1.519 mm. Este ambiente tem objetivo de propagar e manter genótipos com possíveis características superiores de *Eucalyptus* sp., possuindo controle de temperatura e umidade do ar, a fim de minimizar os efeitos das estações e dias frios, assim como garantir a maior sobrevivência e enraizamento dos propágulos.

Destes ambientes, foram coletadas informações de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) com o uso de um datalogger, obtendo estes dados a cada dez minutos durante todo o período do experimento (Figura 2). Somente o capítulo III (item 6) testou ambos os ambientes de enraizamento, enquanto para os demais foi utilizado apenas o ambiente I.

Os galhos destacados foram implantados em bandejas (20 L) preenchidos com vermiculita fina umedecida ou substrato descartado (2/3) para dar sustentação vertical. O uso de vermiculita para sustentação objetivou evitar a proliferação de plantas espontâneas e fungos que poderiam afetar o desenvolvimento das brotações epicórmicas dos galhos, apenas não ocorrendo para capítulo I, sendo usado substrato descartado. Para galhos armazenados de forma horizontal, estes foram posicionados sobre bandejas de tubetes para evitar o contato direto com o chão. Em seguida, os galhos foram acondicionados no estufim, sob mesmas condições de temperatura e umidade anteriormente descritos (ambiente I).

Figura 2 — Dados das temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) médias, máximas, mínimas, e umidade relativa do ar (%) para o tempo de ocorrência de experimentos de estquia e brotação de galhos destacados, de setembro* de 2019 a fevereiro* de 2020, e de setembro de 2020 a novembro de 2021, no estufim (ambiente I) e casa de vegetação com irrigação por nebulização intermitente (ambiente II)



*Dados de setembro de 2019 e de final de fevereiro de 2020 a junho de mesmo ano não foram obtidos devido ao mau funcionamento do datalogger no estufim do Viveiro Florestal da UDESC; Valores de temperatura máxima e mínima foram consideradas aquelas maiores/menores obtidas na semana. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

3.2.7 Variáveis analisadas

Para a avaliação do potencial de enraizamento da estquia foi avaliada: sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número médio de raízes formadas, presença de novas brotações (%) e permanência de folhas originais (%). Foram consideradas estacas vivas aquelas apresentando material ainda verde, sem apresentar sua base ou ápice com quaisquer níveis de oxidação, enraizadas ou não, podendo conter folhas e/ou novas brotações. Foram consideradas com calos as estacas ainda vivas que apresentassem quaisquer tipos e níveis de massa não diferenciada na sua base, enraizadas ou não. Ainda, os dados de calos estão comparados com os valores obtidos da sobrevivência no momento da apresentação dos resultados, ou seja, a porcentagem da sobrevivência subtraída pela de calos, fornecendo a porcentagem de estacas sem calos. O enraizamento foi considerado na presença de raízes bem formadas, com comprimento maior ou igual do que 0,5 cm. O número de raízes foi contado em todas as estacas enraizadas, considerando somente as raízes principais, não contabilizando bifurcações de uma mesma raiz. Novas brotações foram consideradas quando um conjunto de novas folhas eram formadas após o processo de estquia em estacas vivas, com tamanho maior ou igual do que 0,5 cm. As folhas originais eram aquelas que foram mantidas no processo de estquia com área reduzida, avaliadas de acordo com sua permanência.

Para os galhos destacados foram avaliados: sobrevivência dos galhos (%), período de produção de brotações epicórmicas (dias), galhos com brotações (%), número médio de brotações produzidas e comprimento médio de brotações (cm). Galhos considerados mortos apresentavam estar secos ou com elevada desidratação, quebradiços e com uma coloração variando entre cinza e verde. Foram consideradas brotações o desenvolvimento de quaisquer gemas no galho, com a presença de novas folhas com tamanho maior ou igual do que 0,5 cm. O número de brotações foi obtido pela contagem direta, não sendo contabilizadas brotações que apresentassem quaisquer níveis de oxidação. O comprimento de brotações foi obtido com régua milimétrica comum, mensurando desde a base da brotação até a base do pecíolo da última folha. Adicionalmente, três categorias de uso das brotações a partir de seu comprimento médio foram determinadas (adaptado de WENDLING *et al.*, 2013), sendo: maiores do que 4 cm – as quais poderiam ser usadas para estquia; entre 4 cm e 2 cm – as quais poderiam ser usadas para micropromoção, e; menores que 2 cm, sem quaisquer usos imediatos.

3.2.8 Análise estatística comum a todos os experimentos

Para os dados qualitativos, estes foram testados quanto à sua normalidade (Shapiro-Wilk), em que, quando não atendidos, foram transformados por Box Cox. Com a normalidade atingida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com os tratamentos significativos avaliados em teste de médias (Scott-Knott). A estatística foi conduzida utilizando o software SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2020).

A fim de garantir uma melhor confiabilidade nas análises realizadas para os dados qualitativos, o cálculo de acurácia experimental (AE%) foi realizado para os tratamentos significativos pela ANOVA. A acurácia experimental avalia o grau de confiabilidade experimental, considerando as faixas: menos do que ou igual à 50% (baixa), entre 50% e 70% (média), entre 70% e 90% (alta) e maior do que 90% (muito alta) (RESENDE e DUARTE, 2007; NAVROSKI *et al.*, 2013). Esta foi obtido pela fórmula:

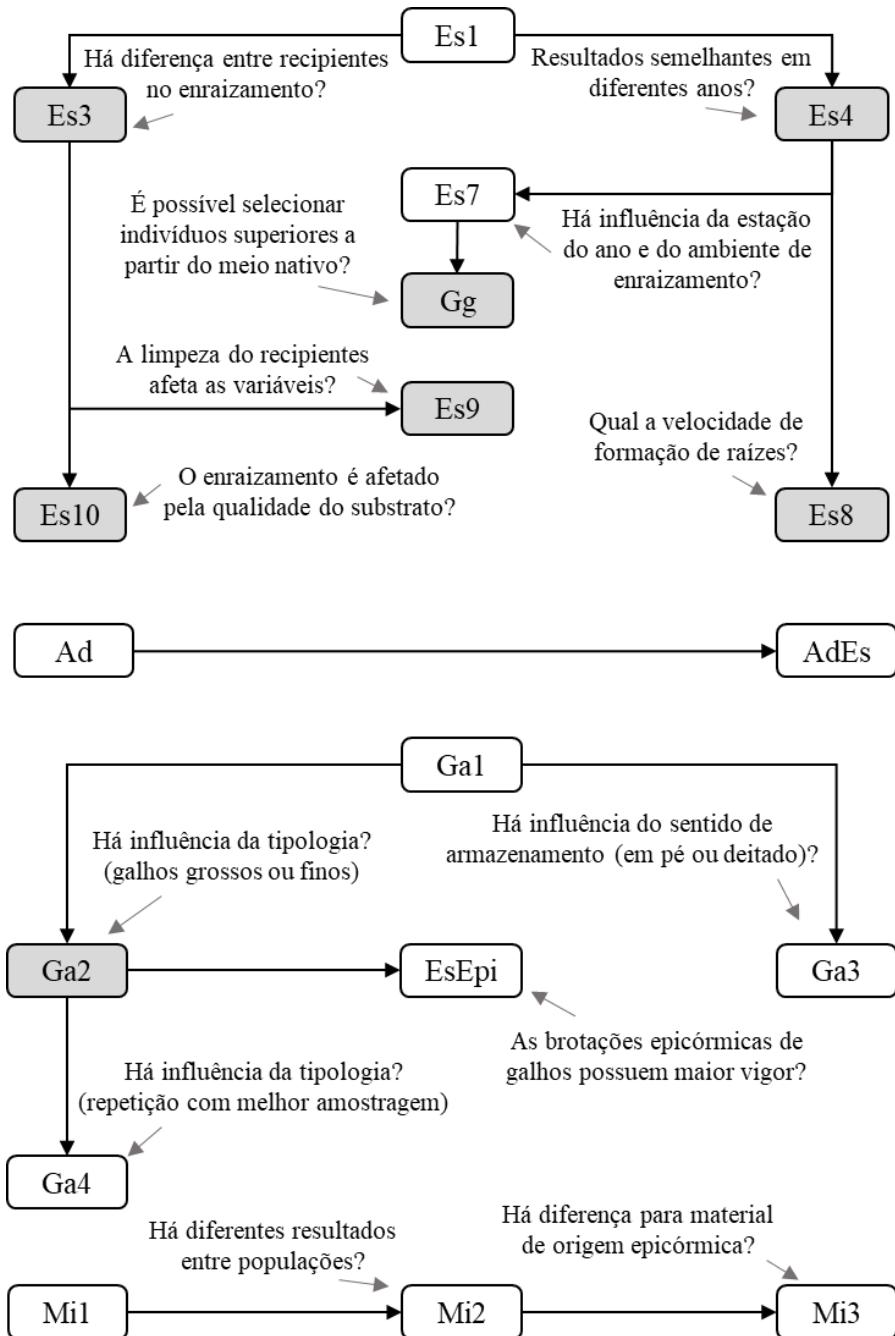
$$\text{Acurácia experimental (%)}: \sqrt{1 - \left(\frac{1}{F}\right)} \times 100$$

Em que: F – valor obtido da razão entre quadrados médios do tratamento (QM_{trat}) e resíduo (QM_{res}), da ANOVA.

3.3 RESUMO DOS EXPERIMENTOS

A realização de novos experimentos ocorreu devido às conclusões obtidas a partir dos resultados dos experimentos anteriormente realizados, formulando novas hipóteses a serem testadas. Desta forma, as principais alterações das metodologias ocorreram a partir do reajuste destas (Figura 3 e Tabela 3). Entretanto, neste trabalho estão apresentados somente os experimentos mais relevantes, principalmente para estaquia (Es1; EsAd; Es7; EsEpi) e galhos destacados (Ga1; Ga3; Ga4). De mesma forma, os demais (Es3; Es4; Es8; Es9; Es10 para estaquia, e Ga2 para galhos) não foram apresentados, com o objetivo de facilitar os processos de escrita e leitura deste trabalho.

Figura 3 — Fluxograma dos experimentos realizados, de acordo com os seus reajustes e formulação de novas hipóteses



Em que: Es: experimentos de estacaia, Ga: experimentos de galhos, Ad: experimentos de adubação, Mi: experimentos de micropropagação, Gg: experimentos de ganhos genéticos, Epi: material epicôrmico; Os números (*n*) quando presentes indicam a ordem dos experimentos; Experimentos destacados em cinza foram realizados, mas não estão apresentados neste trabalho; Os experimentos Ad e AdEs não possuíram ajustes ou reformulações após suas respectivas avaliações. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Tabela 3 — Resumo das principais características dos experimentos e análises da propagação vegetativa de *I. paraguariensis*

Exp.	Pop.	Inst.	Avaliação	Recipiente/Sentido	Meio de enraizamento	Acondicion.	Resumo do experimento/tratamentos
Es1	Todas	set/19	Final 150 dias	Bandeja (20 L)	Sub. I + verm. (1:1)	Estufim	5 populações e 50 genótipos
Ga1	Todas	set/19	A cada 30 dias (90)*	Verticalmente	-	Estufim	5 populações
Ad	TB	set/19	Aos 150 e 350 dias	-	-	No campo	5 adubações X 2 avaliações
EsAd	TB	**	Final 120 dias	Bandeja (20 L)	Sub. I + verm. (1:1)	Estufim	5 adubações X brot. epic. X 2 est. do ano
Es7	TB e UR	***	A cada 90 dias (360)	Tubete (110 cm ³)	Sub. II	Estufim e CVNI	2 populações X 4 est. do ano X 2 ambientes
Gg	TB e UR	-	-	-	-	-	Análise genética do Es7 pelo SELEGEN
Es3	TB e UR	set/20	Final 120 dias	Bandeja (20 L) e tubete (110 cm ³)	Sub. I + verm. (1:2)	Estufim	2 populações X 2 recipientes
Es4	TB e UR	****	Final 120 dias	Bandeja (20 L)	Sub. I + verm. (1:1)	Estufim	2 populações X 2 anos
Es8	TB e UR	set/20	A cada 21 dias (126)	Tubete (110 cm ³)	Sub. I + verm. (1:2)	Estufim	2 populações X tempo
Es9	TB e UR	mar/21	Final 90 dias	Tubete (110 e 180 cm ³)	Sub. II	Estufim	2 populações X limpeza do recipiente
Es10	TB e UR	jul/21	Final 90 dias	Tubete (110 cm ³)	*****	Estufim	2 populações X 5 substratos
Ga2	TB e UR	set/20	A cada 15 dias (90)	Verticalmente	-	Estufim	2 populações X 2 diâmetros X tempo
Ga3	TB	dez/20	A cada 15 dias (120)	Vert. e horzint.	-	Estufim	2 diâmetros X 2 sentidos X tempo
Ga4	TB e UR	dez/20	A cada 7 dias (70)	Verticalmente	-	Estufim	2 populações X 2 diâmetros X tempo
EsEpi	TB	dez/20	Final 90 dias	Tubete (110 cm ³)	Sub. II	Estufim	Brot. copa e brot. epic (galhos).
Mi1	UR	set/20	Final 15 dias	Vidro (150 ml)	Meio MS	LAPROMEF	1 população (brot. copa) X 4 LEDs
Mi2	TB e UR	jul/21	Final 15 dias	Tubo de ensaio (70 ml)	Meio MS	LAPROMEF	2 populações (brot. copa) X 4 LEDs
Mi3	TB e UR	nov/21	Final 15 dias	Vidro (150 ml)	Meio MS	LAPROMEF	2 populações (brot. epic.) X 4 LEDs

Em que: Exp. – experimentos realizados, sendo Es: estaquia, Ga: galhos, Ad: adubação, Mi: micropropagação; Pop. – populações utilizadas nos experimentos; Inst. – época de instalação dos experimentos; TB – Três Barras; UR – Urupema; Experimentos destacados em cinza foram realizados, mas não estão apresentados neste trabalho, como anteriormente citado. *Avaliação final, quando mais de uma avaliação, entre parênteses; ** Experimento instalado em fevereiro de 2020 com repetição em setembro de 2020; ***Experimento ocorrendo a cada estação do ano, com início na primavera de 2020; ****Experimento instalado em setembro de 2019 com repetição em setembro de 2020; Experimento instalado em setembro de 2019 com repetição em fevereiro de 2019; *****Experimento instalado avaliando o enraizamento de estacas dispostas em diferentes substratos. CVNI: Casa de vegetação com nebulização intermitente; LAPROMEF: Laboratório de propagação e melhoramento florestal. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4 CAPÍTULO I – RESGATE E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* DE DIFERENTES POPULAÇÕES

4.1 RESUMO

O objetivo foi avaliar o resgate e a propagação vegetativa de *I. paraguariensis* em diferentes populações e genótipos de dois estados do Sul do Brasil. Desta forma, dois experimentos foram instalados a fim de testar: I) a estquia de cinco populações, pertencendo aos municípios de Catanduvas (CT), Cruz Machado (CM), Painel (PL), Três Barras (TB) e Urupema (UR), utilizando dez genótipos de cada população, e; II) brotação epicórmica de galhos destacados destas mesmas populações. Para a estquia foi avaliado: a sobrevivência (%), presença de calos (%), o enraizamento (%), a presença de novas brotações (%) e a permanência das folhas originais (%). Os galhos foram avaliados a cada 30 dias após seu condicionamento, observando: galhos com brotações (%), o número de brotações e o comprimento de brotações (cm). Quanto à estquia, observou-se uma baixa porcentagem de sobrevivência em todas as populações (< 15%), mas alguns genótipos apresentaram melhor adaptação, principalmente da população de TB, chegando a no máximo 46%. Maior parte das estacas vivas apresentou calos (> 70%), característico de material com alta maturidade, mas com até 18% de estacas vivas sem calos para determinados genótipos. O enraizamento foi baixo em nível de população (< 1,5%) e genótipo (< 10%). Quanto aos galhos, estes apresentaram brotações até 60 dias, com a população de TB obtendo maior número total de brotações (aproximadamente 300) para a primeira avaliação, a qual diminuiu drasticamente para a segunda (cerca de 70). Embora os baixos resultados de sobrevivência e enraizamento, foi detectado um potencial de propagação vegetativa para a população de TB e seus genótipos.

Palavras-chave: Estquia; Galhos destacados; Brotação epicórmica; Erva-mate.

4.2 ABSTRACT

The objective was to evaluate the rescue and vegetative propagation of *I. paraguariensis* in different populations and genotypes from two states in southern Brazil. In this way, two experiments were installed in order to test: I) the cuttings of five populations, belonging to the municipalities of Catanduvas (CT), Cruz Machado (CM), Panel (PL), Três Barras (TB) and Urupema (UR), using ten genotypes of each population, and; II) epicormic sprouting of

detached branches from these same populations. For cuttings, the following were evaluated: survival (%), presence of calluses (%), rooting (%), presence of new sprouts (%) and permanence of the original leaves (%). The branches were evaluated every 30 days after conditioning, observing: branches with sprouts (%), the number of sprouts and the length of sprouts (cm). As for cuttings, a low percentage of survival was observed in all populations (< 15%), but some genotypes showed better adaptation, especially in the TB population, reaching a maximum of 46%. Most of the live cuttings showed calluses (> 70%), characteristic of material with high maturity, but with up to 18% of live cuttings without calluses for certain genotypes. Rooting was low in population (< 1.5%) and genotype (< 10%) levels. As for the branches, they presented sprouts up to 60 days, with the TB population obtaining the highest total number of sprouts (approximately 300) for the first evaluation, which decreased dramatically for the second (about 70). Despite the low survival and rooting results, a potential for vegetative propagation was detected for the TB population and its genotypes.

Keywords: Cutting. Detached live branches. Epicormic sprouting. Yerba-mate.

4.3 INTRODUÇÃO

A espécie arbórea *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquiifoliaceae), popularmente conhecida como erva-mate, está amplamente distribuída pela Floresta Ombrófila Mista, inserida, de maneira concentrada no Sul do Brasil, mas também presente na Argentina, Uruguai e Paraguai (MARTINS-RAMOS *et al.*, 2011; LORENZI, 2016; FLORA DO BRASIL, 2020). Possui um amplo mercado consumidor de produtos que passam por pouco processamento, como chás e bebidas quentes (REICHERT *et al.*, 2013), mas com potencial de uso farmacêutico, visto sua ampla gama de propriedades fitoquímicas, tais como a cafeína e a teobromina (DARTORA *et al.*, 2013; CARDOZO JUNIOR e MORAND, 2016). Entretanto, é uma espécie que possui variações destas características de acordo com as populações e em nível de genótipos (WENDLING e BRONDANI, 2015; SANTIN *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2021).

Esta diferença entre indivíduos ocorre devido a sua propagação sexuada, que permite uma maior variação genética, capaz de produzir diferentes fenótipos em uma mesma espécie (XAVIER *et al.*, 2013). Todavia, esta mesma variação genética, essencial na adaptação da espécie no ambiente, é um dos principais fatores responsáveis pela heterogeneidade da produtividade e do produto final. Assim, o uso de sementes de *I. paraguariensis* para produção de mudas pode ser problemático a longo prazo, visto que além da heterogeneidade decorrente

da variação genética, existem vários fatores que dificultam sua germinação, principalmente relacionados às suas dormências (GALÍNDEZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020).

Com enfoque em seu potencial econômico e a fim de superar estes problemas, recentemente diversos experimentos com esta espécie foram conduzidos utilizando a técnica de propagação vegetativa (WENDLING *et al.*, 2013; STUEPP *et al.*, 2015, 2017a, 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018, 2019a, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021). A principal vantagem desta técnica está na seleção direta de indivíduos com características superiores, permitindo que sejam produzidos ervais com maior homogeneidade e melhor qualidade do produto final. Mas, mesmo com estudos atuais, ainda existem lacunas no conhecimento sobre a propagação vegetativa para esta espécie, visto a grande variação de enraizamento entre indivíduos (VIEIRA *et al.*, 2021), ocorrendo mesmo de uma mesma população (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Atualmente, o maior desafio está na superação da maturação do material vegetal de *I. paraguariensis* a partir de técnicas não destrutivas (WENDLING *et al.*, 2013; STUEPP *et al.*, 2018). Isto se deve, pois, as características desejáveis nos indivíduos de interesse somente são expressas após atingirem certos níveis de maturidade. A utilização de propágulos oriundos de brotações maduras possui certos níveis de enraizamento, mas consideravelmente baixos quando comparados com material juvenil (STUEPP *et al.*, 2017a, 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018; 2019a).

Para este fim, determinadas técnicas podem ser utilizadas para superar este fator, como pelo uso de brotações epicórmicas, as quais podem ser obtidas a partir de galhos destacados fisiologicamente vivos (ALMEIDA *et al.*, 2007; WENDLING *et al.*, 2013). Estes galhos são armazenados em uma casa de vegetação sob condições favoráveis para sua brotação, utilizando de suas reservas energéticas para tanto, sendo uma fonte contínua de propágulos para a propagação vegetativa. Desta forma, os galhos destacados possibilitam a produção de brotações com características juvenis, uma vez que podem ser coletados de porções mais baixas da planta mãe, ontogeneticamente mais jovens (WENDLING *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar a propagação vegetativa de *I. paraguariensis* em função de diferentes populações e seus genótipos. Para tanto, a fim de testar a principal hipótese de que existem diferenças no enraizamento e na brotação epicórmica para o resgate desta espécie de acordo com a localização geográfica das populações, utilizou-se da estauquia de brotações de copa e a brotação epicórmica de galhos destacados.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Estaquia de diferentes populações e genótipos

Para elaboração deste experimento, foram selecionados dez genótipos (Tabela 4) de cada uma das cinco populações de *I. paraguariensis*, dos quais tiveram suas brotações coletadas e seccionadas em estacas. As populações estudadas foram Catanduvas (CT), Cruz Machado (CM), Painel (PL), Três Barras (TB) e Urupema (UR). O material foi armazenado no ambiente de enraizamento I (estufim do Viveiro Florestal da UDESC), de setembro de 2019 a fevereiro de 2020, em que as estacas foram postas para enraizar em bandejas (20 L) utilizando o substrato I (vermiculita 1:1 v/v). O substrato consistiu de uma mistura de casca de *Pinus* sp., cinzas, vermiculita, turfa, serragem e bioestabilizadores (aditivos: correção de acidez – 0,5%, fosfato natural – 0,5%, fertilizante mineral NPK – 0,6%; densidade: 310 kg m⁻³).

Tabela 4 — Diâmetro na altura do peito (DAP) dos indivíduos de *I. paraguariensis* de cinco populações (CT, CM, PL, TB e UR), em que foram coletadas brotações para elaboração de experimento de estaquia e coleta de galhos destacados para produção de brotações epicórmicas

Indivíduo	CT	CM	PL	TB	UR
	cm				
1	10,1	6,7	13,4	12,8	9,5
2	8,2	7,3	9,2	6,6	4,8
3	7,2	14,3	8,9	6,2	5,9
4	7,6	8,1	5,4	7,8	8,6
5	11,8	7,2	5,9	9,5	5,3
6	8,8	11,6	8,0	6,0	4,0
7	9,5	10,8	5,4	7,8	8,0
8	9,4	9,3	5,9	9,5	5,6
9	14,1	15,1	6,8	5,6	6,4
10	8,0	11,3	12,7	6,4	6,5
Médias	9,5	10,2	8,2	7,8	6,5

Sendo: CT – Catanduvas; CM – Cruz Machado; PL – Painel; TB – Três Barras; UR – Urupema. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Após 150 dias (fevereiro 2020), foram avaliados os resultados de estaquia para cada genótipo e para cada população. Entretanto, não foram apresentados os resultados de número médio de raízes a partir de estacas enraizadas para este experimento em função das baixas porcentagens de enraizamento obtidos.

Este experimento de estaquia foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), avaliando separadamente em nível das cinco populações (CT, CM, PL, TB e UR) e dez

genótipos de cada população (por exemplo: CT1, CT2, CT3 ... CT10). Aproximadamente, 50 estacas foram produzidas para cada indivíduo (genótipos). Cada repetição constou de dez repetições de cinco estacas cada.

4.4.2 Brotação epicórmica de galhos destacados de cinco populações

Devido ao baixo número amostral possível para cada indivíduo, considerando houve apenas a coleta de um galho por genótipo, a avaliação deste experimento ocorreu somente em função das populações. Estes galhos não passaram por uma padronização no momento de seleção quanto ao seu formato, sendo obtidos diferentes tipos para uma mesma população. As avaliações ocorreram a cada 30 dias (início em outubro 2019), não ocorrendo a avaliação da sobrevivência dos galhos para este experimento, visto a sua não ocorrência em experimentos anteriores (WENDLING *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Este experimento de brotação epicórmica de galhos destacados foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x2, sendo o fator “A” as cinco populações (CT, CM, PL, TB, UR) e o fator “B” sendo os períodos de avaliação (a cada 30 dias). Os galhos obtidos de cada indivíduo foram considerados como uma repetição, totalizando dez repetições por população.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Estaquia em diferentes populações e genótipos

De todas as variáveis analisadas para populações e genótipos, somente o enraizamento não foi significativo em nível populacional (ANEXO A). A sobrevivência das estacas, formação de calos e a sua brotação obtiveram valores muito altos de AE% ($> 90\%$), enquanto a presença de folhas originais e o enraizamento para os genótipos obtiveram valores considerados altos de AE% (entre 70% e 90%).

Em nível populacional, a sobrevivência média de todas as populações foi abaixo de 15%, refletindo nas demais variáveis analisadas. Neste quesito, a maior média foi apresentada pela população de Três Barras (TB) (12,2%), sendo esta ao menos três vezes maior do que as demais populações. Já para os genótipos, houve uma grande variação de resultados, mesmo quando pertencentes a uma mesma população. Dos 50 genótipos testados, somente 22 apresentaram ao menos uma estaca viva ao final do experimento.

A presença de estacas vivas com calos seguiu a mesma proporção em relação a porcentagem de sobrevivência, com exceção de TB em nível populacional (Tabela 5). Para esta população, estacas com calos foram aproximadamente metade das sobreviventes (6,8%), enquanto para as demais estes valores foram muito mais aproximados (entre 0,2% e 0,4% de diferença).

Tabela 5 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), brotação (%) e permanência das folhas originais (%) em estacas de *I. paraguariensis* de cinco populações e seus genótipos

População Genótipo*	Sobrevivência	Calos	Enraizamento %	Brotação	Folhas originais
CT	1,4 c**	1,2 c	0,0	1,0 b	0,4 b
CM	3,8 b	3,4 b	0,4	2,2 b	1,4 a
PL	2,6 b	2,2 c	1,0	2,2 b	0,4 b
TB	12,2 a	6,8 a	1,2	8,6 a	2,6 a
UR	3,0 b	3,0 b	0,6	2,0 b	1,4 a
Média	4,6	3,3	0,7	3,2	1,2
CT1	2,0 f	0,0 d	0,0 c	2,0 f	0,0 b
CT5	2,0 f	2,0 d	0,0 c	2,0 f	0,0 b
CT6	4,0 f	4,0 d	0,0 c	4,0 e	0,0 b
CT9	2,0 f	2,0 d	0,0 c	0,0 f	2,0 b
CT10	4,0 f	4,0 d	0,0 c	2,0 f	2,0 b
CM1	2,0 f	2,0 d	0,0 c	0,0 f	0,0 b
CM6	22,0 c	20,0 b	0,0 c	16,0 c	10,0 a
CM8	8,0 e	8,0 d	0,0 c	4,0 e	2,0 b
CM9	2,0 f	2,0 d	0,0 c	0,0 f	0,0 b
CM10	4,0 f	2,0 d	4,0 b	2,0 f	2,0 b
PL6	6,0 e	6,0 d	2,0 c	6,0 e	0,0 b
PL7	20,0 c	16,0 b	8,0 a	16,0 c	4,0 b
TB1	46,0 a	32,0 a	6,0 a	32,0 a	12,0 a
TB2	12,0 d	4,0 d	2,0 c	8,0 d	2,0 b
TB3	28,0 b	20,0 b	4,0 b	18,0 c	0,8 a
TB6	2,0 f	2,0 d	0,0 c	2,0 f	0,0 b
TB7	28,0 b	10,0 c	0,0 c	26,0 b	4,0 b
TB8	6,0 e	0,0 d	0,0 c	2,0 f	0,0 b
UR5	2,0 f	2,0 d	0,0 c	0,0 f	0,0 b
UR8	4,0 f	4,0 d	0,0 c	0,0 f	2,0 b
UR9	12,0 d	12,0 c	2,0 c	10,0 d	0,8 a
UR10	12,0 d	12,0 c	4,0 b	8,0 d	4,0 b

Sendo: CT – Catanduvas; CM – Cruz Machado; PL – Painel; TB – Três Barras; UR – Urupema; *Estão presentes somente os genótipos que apresentaram ao menos uma estaca viva; **Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Tal como a sobrevivência, o enraizamento não atingiu valores acima de 2%, mas com destaque para a população de TB (1,2%) e Painel (PL) (1,0%). Para genótipos, PL7 (8,0%), TB1 (6,0%) e CM10 (4,0%), TB3 (4,0%) e UR10 (4,0%).

Tal qual a formação de calos, a formação de novas brotações foi proporcional a porcentagem de sobrevivência para populações e genótipos. Aproximadamente 2/3 das estacas

da população de TB produziram novas brotações (8,6%) e, com exceção de Catanduvas (CT) (1,0%), as demais populações apresentaram valores aproximados entre si (2,0%).

A permanência das folhas originais das estacas não seguiu um padrão, apresentando valores menores que 3% para a média populacional. Para tanto, a população de TB se destacou (2,6%), seguido de Cruz Machado (CM) (1,4%) e Urupema (UR) (1,4%). Uma proporção similar foi obtida para os genótipos, em que as médias não superaram 12% mesmo para os genótipos com as maiores porcentagens de sobrevivência.

4.5.2 Brotação epicórmica de galhos destacados de cinco populações

Houve interação significativa entre as populações estudadas e os dois períodos de avaliação em relação a brotação e o número de brotações, enquanto o comprimento de brotações somente foi significativo quando aos períodos de avaliação (ANEXO B). Considerando as variáveis significativas, todas apresentaram valores muito altos de AE% (> 90%).

A porcentagem de brotação dos galhos apresentou variou de acordo com a avaliação, e mas de maneira mais significativa na segunda avaliação (Tabela 6). Na primeira avaliação, grande parte dos galhos brotaram, com exceção de Três Barras (TB) (90%), ocorrendo uma redução de até 90% na segunda avaliação. Apenas a população de TB (70%) não apresentou uma redução significativa da brotação na segunda avaliação, enquanto Urupema (UR) (10%) apresentou a maior redução.

Tabela 6 — Médias de brotação (%), número de brotações e comprimento de brotações (cm) de galhos destacados de *I. paraguariensis* de cinco populações.

Avaliação	Galhos com brotações epicórmicas (%) (CV% = 27,3)					
	População					
	CT	CM	PL	TB	UR	Média
30 dias	100,0 aA*	100,0 aA	100,0 aA	90,0 aA	100,0 aA	98,0
60 dias	20,0 bB	50,0 aB	20,0 bB	70,0 aA	10,0 bB	34,0
Média	60,0	75,0	60,0	80,0	55,0	66,0
Número de brotações (CV% = 39,2)						
30 dias	12,8 bA	15,7 bA	12,8 bA	28,8 aA	26,9 aA	19,4
60 dias	0,7 bB	3,0 bB	0,6 bB	7,5 aB	0,1 bB	2,4
Média	6,8	9,4	6,7	18,2	13,5	10,9
Comprimento de brotações (cm) (CV% = 64,5)						
30 dias	1,0	0,8	0,9	2,8	0,7	1,2
60 dias	0,6	1,0	0,9	3,0	0,1	1,1
Média	0,8 b	0,9 b	0,9 b	2,9 a	0,4 b	1,2

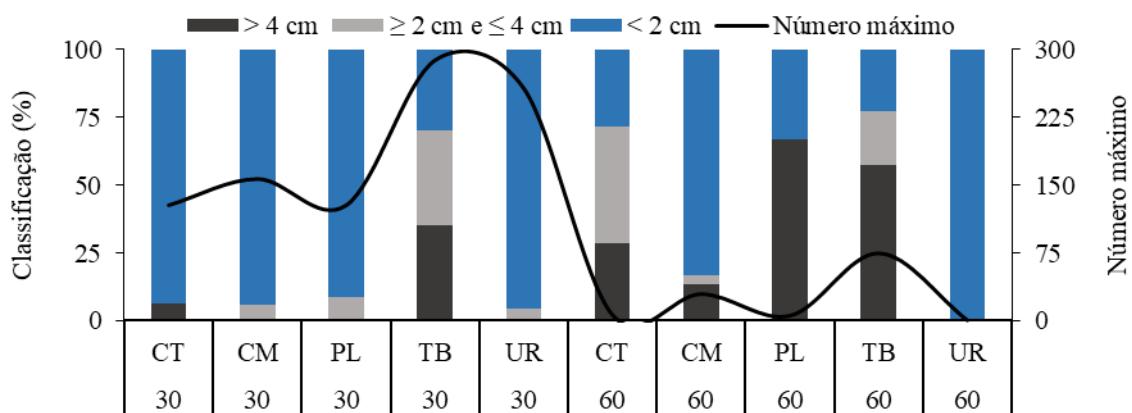
Sendo: CT – Catanduvas; CM – Cruz Machado; PL – Painel; TB – Três Barras; UR – Urupema; *Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5,0% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

De mesma forma que a brotação, o número de brotações variou proporcionalmente entre avaliações. As populações de TB (28,8) e UR (26,9) apresentaram as maiores médias durante a primeira avaliação, reduzindo na segunda avaliação em até quatro vezes para TB (7,5), mas principalmente para UR (0,1).

Entretanto, o comprimento das brotações apresentou uma resposta diferenciada em relação à porcentagem de brotação e ao número de brotações, em que as populações de TB e Cruz Machado (CM) apresentaram acréscimos na segunda avaliação Independentemente da avaliação, a maior média foi obtida para a população de TB (2,9 cm), enquanto as demais mantiveram médias estatisticamente iguais (entre 0,4 cm e 0,9 cm).

Em relação à categorização do comprimento das brotações produzidas, diferenças consideráveis entre os períodos foram observadas (Figura 4). Na primeira avaliação houve o máximo de brotações produzidas, com destaque para TB (288) e UR (257). Entretanto, somente TB apresentou brotações com comprimento contemplando todas as categorias, enquanto as demais populações permaneceram com a maior parte do material (90%) dentro da categoria de menor comprimento (< 2 cm). Durante a segunda avaliação, TB e Painel (PL) se destacaram com brotações de maior comprimento, embora com redução em seu número.

Figura 4 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de *I. paraguaricensis* de cinco populações em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm e menores do que 2 cm



Sendo: CT – Catanduvas; CM – Cruz Machado; PL – Painel; TB – Três Barras; UR – Urupema. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.6 DISCUSSÃO

4.6.1 Estaquia de diferentes populações e genótipos

A sobrevivência possivelmente pode ter sido afetada em função da época de coleta das brotações. A coleta de brotações para estaquia desta espécie ocorre comumente no início ou em meados da primavera ou verão, visto que há o gradativo aumento das temperaturas, e por consequência, aumento da atividade metabólica deste material, sendo estas as épocas mais recomendadas para tanto, visando um melhor enraizamento (STUEPP *et al.*, 2017a; SÁ *et al.*, 2018). Porém, ainda existem divergências da época mais apropriada, com melhores resultados positivos podendo ocorrer no inverno (PIMENTEL *et al.*, 2019). Entretanto, de acordo com Stuepp *et al.* (2017a), a maior sobrevivência ocorre quando o material é coletado no verão e menor quando na primavera. De mesma foram, Sá *et al.* (2018) afirmam que a menor porcentagem de mortalidade de miniestacas ocorre para materiais obtidos na primavera, com cerca de 80% do material vivo. Este fator pode ter sido uma das causas da baixa sobrevivência, uma vez que os locais de estudo dos trabalhos citados não compartilham de mesmas condições de clima, mesmo considerando as mudanças de estação, tal como provavelmente ocorreu no presente trabalho.

Outro fator determinante na sobrevivência tenha sido a amplitude térmica presente no estufim. Neste quesito, no presente trabalho, embora a umidade tenha sido constante e acima de 90%, a temperatura variou entre dia e noite em aproximadamente 25 °C em determinadas semanas (Figura 2). Umidades e temperaturas constantes são essenciais para a sobrevivência de estacas, uma vez que este material não possui raízes para a absorção de água (XAVIER *et al.*, 2013). Estudando características de enraizamento de *I. paraguariensis* de acordo com ambientes de enraizamento, Brondani *et al.* (2008, 2009) determinaram que propágulos da espécie podem apresentar uma sobrevivência eficientes mesmo em ambientes tecnologicamente divergentes. Pode-se afirmar que ainda não é completamente conhecida a relação entre as variáveis de temperatura e umidade dos ambientes e a sobrevivência de propágulos para esta espécie.

Ainda, esta variação na sobrevivência pode ter sido um reflexo direto da origem do material vegetal, sendo facilmente observado entre as populações avaliadas. É possível que os locais de origem com menores temperaturas e menor incidência solar, tais como Painel (PL) e Urupema (UR) (MARTINS-RAMOS *et al.*, 2011), produzam materiais mais sensíveis aos fatores climáticos do ambiente de enraizamento. Neste aspecto, o genótipo da planta mãe é

capaz de influenciar diretamente na sobrevivência de propágulos (FRANZON *et al.*, 2010), mas esta pode ser afetada positivamente ou negativamente de acordo com as condições climáticas do estufim. Em um estudo com diferentes genótipos da população de UR, Nascimento *et al.*, (2020) citam consideráveis variações de sobrevivência, próximas a 50% entre os genótipos de melhor e pior resposta. Pimentel *et al* (2019) destacam que pode haver variação de até 15% para genótipos bem estabelecidos para a miniestaqueia, mantidos em um mesmo local e coletados em mesma época.

Figura 5 — Estaquia de *I. paraguariensis* após a instalação do experimento (a) e na sua avaliação final aos 150 dias (b)



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Quanto ao enraizamento, este possivelmente foi negativamente afetado pelo grau de maturação do material utilizado, a partir de brotações de copa. Isto pode ser facilmente visualizado pelas elevadas porcentagens de calos (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2017a; NASCIMENTO *et al.*, 2018). Estacas de *I. paraguariensis* tendem a ter o enraizamento de forma direta, dificilmente ocorrendo após a formação de calos. A formação de calos ocorre devido a uma possível insuficiência de auxinas, dando início à diferenciação celular, mas sem completá-la (HARTMANN *et al.*, 2011).

Tal como a sobrevivência, o enraizamento também pode ter sido afetado pela amplitude térmica do ambiente de enraizamento. Brondani *et al* (2008) citam que o enraizamento desta espécie pode variar em quase 20% em função de suas variações climáticas, mesmo quando testando clones. Nesta mesma linha, em trabalhos semelhantes utilizando miniestacas de clones estabelecidos, Pimentel *et al.* (2019) e Vieira *et al.* (2021) demonstram que os genótipos também podem ser determinantes no enraizamento desta espécie, auxiliando a justificar os resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, ainda pode haver enraizamento de estacas

com calos, caso estas sejam mantidas por maiores períodos de tempo dentro do ambiente de enraizamento (STUEPP *et al.*, 2017a), desde que folhas ou novas brotações ainda estejam presentes para produção de auxinas.

Em relação às folhas nas estacas, houve uma produção considerável de novas brotações para todas as populações e seus genótipos, o que poderia garantir a produção hormonal mesmo na ausência das folhas originais. Além disto, aparentemente, a produção de novas brotações e folhas são mais dependentes de características genéticas da planta mãe, podendo ser favorecidas ou atenuadas de acordo com o ambiente de enraizamento (BRONDANI *et al.*, 2008; 2009). Embora grande parte das estacas tenham apresentado novas brotações, possivelmente estas não teriam sido suficientes para produção de auxinas, visto que se tratavam de materiais ainda em desenvolvimento, com folhas muito jovens e pequenas. Assim, a presença das folhas originais ainda se torna fundamental para o enraizamento, as quais não estavam mais presentes em grande porção das estacas.

4.6.2 Brotão epicórmica de galhos destacados de cinco populações

No presente estudo, aproximadamente 100% dos galhos, os quais foram armazenados verticalmente, apresentaram brotações epicórmicas, mas de comprimentos reduzidos com exceção da população de Três Barras (TB). As diferenças na brotação e no comprimento de brotações dos galhos possivelmente ocorreram devido a seus diâmetros, hipotetizando que diferentes formas e espessuras refletem diretamente nestas variáveis (Figura 6), podendo também estarem relacionados ao seu sentido de armazenamento (WENDLING *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2018). Galhos mais grossos podem possuir uma maior quantidade de gemas dormentes, produzindo um maior número de brotações epicórmicas (STUEPP *et al.*, 2016), mas Nascimento *et al* (2018) citam que estes podem não garantir seu desenvolvimento quando mantidos de forma horizontal, com menores porcentagens de brotação e de tamanho reduzido.

O fator ontogenético também é importante, em que os galhos obtidos mais abaixo muito possivelmente possuíam gemas mais vigorosas quando comparados aos galhos obtidos do ápice da planta mãe, também sendo um reflexo dos diâmetros. Entretanto, visto que uma padronização da coleta foi efetuada, por não se obter galhos abaixo do limite estipulado pela metodologia (1,3 m), este fator pode não ter sido determinante. No entanto, as condições ambientais de origem também podem ter sido cruciais no desenvolvimento das brotações, da mesma forma em que ocorreu para a estaquia. As populações de TB e Urupema (UR)

apresentaram um acelerado desenvolvimento inicial de brotações, decaindo mais rapidamente para UR logo na segunda avaliação e de maneira mais lenta para TB. As brotações dos galhos de UR possivelmente oxidaram mais rapidamente em relação às demais, principalmente TB, devido a amplitude térmica do estufim (XAVIER *et al.*, 2013), uma vez que pode se tratar de um material não bem adaptado às mudanças abruptas de temperatura.

Figura 6 — Exemplos de brotação epicórmica de *I. paraguariensis* a partir de galhos destacados finos (a), finos e pouco lignificados (b), grossos aos 30 dias (c) e grossos aos 60 dias (d)



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Assim, é possível que o principal fator do curto período de vida útil dos galhos e a rápida oxidação de suas brotações tenha sido em função das condições de temperatura e umidade do ambiente de armazenamento (Figura 7). Todavia, o sentido de armazenamento dos galhos pode afetar sua vida útil, podendo ser prolongado quando mantidos horizontalmente, mas com risco de uma menor produtividade (NASCIMENTO *et al.*, 2018), ou mantidos em sentido vertical, com maior produção, mas de vida útil mais curta (WENDLING *et al.*, 2013). Isto corrobora com os dados obtidos neste trabalho, podendo ser justificado pelo sentido de armazenamento, uma vez que a brotação ocorreu de maneira rápida e eficiente. Para ocorrer o desenvolvimento da parte aérea, ou seja, a produção de brotações e suas folhas, é necessário que ocorra um desbalanço hormonal com acúmulo de citocininas, as quais podem passar por rearranjos caso o sentido do material esteja invertido (TAIZ e ZEIGER, 2009). Isto ajuda a justificar a rápida brotação inicial, uma vez que os galhos foram mantidos em seu sentido natural.

Sobre a classificação das brotações de acordo com seu comprimento, durante a avaliação inicial, é possível observar um elevado número de brotações com tamanho menor do que 4 cm, os quais não poderiam ser utilizados para estaqueia. De acordo com Wendling *et al.* (2013), as brotações podem possuir maiores comprimentos após os 50 dias de armazenamento, podendo

ser utilizadas para a estaquia. Ainda, brotações entre 2 cm e 4 cm poderiam ser utilizadas para experimentos de micropropagação, expandindo os estudos sobre a propagação vegetativa da espécie, uma vez que em estudos anteriores (NASCIMENTO *et al.*, 2018) brotações de menores comprimentos também foram obtidas.

Figura 7 — Exemplos de galhos destacados de *I. paraguariensis* considerados não mais produtíveis, seja pelo possível desgaste energético em galhos finos (a e b) ou pela excessiva oxidação das brotações epicórmicas em galhos grossos (c e d)



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.7 CONCLUSÃO

Embora tenham sido obtidos genótipos enraizados de estacas de *I. paraguariensis*, suas porcentagens foram menores do que 10%, mas uma potencial superioridade sendo notada para os indivíduos da população de Três Barras. Novos estudos devem ser dirigidos entre populações focando em maiores porcentagens de sobrevivência e enraizamento para averiguar possíveis superioridades.

A brotação epicórmica de galhos destacados de *I. paraguariensis* de diferentes populações é possível, obtendo diferentes respostas de acordo com sua origem. Entretanto, novos estudos devem ser realizados entre as populações, observando novos fatores, como os diâmetros e o sentido de armazenamento dos galhos destacados.

5 CAPÍTULO II – ADUBAÇÃO DE *Ilex paraguariensis* PARA O RESGATE VEGETATIVO E SUA PROPAGAÇÃO POR ESTAQUIA

5.1 RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a produção de brotações epicórmicas pela técnica de anelamento completo de plantas mãe de *I. paraguariensis* adubadas com NPK e a estaquia das brotações obtidas. Para elaboração do experimento de resgate, doze plantas tiveram seu caule anelado e foram adubadas com NPK (5-20-10), nas doses: 0 g; 250 g; 500 g; 750 g, e; 1.000 g. Aos 150 e 350 dias foram avaliadas: presença de brotações epicórmicas (%), número de brotos e comprimento de brotos (cm). Durante ambas as avaliações houve a coleta das brotações epicórmicas e da copa dos mesmos indivíduos para elaboração de experimento de estaquia, sob influência dos mesmos tratamentos. Após 120 dias foram avaliados das estacas: sobrevivência (%), calos (%), enraizamento (%), número de raízes, novas brotações (%) e permanência das folhas originais (%). A brotação das plantas aneladas e adubadas permaneceu próxima a 75% em ambas as avaliações, em que os tratamentos de 1.000 g (4,4), 500 g (4,3) e 0 g (4,0) apresentaram o maior número de brotos. Quanto ao comprimento médio, 1.000 g (17,0 cm) e 0 g (14,0 cm) obtiveram as maiores médias, sob mesmas condições do número de brotos. Para a estaquia, a sobrevivência foi o dobro para o material de copa na primavera (36,1%), mas foi inferior para ambas as origens durante o verão (54,3% e 54,2%). A porcentagem de calos foi elevada, com somente até 10% a menos do que a sobrevivência, enquanto a média de enraizamento foi baixa (11,1%), mas sendo superior para o material epicórmico (14,1%). A aplicação do anelamento completo é uma técnica eficiente na brotação epicórmica desta espécie, mas não foi detectado efeito da adubação tanto para o resgate quanto para a estaquia.

Palavras-chave: Fertilização nitrogenada; NPK; Anelamento; Erva-mate.

5.2 ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the production of epicormic sprouts by the technique of complete girdling of *I. paraguariensis* mother plants fertilized with NPK and the cuttings of the sprouts obtained. For the elaboration of the rescue experiment, twelve plants had their stems girdled and were fertilized with NPK (5-20-10), in doses: 0 g; 250 g; 500 g; 750 g, and; 1,000 g. At 150 and 350 days, the following were evaluated: presence of epicormic sprouts (%),

number of sprouts and sprout length (cm). During both evaluations, the epicormic sprouts and canopy of the same individuals were collected for the elaboration of a cutting experiment, under the influence of the same treatments. After 120 days, the following were evaluated from the cuttings: survival (%), callus (%), rooting (%), number of roots, new sprouts (%) and permanence of the original leaves (%). The sprouting of the fertilized and girdled plants remained close to 75% in both evaluations, in which the treatments of 1,000 g (4.4), 500 g (4.3) and 0 g (4.0) presented the highest number of sprouts. As for the average length, 1,000 g (17.0 cm) and 0 g (14.0 cm) had the highest averages, under the same conditions as for the number of sprouts. For cuttings, survival was double for the canopy material in spring (36.1%), but it was lower for both sources during summer (54.3% and 54.2%). The percentage of callus was high, with only up to 10% less than survival, while the average rooting was low (11.1%), but higher for the epicormic material (14.1%). The application of complete girdling is an efficient technique in the epicormic sprouting of this species, but no effect of fertilization was detected for both rescue and cutting.

Keywords: Nitrogen fertilization; NPK; Girdling; Yerba-mate.

5.3 INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis Saint-Hilaire (Aquifoliaceae) apresenta importância econômica, social e cultural, especialmente com a região Sul do Brasil (REICHERT *et al.*, 2013), e neste contexto, possui grandes desafios com relação ao melhoramento genético, visto a dificuldade de seleção de mudas com características superiores oriundas de sementes, principalmente devido a seus problemas de germinação (GALÍNDEZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020). Desta forma, a propagação vegetativa possuí papel essencial, a partir da seleção de genótipos com características desejáveis. Porém, esta técnica também apresenta certas dificuldades devido a inúmeras fontes de variação, não havendo um protocolo específico para a espécie citada (WENDLING e BRONDANI, 2015; STUEPP *et al.*, 2018).

Aparentemente, uma destas variáveis se trata da nutrição da planta mãe ao promover uma possível maior concentração de determinados hormônios (KIBA *et al.*, 2011), podendo ocorrer para o resgate vegetativo e o enraizamento de propágulos. As células vegetais possuem uma capacidade de diferenciação celular, podendo se transformar em novos tecidos específicos, sendo esta capacidade chamada de totipotência.

Mas, para ativar este mecanismo, é necessário que o balanço existente entre certas classes de hormônios vegetais seja afetado (HARTMANN *et al.*, 2011). Os hormônios vegetais são compostos orgânicos, em que o nitrogênio (N) faz parte de sua constituição, sendo considerado o mais importante, enquanto o fósforo (P) e o potássio (K) auxiliam sua síntese, na produção de energia, e transporte, pela ativação das bombas de prótons (TAIZ e ZEIGER, 2009). A adubação com NPK é importante e eficiente na propagação de *I. paraguariensis*, possivelmente por estimular a biossíntese de hormônios vegetais (NASCIMENTO *et al.*, 2019a). Isto se deve, possivelmente, pela adubação ocasionar uma maior concentração de auxinas neste material (SAKAKIBARA, 2006), a qual pode ocorrer também de forma sintética principalmente pelo uso de AIB (HARTMANN *et al.*, 2011), mas o qual se mostra ineficaz para a espécie mesmo em grandes concentrações (STUEPP *et al.*, 2017a; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Isto demonstra a provável dependência da produção de hormônios endógenos para o sucesso de sua propagação vegetativa.

Entretanto, uma outra variável importante na propagação vegetativa desta espécie é o possível elevado nível de maturação das plantas mãe no momento do resgate vegetativo, que pode afetar de maneira direta o enraizamento dos propágulos (WENDLING *et al.*, 2014b). Para o resgate em plantas consideradas maduras podem ser aplicadas técnicas que visam a produção de brotações epicórmicas de elevado vigor vegetativo (HARTMANN *et al.*, 2011). Tais técnicas podem ser o anelamento do caule, de forma completa ou em porções, tal como o próprio corte da planta, a fim de promover um acúmulo de citocininas na área injuriada, promovendo o desenvolvimento de brotações ontogeneticamente mais jovens a partir de gemas dormentes (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2015, 2016).

Quando associada ao resgate vegetativo a partir de brotações epicórmicas, a propagação vegetativa de *I. paraguariensis* aparenta ser positivamente influenciada pela adubação NPK, em que determinados tratamentos podem atingir mais do que 80% de enraizamento de seus propágulos (NASCIMENTO *et al.*, 2019a). Então, como anteriormente constatado, é possível que indivíduos desta espécie se desenvolvam vegetativamente melhor de acordo com uma nutrição adequada, facilitando as etapas de resgate vegetativo e enraizamento de propágulos.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi testar a adubação mineral NPK em indivíduos de *I. paraguariensis* em uma população para a produção de brotações epicórmicas pela técnica de anelamento completo do caule. Ainda verificar sua resposta no enraizamento de estacas em duas épocas de coleta, considerando material de copa e epicórmico.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

5.4.1 Adubação para o resgate de brotações epicórmicas

A elaboração e condução deste experimento ocorreram em indivíduos da população de Três Barras (TB). A seleção desta população, se deve à maior uniformidade encontrada para o ambiente e para os próprios indivíduos de *I. paraguariensis*, principalmente quanto ao relevo, tamanho e espaçamento entre plantas. Quanto ao relevo, este era consideravelmente plano, diminuindo as chances de lixiviação dos tratamentos pela água. Pela área selecionada se tratar de um plantio da espécie, os indivíduos se encontravam alinhados e com idades possivelmente mais próximas, embora com diâmetros diferentes.

Quanto à seleção das plantas mãe (setembro de 2019), esta ocorreu sob critérios semelhantes ao da metodologia comum (item 3.2.2), com exceção do distanciamento entre plantas. Neste caso, por se tratar de uma área nativa conduzida associada a plantios objetivando enriquecimento, foram selecionados ao todo sessenta indivíduos nas entrelinhas com pelo menos uma planta entre as escolhidas, formando um distanciamento entre si de cerca de 4 m (Tabela 7).

Tabela 7 — Diâmetro na altura do peito (DAP) dos indivíduos de *I. paraguariensis* adubados, em que houve aplicação da técnica de anelamento completo para produção de brotações epicórmicas

Indivíduo	Adubação NPK (5-20-10) (g)				
	0	250	500	750	1.000
	cm				
1	7,0	8,6	8,3	8,8	6,4
2	6,5	7,4	5,7	6,4	7,3
3	5,8	7,2	5,7	7,0	6,5
4	7,6	8,1	6,7	6,0	7,6
5	7,3	5,4	5,4	10,4	8,3
6	5,5	7,3	5,6	5,3	6,7
7	4,9	7,2	6,7	7,2	5,7
8	4,5	4,8	7,3	8,0	9,6
9	4,8	5,9	5,7	7,9	6,0
10	7,5	6,8	7,6	8,7	5,4
11	8,2	5,2	9,3	4,9	7,8
12	11,9	6,5	8,8	5,6	6,8
Médias	6,8	6,7	6,9	7,2	7,0

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Simultaneamente à seleção dos indivíduos, foi realizado o anelamento completo do seu caule e a limpeza da vegetação rasteira espontânea no seu entorno e a coleta de solo para análise. Uma coleta de solo para análise de seus componentes químicos foi realizada em três pontos aleatórios da área experimental, com aproximadamente 20 cm de profundidade (Tabela 8). O anelamento completo foi realizado à uma altura de aproximadamente 20 cm do solo no caule principal, com uma largura aproximada de 5 cm, removendo somente a porção de casca exterior, não afetando o lenho interno. O objetivo da limpeza foi remover quaisquer tipos de vegetação presente junto ao indivíduo selecionado em uma circunferência de ao menos 1,5 m, deixando o solo exposto, pronto para a aplicação dos tratamentos de adubação.

Em seguida, procedeu-se com a adubação dos indivíduos selecionados com os tratamentos de forma aleatória. Os tratamentos de adubação mineral NPK (5-20-10) foram determinados em: 0 g (testemunha), 250 g, 500 g, 750 g e 1.000 g, sendo cada dosagem (Tabela 9) depositada sob a área anteriormente limpa e incorporada ao solo com enxada (Figura 8).

Tabela 8 — Análise química do solo previamente à adubação de *I. paraguariensis*

pH	MO	Arg.	CTC efet.	CTC pH 7,0	Ca	Mg	K	Al	H + Al	P	Cu	Zn	B	Fe	Mn
H ₂ O (1:1)	----	%	-----	-----	cmolc dm ⁻³	-----	-----	-----	-----	mg dm ⁻³	-----	-----	-----	-----	-----
4,2	3,4	54,0	7,9	36,6	1,4	0,4	0,3	5,8	34,5	7,0	5,0	1,0	-*	96,6	6,2

*Nutriente não detectado na análise de micronutrientes do solo. Fonte: Elaborada pelo autor (2022) com análise realizada pelo Laboratório de Análise do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

Tabela 9 — Composição (g) de N, P e K para cada tratamento de adubação aplicado em *I. paraguariensis*

NPK (5-20-10) (g)	Composição (g)		
	Nitrogênio (CH ₄ N ₂ O)	Fósforo (P ₂ O ₅)	Potássio (K ₂ O)
0	0	0	0
250	12,5	50	25
500	25	100	50
750	37,5	150	75
1.000	50	200	100

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Após 150 dias (fevereiro 2020) e 350 dias (setembro 2020) do estabelecimento do experimento foram avaliados: plantas mãe com brotações epicórmicas (%), número de brotações e comprimento de brotações (cm). Foram consideradas como brotações epicórmicas aquelas presentes abaixo do anelamento completo, com tamanho maior ou igual do que 0,5 cm. O número de brotações foi obtido pela contagem direta, não sendo contabilizadas brotações que

apresentassem quaisquer níveis de oxidação. O comprimento de brotações foi obtido com régua milimétrica comum, mensurando desde a base da brotação até a base do pecíolo da última folha.

Figura 8 — Exemplos de seleção de plantas mãe de *I. paraguariensis* à campo com fitas de diferentes colorações (a e b), do seu posterior anelamento completo do caule (b), da aplicação dos tratamentos de adubação (c) e sua incorporação ao solo (d)



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O experimento de brotação epicórmica de indivíduos adubados foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5x2, sendo o fator “A” os cinco tratamentos de adubação NPK e “B” os dois períodos de avaliação. Para tanto, um total de doze indivíduos foram utilizados para cada tratamento, formando quatro repetições de três plantas cada.

5.4.2 Estaquia de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas

Juntamente com as avaliações relacionadas à brotação epicórmica dos indivíduos adubados (150 dias – verão de 2020; e 350 dias – primavera de 2020), houve a coleta deste material e de brotações da copa destas mesmas plantas, a fim de testar e comparar sua estaquia. As brotações epicórmicas foram coletadas quando estas tinham tamanho maior ou igual de 5 cm, ou que apresentassem boa formação para produção de estacas. A coleta das brotações de copa e assim como os demais procedimentos foram os mesmos considerados nas metodologias comuns.

O material foi armazenado no ambiente de enraizamento I (estufim do Viveiro Florestal da UDESC), de fevereiro de 2020 a junho de 2020, com repetição sendo instalada de setembro de 2020 a fevereiro de 2021, em que as estacas foram postas para enraizar em bandejas (20 L) utilizando o substrato I (vermiculita 1:1 v/v). Após 120 dias de instalação, ambos os

experimentos foram avaliados. O substrato consistiu de uma mistura de casca de *Pinus* sp., cinzas, vermiculita, turfa, serragem e bioestabilizadores (aditivos: correção de acidez – 0,5%, fosfato natural – 0,5%, fertilizante mineral NPK – 0,6%; densidade: 310 kg m⁻³).

Os dois experimentos de estaquia foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em três esquemas fatoriais. O primeiro consistiu no fator “A” sendo os cinco tratamentos de adubação NPK e no fator “B” sendo os dois tipos de material (epicórmica e da copa). O segundo consistiu no fator “A” sendo os cinco tratamentos de adubação e no fator “C” sendo as estações do ano (verão – coleta aos 150 dias; primavera – 350 dias). E o terceiro consistiu no fator “B” sendo os tipos de material e no fator “C” as estações do ano. Devido à diferença na brotação epicórmica encontrada em alguns tratamentos, um valor mínimo aproximado de 50 estacas foi utilizado nestes casos, enquanto materiais com maior disponibilidade de material foram representadas por maior número de estacas dentro das repetições. Ao todo, foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Adubação para o resgate de brotações epicórmicas

Não houve interação significativa entre os tratamentos de adubação e as duas avaliações realizadas (ANEXO C). De mesma forma, os períodos de avaliação não foram significativos, ocorrendo significância somente para os tratamentos de adubação, apenas para o número e o comprimento de brotações. O número de brotações obteve valores considerados muito altos de AE% (> 90%), enquanto o comprimento de brotações obteve uma AE% alta (entre 70% e 90%).

A brotação dos indivíduos adubados não obteve variação significativa, não importando a quantidade de adubo aplicada ou da avaliação realizada. Aproximadamente 1/4 das plantas aneladas (29,1%) não apresentaram brotos abaixo do anelamento.

O número de brotações variou somente para a adubação, sendo semelhantes para os tratamentos de 0 g (4,0), 500 g (4,3) e 1.000 g (4,4). Enquanto 250 g (1,7) e 750 g (1,5) apresentaram quase três vezes menos brotos quando comparados aos demais.

Já para o comprimento de brotações, não houve diferença para os períodos de avaliação, em que somente os tratamentos de adubação com 0 g (14,0 cm) e 1.000 g (17,0 cm) apresentaram resultados mais significativos (Tabela 10). Os demais tratamentos de adubação apresentaram médias variando entre 9,2 cm e 10,6 cm.

Tabela 10 — Médias de brotação (%), número de brotações e comprimento de brotações (cm) da brotação epicórmica de *I. paraguariensis* adubadas com NPK e aneladas

Avaliação	Indivíduos com brotações epicórmicas (%) (CV% = 34,4)					
	Adubação NPK (5-20-10) (g)					
	0	250	500	750	1.000	Média
150 dias	75,0	58,3	75,0	58,3	91,7	71,7
350 dias	75,0	66,7	75,0	58,3	75,0	70,0
Média	75,0	62,5	75,0	58,3	83,4	70,9
Número de brotações (CV% = 42,3)						
150 dias	4,1	2,0	5,1	1,6	3,9	3,3
350 dias	3,9	1,3	3,4	1,4	4,8	3,0
Média	4,0 a*	1,7 b	4,3 a	1,5 b	4,4 a	3,2
Comprimento de brotações (cm) (CV% = 42,9)						
150 dias	15,0	12,6	10,9	7,5	18,5	12,9
350 dias	13,1	5,8	10,3	13,2	15,4	11,6
Média	14,0 a	9,2 b	10,6 b	10,4 b	17,0 a	12,3

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.5.2 Estaquia de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas

Houve interação significativa entre os tratamentos de adubação e o tipo de material utilizado para a sobrevivência, formação de calos, enraizamento e brotação, todos com valores considerados altos de AE% (entre 70% e 90%) (ANEXO D). Houve interação significativa entre os tratamentos de adubação e a estação do ano para todas as variáveis, com AE% muito alta (> 90%) para o enraizamento e a permanência das folhas originais e alta AE% para as demais. Houve interação significativa entre o tipo de material e estação do ano somente para a sobrevivência, formação de calos e permanência das folhas originais, todas com AE% considerada muito alta. Demais fatores não significativos para o esquema fatorial (número de raízes/adubação; enraizamento/material; número de raízes/material; novas brotações/estação) apresentaram valores considerados no mínimo altos de AE%.

Entre o material de origem e os tratamentos de adubação, as maiores médias pertenceram a 250 g (55,7%) e 0 g (51,9%) para o material de copa, ambas acima de 50,0%, e 750 g (50,0%) e 0 g (46,3%) para o material epicórmico (Tabelas 11 e 12). Entre as estações e a adubação, os tratamentos de 500 g (66,7%) e 0 g (60,4%) apresentaram os melhores resultados no verão, e 750 g (38,5%) e 250 g (33,3%) para a primavera. E para a relação entre o material e as estações avaliadas, os melhores resultados foram ocorreram no verão, independentemente do material utilizado (54,3%).

Tabela 11 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* para a relação entre a adubação com NPK, brotações de copa e epicórmicas em duas épocas de coleta

Sobrevivência (%) (CV% = 40,5)						
Material	Adubação NPK (5-20-10) (g)					
Estação	0	250	500	750	1.000	Média
Copa	51,9 aA*	55,7 aA	37,9 aA	41,2 aA	39,4 aA	45,2
	46,3 aA	21,9 bB	38,5 bA	50,0 aA	30,2 bB	37,4
	Média	49,1	38,8	38,2	45,6	34,8
Primavera	37,7 aB	33,3 aA	9,8 bB	38,5 aA	17,9 bB	27,7
	Verão	60,4 aA	44,3 bA	66,7 aA	52,7 bA	54,2
	Média	49,1	38,8	38,2	45,6	34,8
Calos (%) (CV% = 48,5)						
Copa	41,4 aA	41,5 aA	33,0 aA	31,5 aB	28,1 aA	35,1
	Epicórmica	40,0 aA	14,1 cB	31,2 aA	48,8 aA	32,9
	Média	40,7	27,8	32,1	40,1	34,0
Primavera	28,3 aB	16,5 bB	2,8 bB	33,3 aA	10,7 bB	18,5
	Verão	53,1 aA	39,1 aA	61,4 aA	46,9 aA	43,5 aA
	Média	40,7	27,8	32,1	40,1	34,0
Enraizamento (%) (CV% = 98,4)						
Copa	15,9 aA	4,7 aA	7,3 aA	3,0 aB	5,0 aA	8,1
	Epicórmica	20,0 aA	9,2 bA	13,5 bA	23,8 aA	9,4 bA
	Média	18,0	7,0	10,4	13,4	11,2
Primavera	11,1 aB	10,3 aA	2,1 bB	20,9 aA	0,0 bB	9,0
	Verão	24,8 aA	3,6 bA	18,7 aA	5,9 bB	14,4 bA
	Média	18,0	7,0	10,4	13,4	11,2
Número de raízes (CV% = 143,8)						
Copa	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2 b
	Epicórmica	1,1	0,2	0,6	1,2	0,2
	Média	0,7 A	0,3 B	0,4 B	0,7 A	0,1 B
Primavera	0,3 bB	0,4 bA	0,1 bB	1,1 aA	0,0 bA	0,4
	Verão	1,1 aA	0,1 bA	0,8 aA	0,2 bB	0,2 bA
	Média	0,7	0,3	0,4	0,7	0,1
Novas brotações (%) (CV% = 54,0)						
Copa	25,0 aA	37,8 aA	23,6 aA	25,2 aB	32,9 aA	28,9
	Epicórmica	40,0 aA	15,6 bB	27,1 bA	43,8 aA	20,8 bA
	Média	32,5	26,7	25,4	34,5	29,2
Primavera	16,9 aB	26,3 aA	9,0 aB	26,1 aB	11,9 aB	18,2
	Verão	48,1 aA	27,1 aA	41,7 aA	42,9 aA	38,5 aA
	Média	32,5	26,7	25,4	34,5	29,2
Folhas originais (%) (CV% = 73,7)						
Copa	20,1	29,2	26,4	19,4	11,3	21,3
	Epicórmica	28,8	15,6	26,0	37,5	18,8
	Média	24,4	22,4	26,2	28,4	23,3
Primavera	24,2 aA	14,1 bA	1,4 bB	35,4 aA	7,1 bA	16,7
	Verão	24,6 bA	30,8 bA	51,0 aA	21,4 bA	29,6
	Média	24,4	22,4	26,2	28,4	15,0

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

As porcentagens de formação de calos foram próximas as de sobrevivência, podendo chegar a 100% das estacas vivas. Entre a estação e a adubação, estas porcentagens foram mais homogêneas, sendo o tratamento com menor presença de calos o de 250 g (16,8%) durante a

primavera. Para o material e as estações, o material de copa (10,4%) apresentou a menor porcentagem de calos enquanto para a primavera o resultado foi semelhante para esta mesma origem (9,7%).

Tabela 12 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* para a relação entre brotações de copa e epicórmicas em duas épocas de coleta

Estação	Sobrevivência (%) (CV% = 40,5)			Estação	Calos (%) (CV% = 48,5)				
	Material				Estação	Material			
	Copa	Epicórmica	Média			Copa	Epicórmica	Média	
Prim.	36,1 aB*	18,8 bB	27,7	Prim,	26,4 aB	10,3 bB	18,5		
Verão	54,3 aA	54,2 aA	54,2	Verão	43,9 aA	53,3 aA	48,7		
Média	45,2	37,4	40,9	Média	35,1	32,9	33,5		
Enraizamento (%) (CV% = 98,4)				Número de raízes (CV% = 143,8)					
Prim.	8,0	10,3	9,1	Prim,	0,3	0,5	0,4		
Verão	8,2	17,9	13,2	Verão	0,1	0,8	0,5		
Média	8,1 b	14,3 a	11,2	Média	0,2 b	0,7 a	0,4		
Novas brotações (%) (CV% = 54,0)				Folhas originais (%) (CV% = 73,7)					
Prim.	18,7	17,6	18,2 b	Prim,	19,4 aA	13,9 aB	16,7		
Verão	39,1	40,2	39,7 a	Verão	23,1 bA	35,8 aA	29,6		
Média	28,9	29,4	29,2	Média	21,3	25,3	23,3		

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para o tipo de material utilizado e os tratamentos de adubação, o enraizamento foi superior para o material epicórmico, com porcentagens aproximadamente duas vezes maiores do que para o material de copa, com destaque para 750 g (23,8%) e 250 g (9,2%). Já para a estação e a adubação, não houve uma padronização dos resultados para nenhum dos fatores, destacando 750 g (20,9%) para material da primavera e, 0 g (24,8%) e 500 g (18,7%) para material do verão. Para o material e a estação, independentemente da primavera ou verão, o enraizamento foi superior com material epicórmico (14,3%).

Por consequência dos resultados de enraizamento, o número médio de raízes variou de forma proporcional para esta em todas as relações fatoriais. Independentemente do tratamento de adubação, levando consideração somente o material de origem e as estações do ano avaliadas, o material epicórmico apresentou o maior número (0,7).

Para a presença de novas brotações nas estacas, também houve uma variação sem a determinação de um padrão para o tipo de material e a adubação, com maior média para 750 g (43,8%). Entretanto, considerando as estações e a adubação, as estacas produzidas no verão apresentaram aproximadamente o dobro da porcentagem de brotações (39,6%) em relação a primavera (18,2%), com destaque de maior média obtida para 0 g (48,1%).

Para a permanência das folhas originais, não houve significância entre os fatores e nem separadamente para o tipo de material e a adubação. Entre a estação do ano e a adubação, o verão apresentou as maiores médias (29,6%), principalmente para 750 g (51,0%). Isto também foi observado para a relação entre o material de origem e a estação do ano, com maior média presente para o material epicórmico de verão (35,8%).

5.6 DISCUSSÃO

5.6.1 Adubação para o resgate de brotações epicórmicas

Não foram encontradas plantas mortas em reação ao anelamento neste experimento durante as duas avaliações e mesmo após estes períodos. O anelamento completo do caule de indivíduos de *I. paraguariensis* dificilmente ocasiona na sua morte (SANTIN *et al.*, 2008b; WENDLING *et al.*, 2013).

A brotação epicórmica promovida pela técnica de anelamento completo em indivíduos de *I. paraguariensis* e suas variáveis de número e comprimento ocorreu efetivamente em ambas as avaliações, independentemente dos tratamentos de adubação. Isto indica uma elevada capacidade desta técnica de revigoramento nesta espécie, podendo ser comparada com trabalhos anteriormente realizados (SANTIN *et al.*, 2008b; STUEPP *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2018; 2019a).

Em trabalho similar com mesma técnica de resgate e espécie, Stuepp *et al.* (2016) observaram que aos 180 dias e 360 dias, cerca de 90% das plantas aneladas apresentavam brotações epicórmicas, entre 6 e 8 brotos de comprimentos podendo ser superiores a 50 cm. Os resultados de brotação do trabalho citado foram semelhantes aos obtidos no presente estudo, em que ao menos 60% das plantas aneladas apresentaram brotações, com a média se mantendo em aproximadamente 75%. Todavia, o número e o comprimento de brotações foram inferiores ao do trabalho citado em ao menos duas brotações e mais do que 30 cm, podendo tais diferenças estarem atreladas à fatores de origem, época de aplicação do tratamento de resgate, condições ambientais durante o desenvolvimento das brotações, entre outros.

Em um outro trabalho com condições semelhantes, Santin *et al.* (2008b) demonstram que a associação entre anelamento e remoção da parte aérea é capaz de promover a brotação dos indivíduos em até 30% a mais. Isto pode ter parcialmente favorecido os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que, por se tratar de uma área com coleta de material vegetal recorrente, os indivíduos se apresentavam com copa reduzida. Os autores do trabalho citado

determinaram que o número de brotações epicórmicas produzidas a partir do anelamento completo foi praticamente o dobro dos não podados, sendo próximos a 4, com comprimentos variando entre 10 cm e mais do que 20 cm, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Avaliando a brotação epicórmica de *I. paraguariensis* em uma população sob condições climáticas peculiares (Urupema, SC), Nascimento *et al.* (2018) observaram uma menor taxa de brotação epicórmica promovida pelo anelamento do caule, cerca de 50%. Ainda, o número de brotações e o seu comprimento apresentado pelos autores do trabalho citado foram próximos a 1 broto de média e 1 cm, muito menores às médias obtidas para mesmas variáveis no presente estudo. Isto demonstra que o fator de origem é essencial para o sucesso do resgate vegetativo, podendo ser lento em regiões com temperaturas e incidência solar menores (NASCIMENTO *et al.*, 2018), tal como o município de Urupema (UR) (MARTINS-RAMOS *et al.*, 2011).

Entretanto, mesmo em um ambiente com condições climáticas desfavoráveis, a brotação epicórmica de indivíduos anelados desta espécie pode ser favorecida pela adubação nitrogenada e NPK (NASCIMENTO *et al.*, 2019a). Neste aspecto, os autores do trabalho citado observaram que a brotação pode chegar a um mínimo próximo de 50% máximo de 80%, com mais do que 4 brotações de média e aproximadamente 10 cm de comprimento. Estes são semelhantes aos obtidos no presente estudo, mas sendo ainda inferiores para o comprimento médio, com cerca de 4 cm a menos. Entretanto, é importante destacar que, mesmo com bons resultados sendo apresentados pelos tratamentos de adubação, estes não diferiram significativamente do 0 g, o que demonstra o seu não efeito. Assim, é necessária uma diferente interpretação dos resultados entre o trabalho citado (NASCIMENTO *et al.*, 2019a), realizado no município de UR, e o presente estudo, no município de Três Barras (TB), sob condições ambientais contrastantes.

No presente trabalho, e através da análise química do solo (Tabela 8), se observa uma elevada acidez ($\text{pH} = 4,2$), uma baixa matéria orgânica (3,4%) e baixas concentrações de cálcio (Ca) e magnésio (Mg), o que ajuda a justificar a possível não absorção dos adubos utilizados. As baixas quantidades de Ca e Mg podem ser explicadas pela ausência de serapilheira no ambiente estudado, tratando-se de uma população com características mais comerciais e solo coberto por gramíneas. Todavia, Nascimento *et al.* (2019a) apresentam que a qualidade química do solo de seu trabalho detinha um baixo pH (4,3), uma elevada matéria orgânica (11,6%), mas também baixas quantidades de Ca e Mg, embora com serapilheira presente. Assim, é possível que a melhor resposta da brotação epicórmica do trabalho citado em relação ao presente estudo seja em função do ambiente de origem, o qual possivelmente permitiu a presença dos nutrientes

por maior tempo, visto as menores temperaturas, e a elevada matéria orgânica, possibilitando que as plantas os acessassem mais facilmente, principalmente o nitrogênio (N).

Quanto ao número de brotações e a adubação com 250 g e 750 g do presente estudo, as características das plantas mãe escolhidas e o desenvolvimento de plantas espontâneas no seu entorno possivelmente foram os fatores responsáveis pelos resultados inferiores aos demais. É possível que alguns dos indivíduos selecionados para estes tratamentos apresentassem alguma condição fisiológica não interessante, não sendo observado visualmente ao serem selecionadas, além das próprias características genéticas. Embora a seleção criteriosa sob características visualmente semelhantes para a aplicação de experimentos como este, em *I. paraguariensis* as respostas podem ser muito diferentes entre plantas, uma vez que não estão sendo testados clones (WENDLING e BRONDANI, 2015).

Entretanto, o provável motivo se deve ao elevado número de plantas espontâneas encontradas durante ambas as avaliações, presentes onde houve a limpeza e aplicação dos tratamentos de adubação. A presença destas plantas, e quase em sua totalidade com altura superior à do anelamento, promoveu um sombreamento na região da injúria, o que pode ter afetado o desenvolvimento das gemas dormentes, uma vez que a luz é um dos principais fatores para sua ativação (TAIZ e ZEIGER, 2009; HARTMANN *et al.*, 2011).

A relação entre o anelamento do caule das plantas mãe de *I. paraguariensis* associado à adubação nitrogenada demonstra ser uma técnica de grande potencial para o resgate de material de maior vigor nesta espécie (NASCIMENTO *et al.*, 2019a), visto a relação entre a maior produção de citocininas (KIBA *et al.*, 2011) e o seu acúmulo logo abaixo da região injuriada (SANTIN *et al.*, 2008b; HARTMANN et a., 2011; STUEPP *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2018). Mas também é necessário levar em consideração a qualidade química do solo em que serão aplicadas tais técnicas, podendo comprometer os trabalhos de resgate, mesmo embora resultados positivos de brotação epicórmica ainda sejam obtidos.

5.6.2 Estaquia de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas

A sobrevivência das estacas foi mais evidentemente afetada pela estação do ano, mas também de forma relevante para a origem do material vegetal. Sá *et al.* (2018), trabalhando com miniestacas de *I. paraguariensis*, observaram que sua sobrevivência é afetada pela estação do ano em que houve sua coleta, com a primavera apresentando a menor taxa de mortalidade, mais do que 40% a menos em relação ao verão. Sobre este mesmo aspecto, Pimentel *et al.* (2019) determinaram que a sobrevivência de miniestacas desta espécie coletadas no verão foi

incapaz de atingir 40%, enquanto que as obtidas na primavera apresentam uma porcentagem ao menos 20% maior. Estes dados não corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, em que o inverso entre as estações foi obtido para a sobrevivência, sendo uma das explicações podendo ser o tipo de material sendo utilizado. Miniestacas podem apresentar maior vigor vegetativo em razão do manejo de suas minicepas, além de estarem presentes em ambientes com condições controladas. Todavia, o material obtido no meio nativo ou de plantios para a estaquia pode possuir condições diferenciadas, em que a utilização de suas reservas energéticas para o seu desenvolvimento vegetativo ocorra mais lentamente, independentemente da origem da origem do material na planta mãe, epicórmico ou não.

Foi constatado no presente trabalho que a sobrevivência do material de copa foi quase o dobro do epicórmico para a primavera, mas estatisticamente igual para o verão, enquanto o enraizamento foi superior para o material epicórmico, independentemente da época de coleta. Nascimento *et al.* (2018) observaram que a sobrevivência de estacas foi apenas 6% menor em relação ao material da copa quando estas brotações foram coletadas na primavera, atingindo mais do que 50%. Semelhantemente ao presente estudo, os autores do trabalho citado também observaram uma menor porcentagem de calos para as brotações epicórmicas, com enraizamento aproximadamente 10% superior ao de copa. Todavia, no presente estudo, o material epicórmico obtido no verão apresentou uma taxa de calos muito próxima a de sobrevivência, dificultando a interpretação destes resultados.

Ao se testar a estaquia a partir de brotações epicórmicas de decepa de *I. paraguariensis*, Bitencourt *et al.* (2009) observaram que estas apresentaram sobrevivência abaixo de 20%, mas com cerca de 65% de enraizamento, enquanto estacas de brotações de copa apresentam maior sobrevivência, mas sendo incapazes de enraizar eficientemente. Ainda, Stuepp *et al.* (2017a; 2017b) confirmam que os indivíduos fisiologicamente e ontogeneticamente mais jovens podem apresentar menores taxas de calos e maiores de enraizamento, em mais do que 90% das estacas vivas, enquanto o material de copa sobrevive mais, mas com menor enraizamento. Tal fato é semelhante para o presente estudo ao se considerar a primavera, mas não ocorrendo o mesmo durante o verão, especialmente para a sobrevivência.

Nascimento *et al.* (2019a) afirmam que quando as plantas mãe são fertilizadas e suas brotações epicórmicas são obtidas no outono, a sobrevivência deste material pode variar de 30% a cerca de 80%, mas quando obtidas no verão esta variação é menor, entre 75% e 90%. Os autores do trabalho citado ainda afirmam que, embora o próprio material epicórmico ainda apresente calos, estes ainda podem enraizar de maneira eficiente, variando entre 45% e mais do que 80% dependendo da dosagem de NPK aplicada e época avaliada. Todavia, assim como no

experimento de resgate, os possíveis efeitos dos adubos utilizados no presente estudo podem ser difíceis de serem explicados na estaquia, não cabendo afirmar quaisquer superioridades.

A nutrição das plantas mãe aparenta ser essencial para que ocorra uma boa propagação vegetativa, considerar o desenvolvimento de raízes adventícias em quantidade e comprimento (CUNHA *et al.*, 2009). Para a formação deste tecido, é essencial que o elemento N esteja presente em quantidades suficientes para uma eficiente produção hormonal (KIBA *et al.*, 2011), muito embora os níveis de auxinas não tendem a se alterar significativamente quando na sua presença em comparação com as citocininas (KOJIMA *et al.*, 2009), podendo a formação de raízes ser mais dependente do desbalanço hormonal causado pelo seccionamento do material vegetal. Embora uma relação positiva tenha sido constatada entre a adubação nitrogenada e o enraizamento desta espécie a partir de estacas revigoradas em um trabalho (NASCIMENTO *et al.*, 2019a), o mesmo não ocorreu no presente estudo, sendo necessário levar em consideração novos aspectos, como a resposta dos tratamentos em relação a qualidade química do solo.

5.7 CONCLUSÃO

Não foi detectado efeito da adubação NPK (5-20-10) neste experimento, possivelmente ocasionado pela qualidade química preexistente do solo do local de estudo, que pode ter afetado negativamente a resposta dos tratamentos.

Assim como no resgate, o enraizamento de estacas desta espécie não apresentou um efeito comprehensível a partir dos tratamentos de adubação, mas a estação do verão e o material epicórmico apresentaram ser fatores importantes para sua propagação vegetativa.

6 CAPÍTULO III – INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS E AMBIENTES NA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Ilex paraguariensis* POR ESTAQUIA

6.1 RESUMO

O objetivo deste capítulo foi avaliar o enraizamento de estacas brotações da copa de *I. paraguariensis* coletadas de duas populações em quatro estações do ano e mantidas em dois ambientes de enraizamento. Para tanto, sete genótipos das populações de Três Barras (TB) e Urupema (UR) foram coletados em cada estação, com início na primavera de 2020, sendo as estacas alocadas em estufim com irrigação por microaspersão e em casa de vegetação com controle de temperatura e irrigação por nebulização. Após 90 dias de cada coleta foram avaliados: sobrevivência (%), calos (%), enraizamento (%), número de raízes, novas brotações (%) e permanência das folhas originais (%). A sobrevivência variou em todos os tratamentos, com máximos de até 52,7% para o outono, 45,5% para TB e 47,1% para o estufim, variando entre 2,1% a até 97,9% para os genótipos. A porcentagem de calos foi, de forma geral, similar à de sobrevivência, desde diferenças nulas a até aproximadamente 30% para determinados genótipos. O enraizamento chegou a 27,8% para o material do verão mantido no estufim, chegando a quase 65% para alguns genótipos de TB. O número de raízes variou entre 2,8 e 4,1 para os genótipos de melhor enraizamento. As novas brotações das estacas e a permanência de suas folhas originais não seguiram um padrão, podendo estar mais associadas à genética do que os outros fatores. Os resultados demonstram existem variações de acordo com as estações do ano e os ambientes de enraizamento, mas estes aparentam apenas potencializar a capacidade de cada população e genótipo para a propagação vegetativa.

Palavras-chave: Propagação vegetativa; Brotações de copa; Genótipos; Erva-mate.

6.2 ABSTRACT

The objective of this chapter was to evaluate the rooting of canopy sprouts of *I. paraguariensis* collected from two populations in four seasons of the year and maintained in two rooting environments. Thus, seven genotypes from the populations of Três Barras (TB) and Urupema (UR) were collected in each season, starting in spring 2020, with the cuttings being allocated in a mini tunnel with micro-sprinkler irrigation and in a greenhouse with temperature control and irrigation by nebulization. After 90 days of each collection, the following were evaluated:

survival (%), callus (%), rooting (%), number of roots, new sprouts (%) and permanence of the original leaves (%). Survival varied in all treatments, with maximums of up to 52.7% for autumn, 45.5% for TB and 47.1% for the mini tunnel, ranging from 2.1% to up to 97.9% for the genotypes. The percentage of callus was, in general, similar to that of survival, from zero differences to approximately 30% for certain genotypes. Rooting reached 27.8% for the summer material kept in the mini tunnel, reaching almost 65% for some TB genotypes. The number of roots varied between 2.8 and 4.1 for the genotypes with better rooting. The new sprouts of the cuttings and the permanence of their original leaves did not follow a pattern, and may be more associated to their genetics than other factors. The results show that there are variations according to the seasons and rooting environments, but these only seem to enhance the capacity of each population and genotype for vegetative propagation.

Keywords: Vegetative propagation; Canopy sprouts; Genotypes; Yerba-mate.

6.3 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire (Aquifoliaceae) é uma espécie florestal presente na América do Sul de grande importância para a região Sul brasileira, visto sua vasta produção, exportação e consumo interno. Todavia, a produção total da matéria-prima proveniente desta espécie tem passado por flutuações na última década, aproximadamente 5,5% menos em relação aos últimos dois anos (2019/2020). Ainda, seu valor total diminuiu em quase 17,0% para este mesmo período (IBGE, 2021). Além das variáveis econômicas, diversos fatores poderiam ter contribuído para esta diminuição, tais como exploração excessiva, um elevado grau de maturação fisiológica, a exaustão das reservas energéticas e a heterogeneidade genética entre indivíduos e populações (XAVIER *et al.*, 2013; WENDLING e BRONDANI, 2015).

Uma solução lógica para estas dificuldades reside no estabelecimento de novas plantas com características superiores, objetivando não apenas manter a produtividade, mas também aumentá-la. Para tanto, a seleção correta de indivíduos é extremamente importante, sendo uma atividade que pode ser demasiadamente difícil devido a duas situações principais: o uso de sementes para produção de mudas e a variação genética presente nelas. Primeiramente, as sementes de *I. paraguariensis* são conhecidas por apresentar dificuldades na germinação, especialmente em razão da presença de dormências, sendo a mais problemática a morfológica, e sementes vazias (GALÍNDEZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020), forçando ao uso de material de qualidade genética desconhecida. Ainda, a própria variabilidade genética, causada pela

reprodução sexuada, a qual é benéfica para as etapas de seleção natural, podem complicar o desenvolvimento de programas de melhoramento vegetal desta espécie com foco na produção de padrões produtivos (WENDLING e BRONDANI, 2015). A possível solução para a produção de mudas de alta qualidade está na sua propagação vegetativa através da seleção de materiais superiores (VIEIRA *et al.*, 2021).

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos com foco no melhoramento vegetal de *I. paraguariensis*, em que a maior parte utilizando a propagação vegetativa como técnica principal para este objetivo. Entretanto, ainda restam determinados desafios, principalmente em superar a interferência da maturidade, a elevada idade ontogenética (WENDLING *et al.*, 2013; STUEPP *et al.*, 2015; 2017a, 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018), tal como a nível nutricional da planta mãe (NASCIMENTO *et al.*, 2019a), o uso de hormônios sintéticos (BITENCOURT *et al.*, 2009; NAGAOKA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2020), o uso de clones melhor estabelecidos (BRONDANI *et al.*, 2008; 2009; PIMENTEL *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2021) e ambientes de enraizamento (BRONDANI *et al.*, 2008; 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Neste sentido, é importante levar em consideração que diferentes populações naturais desta espécie podem possuir características propagativas contrastantes, em que um elevado nível de maturação pode vir a não ser um fator determinante. Desta forma, o resgate vegetativo de determinados genótipos em ambientes nativos passa a ser uma etapa importante para o sucesso da propagação vegetativa.

Indivíduos com características distintas podem ser encontrados nas populações naturais de *I. paraguariensis* (WENDLING e BRONDANI, 2015; VIEIRA *et al.*, 2021), os quais passaram pelos processos de seleção natural, sendo sucessivamente selecionados. Estas diferenças não estão presentes apenas entre populações, mas também em nível de indivíduo dentro de uma mesma população, em que os genótipos apresentam capacidade diferentes de enraizamento de seus propágulos (XAVIER *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Igualmente importante, estes indivíduos de *I. paraguariensis* podem apresentar diferentes respostas de acordo com o ambiente de enraizamento, considerando estruturas sob capacidades tecnológicas divergentes (BRONDANI *et al.*, 2008, 2009), podendo facilitar ou dificultar a sua propagação vegetativa (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Ainda, a própria época de coleta do material vegetal afeta diretamente a sua capacidade de enraizamento, em que o retorno do aumento das temperaturas propicia uma maior divisão e diferenciação celular (HARTMANN *et al.*, 2011; STUEPP *et al.*, 2017a), mas podem não garantir uma maior sobrevivência do propágulo desta mesma espécie (PIMENTEL *et al.*, 2017, 2019).

O sucesso da propagação vegetativa da erva-mate pode ser diretamente dependente da origem do material, tal como de genótipos de uma mesma população, o ambiente de enraizamento e da época de seu resgate. Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar o enraizamento de *I. paraguariensis*, testando a interação entre genótipos de duas populações por ambientes e em quatro épocas de coleta.

6.4 MATERIAIS E MÉTODOS

6.4.1 Estaquia de duas populações de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

Dentre as cinco populações anteriormente estudadas, este experimento foi conduzido somente com as populações de Três Barras (TB) e Urupema (UR). A seleção destas populações se deve aos melhores resultados obtidos no primeiro capítulo deste trabalho e por pertencerem a regiões sob condições ambientais singulares, o que permite assumir que as populações estudadas sejam divergentes.

A seleção de indivíduos e demais processos ocorreram sob mesmos critérios das metodologias comuns, coletando-se material de copa para cada estação do ano. Desta forma, a primeira coleta foi realizada em setembro de 2020 (primavera), com a seguinte ocorrendo 90 dias após (verão), e assim sucessivamente até completar o ciclo de estações (outono/inverno). Para cada uma destas, foram coletadas brotações de sete indivíduos aleatórios, compondo diferentes genótipos por população em cada estação. Entretanto, é possível que entre estações tenha ocorrido a coleta de indivíduos não minimamente distantes entre si (50 m), principalmente para a população de UR, visto que o local de estudo é relativamente menor e formado por adensamentos. Não foram coletados os mesmos indivíduos entre as estações (Tabela 13), e estas sempre ocorreram com um dia de diferença entre si entre as duas populações.

O material foi armazenado nos ambientes de enraizamento I (estufim do Viveiro Florestal da UDESC) e II (CNVI – casa de vegetação com nebulização intermitente de uma empresa florestal da região, situada em Otacílio Costa, SC), permanecendo por 90 dias logo após sua coleta em cada um destes, seguido de avaliação final. As estacas foram postas para enraizar em tubetes (110 cm^3) utilizando o substrato II. O substrato era composto de uma mistura de turfa, vermiculita, resíduo orgânico classe “A” e calcário (densidade: 130 kg m^{-3}).

Tabela 13 — Diâmetro na altura do peito (DAP) dos indivíduos de *I. paraguariensis* de acordo com duas populações (TB e UR) nas quatro estações do ano, utilizadas para a obtenção de brotações de copa para a estaqueia

Ind.	Primavera		Verão		Outono		Inverno	
	TB	UR	TB	UR	TB	UR	TB	UR
	cm							
1	8,6	9,5	11,9	5,9	6,8	5,2	10,2	7,4
2	6,9	6,7	9,5	6,2	4,8	7,6	8,5	9,2
3	10,1	6,2	6,3	7,5	12,5	6,7	6,8	6,8
4	8,5	5,9	7,3	7,4	6,9	5,8	8,7	5,8
5	6,1	9,8	9,2	8,6	9,4	10,2	5,1	5,7
6	7,2	8,2	5,3	4,8	6,5	7,3	9,5	8,3
7	12,5	4,6	6,8	6,5	11,1	4,5	6,9	9,0
Média	8,6	7,3	8,0	6,7	8,3	6,8	7,9	7,5

Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O experimento de estaqueia, considerando as populações foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial. A primeira análise fatorial consistiu no fator “A” sendo as estações (primavera, verão, outono e inverno) e no fator “B” sendo as duas populações (TB e UR). A segunda consistiu no fator “A” sendo as estações e no fator “C” sendo os dois ambientes de enraizamento (estufim e CVNI). A terceira consistiu no fator “B” sendo as duas populações e no fator “C” os dois ambientes de enraizamento. Cada população consistiu em 14 repetições de 12 estacas para cada uma das estações e ambientes de enraizamento.

6.4.2 Estaqueia de genótipos da população de Três Barras e Urupema de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

A avaliação em função das estações foi realizada de forma separada para os sete genótipos coletados, visto que não foram utilizados os mesmos materiais entre as avaliações. Isto se deve a disponibilidade de material vegetal, em que era possível não haver material vegetal suficiente de uma estação para outra, impossibilitando a coleta de um único indivíduo. Embora não tenham sido testados mesmos genótipos entre estações, uma maior quantidade de indivíduos foi testada (56). Desta forma, não houve avaliação entre as estações do ano, ocorrendo somente entre sete genótipos e os dois ambientes de enraizamento para cada uma das estações.

Os experimentos de estaqueia dos genótipos de TB e UR foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 7x2, sendo o fator “A” os sete genótipos e o fator “B” os dois ambientes de enraizamento, sendo avaliados separadamente

para cada população. Este experimento foi composto de quatro repetições de 12 estacas para cada genótipo.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Estaquia de duas populações de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

Houve interação significativa para todas as variáveis analisadas entre os fatores de estação do ano e população, e entre estações e ambientes de enraizamento, todas com AE% considerada muito alta (> 90%) (ANEXO E). Entretanto, a sobrevivência, enraizamento, novas brotações e permanência das folhas originais não foram significativas para a relação entre população e ambientes de enraizamento, sendo avaliados separadamente, todos com AE% considerada muito alta.

Considerando a relação entre as estações do ano e as populações, a sobrevivência variou em aproximadamente 50%. A população de Três Barras (TB) apresentou média superior durante a primavera, verão e outono em relação a Urupema (UR), mas não diferenciado estatisticamente desta durante o inverno. Entre estações, o outono apresentou maior média (52,7%), especialmente para TB (75,7%), enquanto UR obteve sua maior média durante o verão (34,8%), mas não atingindo 40%. A casa de vegetação com nebulização intermitente (CNVI) apresentou uma média geral (24,0%) de quase metade da do estufim (47,1%). Isto é mais evidente principalmente no verão, em que o estufim manteve o maior número de propágulos vivos (65,9%), uma diferença maior do que 40%.

A porcentagem de formação de calos seguiu proporcionalmente a sobrevivência, não importando a estação, população ou ambiente de enraizamento (Tabelas 14 e 15). Para as estações e populações, as diferenças entre sobrevivência e calos não ultrapassaram 10%, com exceção de TB no outono (61,6%), com uma diferença maior do que 14%. A maior diferença entre todas foi apresentada para estacas de outono mantidas no estufim, de aproximadamente 16%.

Tabela 14 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* para a relação entre a estação do ano e duas populações em os ambientes de enraizamento

Sobrevivência (%) (CV% = 50,5)					
População	Estação				
Ambiente	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Média
TB	34,5 cA*	54,5 bA	75,7 aA	17,4 dA	45,5
UR	18,7 bB	34,8 aB	29,6 aB	19,3 bA	25,6
Média	26,6	44,6	52,7	18,4	35,6
Estufim	27,8 bA	65,9 aA	64,7 aA	30,1 bA	47,1
CNVI	25,4 bA	23,4 bB	40,6 aB	6,7 cB	24,0
Média	26,6	44,6	52,7	18,4	35,6
Calos (%) (CV% = 60,2)					
TB	28,7 cA	46,0 bA	61,6 aA	10,0 dA	36,6
UR	15,5 bB	28,4 aB	24,6 aB	11,2 bA	19,9
Média	22,1	37,2	43,1	10,6	28,2
Estufim	24,0 cA	55,9 aA	48,8 bA	17,1 dA	36,5
CNVI	20,2 bA	18,5 bB	37,4 aB	4,0 cB	20,0
Média	22,1	37,2	43,1	10,6	28,2
Enraizamento (%) (CV% = 138,2)					
TB	14,7 bA	20,8 aA	8,3 cA	0,0 dA	11,1
UR	2,8 bB	11,6 aB	1,3 bB	0,0 bA	3,9
Média	8,9	16,2	4,8	0,0	7,5
Estufim	5,5 bB	27,8 aA	0,1 cB	0,0 cA	8,4
CNVI	12,1 aA	4,6 bB	9,5 aA	0,0 cA	6,6
Média	8,9	16,2	4,8	0,0	7,5
Número de raízes (CV% = 192,9)					
TB	0,9 aA	1,0 aA	0,4 bA	NR cA	0,6
UR	0,1 bB	0,5 aB	< 0,1 bB	NR bA	0,2
Média	0,5	0,8	0,2	NR	0,4
Estufim	0,2 bB	1,3 aA	< 0,1 bB	NR bA	0,4
CNVI	0,8 aA	0,2 bB	0,4 bA	NR cA	0,4
Média	0,5	0,8	0,2	NR	0,4
Brotação (%) (CV% = 100,1)					
TB	18,6 bA	29,5 aA	7,7 cA	9,2 cA	16,3
UR	12,6 aB	7,4 bB	1,2 cB	10,0 aA	7,8
Média	15,6	18,5	4,5	9,6	12,0
Estufim	15,8 bA	26,9 aA	3,7 cA	15,0 bA	15,4
CNVI	15,5 aA	10,0 bB	5,2 cA	4,2 cB	8,7
Média	15,6	18,5	4,5	9,6	12,0
Folhas originais (%) (CV% = 68,4)					
TB	19,2 cA	38,2 bA	67,3 aA	6,1 dA	32,7
UR	8,6 cB	30,7 aB	20,8 bB	6,0 cA	16,5
Média	13,9	34,4	44,0	6,0	24,6
Estufim	16,5 bA	53,3 aA	55,1 aA	10,3 bA	33,8
CNVI	11,3 bA	15,6 bA	33,0 aB	1,8 cB	15,4
Média	13,9	34,4	44,0	6,0	24,6

Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; NR: Ausência de estacas enraizadas; *Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O enraizamento apresentou porcentagens menores do que 30% (Figura 9), mostrando-se estar ligado mais associado às estações do ano. Para as estações e populações, a maior porcentagem de enraizamento ocorreu no verão para ambas as populações, mas em que TB

obteve quase o dobro de estacas enraizadas (20,8%) em relação a UR (11,6%). Já para a estação e os ambientes de enraizamento, estacas produzidas no verão e mantidas no estufim apresentaram quase 30% de enraizamento, ao menos cinco vezes mais do que no CNVI (4,6%). Porém, o estufim foi inferior no enraizamento durante a primavera (5,5%), mas principalmente no outono (0,1%), quando comparado com os resultados obtidos no CNVI (9,5%). Assim como a relação anterior, estacas não enraizaram durante o inverno, independentemente do ambiente de enraizamento.

Tabela 15 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* para a relação entre duas populações em dois ambientes de enraizamento

Sobrevivência (%) (CV% = 50,5)			Calos (%) (CV% = 60,2)				
População	Ambiente de enraizamento		População	Ambiente de enraizamento			
	Estufim	CVNI		Estufim	CVNI		
TB	55,6	35,5	45,5 a	TB	42,3 aA*	30,8 bA	36,6
UR	38,7	12,6	25,6 b	UR	30,6 aB	9,2 bB	19,9
Média	47,1 a	24,0 b	35,6	Média	36,5	20,0	28,2
Enraizamento (%) (CV% = 138,2)			Número de raízes (CV% = 192,9)				
TB	11,2	10,9	11,0 a	TB	0,5 aA	0,6 aA	0,6
UR	5,7	2,2	3,9 b	UR	0,3 aB	< 0,1 bB	0,2
Média	8,4	6,6	7,5	Média	0,4	0,4	0,4
Brotação (%) (CV% = 100,1)			Folhas originais (CV% = 68,4)				
TB	19,4	13,1	16,3 a	TB	41,4	24	32,7 a
UR	11,3	4,3	7,8 b	UR	26,1	6,9	16,5 b
Média	15,4 a	8,7 b	12,0	Média	33,8 a	15,4 b	24,6

Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O número de raízes foi proporcional ao enraizamento, sendo que os maiores valores foram obtidos durante o verão e primavera. Para a relação entre as estações e populações, TB apresentou a maior média durante o verão (1,0), estatisticamente igual para a primavera (0,9), enquanto UR também apresentou sua maior média para o verão (0,5). Para os ambientes, o estufim também apresentou maior média durante o verão (1,3), aproximadamente 50% a mais para o melhor resultado obtido para CNVI. Os demais resultados não ultrapassaram 0,5 raízes em todos os tratamentos.

Para as estações e as populações, TB apresentou a maior porcentagem de brotação de estacas no verão (29,5%). Resultados mais baixos foram presentes no outono para ambas as populações, mais evidentemente para UR (1,2%). Entre as estações e os ambientes, o estufim apresentou uma média geral (15,4%) quase duas vezes maior em relação ao CNVI (8,7%). A

maior porcentagem de brotação entre os fatores ocorreu durante o verão para o material mantido no estufim (26,9).

Para as populações, TB apresentou a maior porcentagem de permanência de folhas originais durante o outono (67,3%), sendo ao menos o dobro da maior para UR, a qual ocorreu no verão (30,7%). Entre as estações e os ambientes de enraizamento, o estufim proporcionou as maiores médias (33,8%), destacando o outono (55,1%) e o verão (53,3%). Considerando ambientes e populações, ambos apresentaram porcentagens ao menos duas vezes maiores em relação aos inferiores, sendo os resultados do estufim (33,8%) maiores do que o CVNI (15,4%), de mesma forma que TB (32,7%) apresentou maior permanência do que UR (15,4%).

6.5.2 Estaquia de genótipos da população de Três Barras de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

Para os genótipos de TB e as estações do ano, houve significância para a interação entre os fatores para quase todas as variáveis em todas as épocas (ANEXO F), com exceção da formação de calos durante a primavera, o enraizamento e número de raízes na estação de inverno. A AE% de todas as significâncias foi considerada entre alta (entre 70% e 90%) e muito alta (> 90%).

De maneira geral, a sobrevivência das estacas foi superior para o material do outono, chegando a quase 85% no estufim. Em contrapartida, o inverno não atingiu 30% para o estufim (29,2%) e pouco acima de 5% para a CVNI (5,6%). Os destaques para esta variável foram obtidos para os genótipos OTB5 (97,9%), OTB2 (95,9%), VTB3 (95,8%) e OTB7 (91,7%), com mais do que 90% de suas estacas vivas.

As porcentagens de calos variaram entre cerca de 1% e mais de 20% em relação a sobrevivência. O CVNI apresentou as menores diferenças, se mantendo abaixo de 10%. As maiores diferenças foram obtidas no outono para OTB5 (47,9%) e OTB2 (33,4%) mantidos no estufim, com mais do que 30% de suas estacas vivas sem apresentar calos.

De forma geral, o enraizamento foi maior para as estacas durante o verão (20,8%) e na primavera (14,7%), mas mais eficiente no estufim durante o verão (35,7%) e no CVNI durante a primavera (20,8%) (Tabelas 16 e 17). O enraizamento durante o outono foi presente somente no CVNI (8,3%), enquanto o inverno não apresentou estacas enraizadas. As porcentagens de enraizamento maiores ou iguais a 50% ocorreram somente para os genótipos VTB7 (64,6%), OTB4 (52,1%) e VTB6 (50,0%).

Tabela 16 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* da população de Três Barras (TB) obtidas na primavera e verão para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento

Primavera								Verão								
Sobrevivência (%) (CV% = 10,2)								Sobrevivência (%) (CV% = 7,7)								
Amb.	Genótipo							Amb.	Genótipo							
	PTB1	PTB2	PTB3	PTB4	PTB5	PTB6	PTB7		VTB1	VTB2	VTB3	VTB4	VTB5	VTB6	VTB7	Média
Estufim	25,0 cB*	29,2 cB	47,9 bA	25,0 cB	25,0 cA	66,7 aA	12,5 dA	33,0	41,7 eA	58,3 dA	95,8 aA	85,4 bA	79,2 cA	87,5 bA	81,2 cA	75,6
CVNI	31,2 cA	35,4 cA	43,8 bA	43,8 bA	18,8 dB	66,7 aA	12,5 eA	36,0	10,4 dB	10,4 dB	35,4 cB	33,3 cB	47,9 bB	66,7 aB	29,2 cB	33,3
Média	28,1	32,3	45,9	34,4	21,9	66,7	12,5	34,5	26,1	34,4	65,6	59,4	63,5	77,1	55,2	54,5
Calos (%) (CV% = 28,5)								Calos (%) (CV% = 16,8)								
Estufim	22,9	29,2	33,3	25,0	22,9	52,1	10,4	28,0	41,7 bA	47,9 bA	79,2 aA	52,1 bA	79,2 aA	87,5 aA	72,9 aA	65,8
CVNI	29,2	22,9	35,4	33,3	18,8	54,2	12,5	29,5	10,4 dB	2,1 dB	27,1 cB	18,7 cB	41,7 bB	62,5 aB	20,8 cB	26,2
Média	26,0 b	26,0 b	34,4 b	29,2 b	20,9 c	53,1 a	11,5 d	28,7	26,1	25,0	53,1	35,4	60,4	75,0	46,9	46,0
Enraizamento (%) (CV% = 48,4)								Enraizamento (%) (CV% = 53,1)								
Estufim	14,6 aB	10,4 aA	8,3 bB	2,1 bA	4,2 bB	18,8 aB	2,1 bA	8,6	39,6 bA	18,8 cA	35,4 bA	18,8 cA	22,9 cA	50,0 aA	64,6 aA	35,7
CVNI	29,2 bA	12,5 cA	39,6 aA	6,2 cA	14,6 cA	39,6 aA	4,2 cA	20,8	8,3 aB	0,0 aB	4,2 aB	0,0 aB	10,4 aA	4,2 aB	14,6 aB	6,0
Média	21,9	11,5	24,0	4,2	9,4	29,2	3,1	14,7	24,0	9,4	19,8	9,4	16,7	27,1	39,6	20,8
Número de raízes (CV% = 77,4)								Número de raízes (CV% = 72,5)								
Estufim	0,8 aB	0,3 aA	0,1 aB	< 0,1 aA	0,1 aA	0,5 aB	< 0,1 aA	0,3	4,1 aA	0,9 dA	1,2 dA	0,5 dA	0,7 dA	2,1 cA	2,8 bA	1,7
CVNI	3,0 aA	0,6 bA	2,3 aA	0,3 bA	0,7 bA	2,5 aA	0,2 bA	1,4	1,1 aA	NR aA	0,1 aB	NR aA	0,4 aA	0,1 aA	0,8 aA	0,3
Média	1,9	0,5	1,2	0,2	0,4	1,5	0,1	0,8	2,6	0,2	0,6	0,4	0,5	1,1	1,8	1,0
Brotação (%) (CV% = 41,7)								Brotação (%) (CV% = 38,8)								
Estufim	12,5 bB	16,7 bA	27,1 aA	16,7 bB	8,3 bA	12,5 bB	6,3 bA	14,3	33,3 bA	47,9 aA	37,5 bA	47,9 aA	62,5 aA	45,9 aA	27,1 bA	43,2
CVNI	29,2 aA	16,7 bA	37,5 aA	29,2 aA	8,3 bA	35,4 aA	4,1 bA	22,9	8,3 aB	6,2 aB	25,0 aA	14,6 aB	18,8 aB	18,8 aB	18,8 aA	15,8
Média	20,8	16,7	32,3	23	8,3	24,0	5,2	18,6	20,8	27,1	31,3	31,3	40,6	32,3	22,9	29,5
Folha original (%) (CV% = 48,0)								Folha original (%) (CV% = 24,4)								
Estufim	22,9	18,8	31,3	12,5	16,7	52,1	4,2	22,6 a	20,9 cA	6,2 dA	87,5 aA	64,6 bA	64,6 bA	77,1 aA	66,7 bA	55,4
CVNI	6,3	14,6	14,6	12,5	16,7	37,5	8,3	15,8 b	4,2 cB	2,1 cA	12,5 cB	8,3 cB	41,7 bB	66,7 aA	12,5 cB	21,1
Média	14,6 b	16,6 b	22,9 b	12,5 b	16,7 b	44,8 a	6,2 b	19,2	12,5	4,2	50,0	36,5	53,1	71,9	39,6	38,2

NR: Ausência de estacas enraizadas; *Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Tabela 17 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* da população de Três Barras (TB) obtidas no outono e inverno para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento

Outono								Inverno									
Sobrevivência (%) (CV% = 6,1)								Sobrevivência (%) (CV% = 19,2)									
Amb.	Genótipo							Amb.	Genótipo								
	OTB1	OTB2	OTB3	OTB4	OTB5	OTB6	OTB7	Média	ITB1	ITB2	ITB3	ITB4	ITB5	ITB6	ITB7	Média	
Estufim	89,6 bA*	95,9 aA	60,4 dB	68,8 cB	97,9 aA	87,5 bA	91,7 bA	84,5	Estufim	50,0 bA	45,9 bA	64,6 aA	12,5 dA	2,1 eA	27,1 cA	2,1 eA	29,2
CVNI	62,5 cB	77,1 bB	70,9 bA	85,4 aA	85,4 aB	47,9 dB	39,6 eB	67,0	CVNI	0,0 cB	4,2 bB	8,3 bB	2,1 cB	0,0 cA	25,0 aA	0,0 cA	5,6
Média	76,1	86,5	65,6	77,1	91,7	67,7	65,7	75,7	Média	25,0	25,0	36,5	7,3	1,0	26,0	1,0	17,4
Calos (%) (CV% = 15,1)								Calos (%) (CV% = 54,4)									
Estufim	58,4 bA	62,5 bA	43,8 bB	54,2 bB	50,0 bB	68,8 aA	81,3 aA	59,8	Estufim	33,4 aA	20,9 bA	37,5 aA	4,2 cA	2,1 cA	10,4 cB	2,1 cA	15,8
CVNI	60,4 bA	66,7 bA	68,8 bA	83,3 aA	81,3 aA	43,8 cB	39,6 cB	63,4	CVNI	NS bB	4,1 bB	6,2 bB	NS bA	NS bA	18,8 aA	NS bA	4,2
Média	59,4	64,6	56,3	68,7	65,6	56,3	60,4	61,6	Média	16,7	12,5	21,9	2,1	1,0	14,6	1,0	10,0
Enraizamento (%) (CV% = 81,7)								Enraizamento (%) (CV% = -)									
Estufim	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aA	0,0	Estufim	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CVNI	6,3 cA	0,0 cA	16,7 bB	52,1 aA	20,9 bA	18,8 bA	2,1 cA	16,7	CVNI	NS	0,0	0,0	0,0	NS	0,0	NS	0,0
Média	3,1	0,0	8,3	26	10,4	9,4	1,0	8,3	Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Número de raízes (CV% = 82,9)								Número de raízes (CV% = -)									
Estufim	NR aA	NR aA	NR aA	NR aB	NR aB	NR aB	NR aA	NR	Estufim	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
CVNI	0,1 dA	NR dA	0,3 cA	2,8 aA	0,6 cA	1,4 bA	< 0,1 dA	0,7	CVNI	NS	NR	NR	NS	NR	NS	NR	NR
Média	< 0,1	NR	0,2	1,4	0,3	0,7	< 0,1	0,4	Média	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Brotação (%) (CV% = 74,4)								Brotação (%) (CV% = 67,6)									
Estufim	2,1 cA	0,0 cB	0,0 cA	0,0 cA	10,4 bA	8,3 bA	18,8 aA	5,7	Estufim	41,7 aA	8,3 cA	18,8 bA	8,3 cA	2,1 dA	20,9 bA	2,1 dA	14,6
CVNI	6,3 bA	16,7 aA	2,1 bA	6,2 bA	14,6 aA	14,6 aA	8,3 bB	9,8	CVNI	NS bB	0,0 bA	2,1 bB	2,1 bA	NS bA	22,9 aA	NS bA	3,9
Média	4,2	8,3	1,0	3,1	12,5	11,5	13,6	7,7	Média	20,8	4,2	10,4	5,2	1,0	21,9	1,0	9,2
Folha original (%) (CV% = 12,7)								Folha original (%) (CV% = 90,0)									
Estufim	77,1 bA	83,4 bA	60,4 cA	68,8 cA	97,9 aA	79,2 bA	81,3 bA	78,3	Estufim	12,5 bA	18,8 aA	22,9 aA	0,0 cA	2,1 cA	8,3 cA	2,1 cA	9,5
CVNI	54,2 bB	54,2 bB	64,6 bA	79,2 aA	72,9 aB	33,3 cB	35,4 cB	56,3	CVNI	NS bB	2,1 bB	2,1 bB	0,0 bA	NS bA	14,6 aA	NS bA	2,7
Média	65,6	68,8	62,5	74,0	85,4	56,3	58,3	67,3	Média	6,3	10,4	12,5	0,0	1,0	11,5	1,0	6,1

NR: Ausência de estacas enraizadas; NS: Ausência de estacas sobreviventes; *Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O número de raízes foi maior para as estacas produzidas nas estações que apresentaram maior enraizamento, sendo verão (1,0) e primavera (0,8). Durante o verão, o estufim apresentou as maiores médias (1,7), principalmente para VTB1 (4,1) e VTB7 (2,8). Para a primavera, isto ocorreu para o material mantido no CVNI (1,4), destacando PTB1 (3,0), PTB6 (2,5) e PTB3 (2,3). Embora o outono tenha sido pouco eficiente para o enraizamento de uma forma geral, o genótipo OTB4 ainda apresentou um número médio de raízes semelhante à genótipos de outras estações (2,8).

As estacas apresentaram brotar mais durante o verão (29,5%) quando mantidas no estufim (27,1%), na primavera (18,6%) quando mantidas no CVNI (22,9%), e durante o inverno (9,2%) quando mantidas no estufim (14,6%). As maiores porcentagens de brotação ocorreram para os genótipos VTB5 (62,5%), VTB2 (47,9%), VTB4 (47,9%), VTB6 (45,9%), e ITB1 (41,7%), todos acima de 40%.

A permanência das folhas originais foi, em uma perspectiva geral, quase 30% maior durante o outono (58,3%), principalmente no estufim (78,3%), quando comparada ao verão (38,2%) também para o estufim (55,4%). Quanto aos genótipos, os maiores destaques foram para OTB5 (97,9%), com todas as estacas vivas ainda com a presença de suas folhas originais, VTB3 (87,5%), OTB2 (83,4%) e OTB7 (81,3%), todas acima de 80%.

6.5.3 Estaquia de genótipos da população de Urupema de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

Para os genótipos de UR, maior parte das variáveis apresentou diferença significativa para as interações fatoriais com as estações do ano (ANEXO G). Estas obtiveram uma AE% muito alta (> 90%), com exceção do número de raízes durante o outono, a qual foi alta (entre 70% e 90%).

As porcentagens de sobrevivência foram menores do que 40% de uma forma geral, sendo a maior obtida durante o verão (34,8%) e a menor durante a primavera (18,7%). O estufim foi superior para esta variável em todas as estações, sendo mais evidente no verão (56,2%) e outono (44,9%). Em nível de genótipos, se destacam VUR2 (81,2%), OUR2 (79,2%), OUR5 (72,9%) e IUR2 (72,9%), todos com ao menos 70% de suas estacas vivas.

A presença de calos foi próxima à sobrevivência, de forma mais evidente na primavera (diferença de 3,2%) (Tabelas 18 e 19). As maiores diferenças foram apresentadas no inverno no estufim (12,4%), especialmente para o genótipo IUR4 (25,0%), e no verão para o mesmo ambiente (10,1%), destacando os genótipos VUR2 (33,3%) e VUR3 (22,9%).

Tabela 18 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* da população de Urupema (UR) obtidas na primavera e verão para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento

Primavera								Verão								
Sobrevivência (%) (CV% = 20,5)								Sobrevivência (%) (CV% = 10,1)								
Amb.	Genótipo							Amb.	Genótipo							
	PUR1	PUR2	PUR3	PUR4	PUR5	PUR6	PUR7	Média	VUR1	VUR2	VUR3	VUR4	VUR5	VUR6	VUR7	Média
Estufim	20,9 bA*	52,1 aA	56,2 aA	10,4 cA	4,2 cA	8,3 cA	6,2 cA	22,6	60,4 cA	81,2 aA	50,0 dA	62,5 cA	66,7 bA	58,3 cA	14,6 eA	56,2
CVNI	6,2 cB	31,2 bB	52,1 aA	8,3 cA	4,2 cA	2,1 dB	0,0 dB	14,9	8,3 cB	4,2 cB	4,2 cB	18,8 bB	41,7 aB	14,6 bB	2,1 cB	13,4
Média	13,5	41,7	54,2	9,4	4,2	5,2	3,1	18,7	34,4	42,7	27,1	40,6	54,2	36,5	8,3	34,8
Calos (%) (CV% = 34,7)								Calos (%) (CV% = 25,1)								
Estufim	18,8 bA	47,9 aA	54,2 aA	10,4 cA	0,0 dA	8,3 cA	0,0 dA	19,9	56,3 aA	47,9 bA	27,1 cA	62,5 aA	62,5 aA	52,1 bA	14,6 dA	46,1
CVNI	6,2 cB	18,8 bB	45,8 aB	4,2 cA	2,1 cA	0,0 cB	NS cA	11,0	8,3 cB	2,1 cB	2,1 cB	16,7 bB	35,4 aB	10,4 bB	0,0 cB	10,7
Média	12,5	33,3	50,0	7,3	1,0	4,2	0,0	15,5	32,3	25,0	14,6	39,6	50,0	31,2	7,3	28,4
Enraizamento (%) (CV% = 162,4)								Enraizamento (%) (CV% = 54,3)								
Estufim	0,0	2,1	12,5	0,0	0,0	2,1	0,0	2,4	31,3 bA	6,2 dA	20,9 cA	4,2 dA	45,8 aA	29,2 bA	2,1 dA	19,9
CVNI	0,0	2,1	18,8	0,0	2,1	0,0	NS	3,3	0,0 bB	0,0 bA	0,0 bB	0,0 bA	12,5 aB	10,4 aB	0,0 bA	3,3
Média	0,0 b	2,1 b	15,6 a	0,0 b	1,0 b	1,0 b	0,0 b	2,8	15,6	3,1	10,4	2,1	29,1	19,8	1,0	11,6
Número de raízes (CV% = 186,9)								Número de raízes (CV% = 89,7)								
Estufim	NR	< 0,1	0,3	NR	NR	0,1	NR	0,1	0,9 bA	0,1 cA	0,5 cA	0,2 cA	3,3 aA	1,6 bA	< 0,1 cA	0,9
CVNI	NR	0,1	0,5	NR	< 0,1	NR	NS	0,1	NR aB	NR aA	NR aA	NR aA	0,3 aB	0,4 aB	NR aA	0,1
Média	NR b	< 0,1 b	0,4 a	NR b	< 0,1 b	0,1 b	NR b	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	1,8	1,0	< 0,1	0,5
Brotação (%) (CV% = 38,4)								Brotação (%) (CV% = 75,4)								
Estufim	20,9 bA	47,9 aA	41,7 aA	4,2 cA	0,0 cA	2,1 cA	4,2 cA	17,3	6,2	4,2	8,3	0,0	39,6	8,3	8,3	10,7 a
CVNI	6,2 cB	14,6 bB	31,3 aB	2,1 cA	2,1 cA	0,0 cA	NS cA	8,0	0,0	0,0	0,0	2,1	22,9	4,2	0,0	4,2 b
Média	13,5	31,3	36,5	3,1	1,0	1,0	2,1	12,6	3,1 b	2,1 b	4,2 b	1,0 b	31,3 a	6,2 b	4,2 b	7,4
Folha original (%) (CV% = 69,9)								Folha original (%) (CV% = 22,4)								
Estufim	0,0	22,9	41,7	6,3	0,0	0,0	2,1	10,4 a	54,2 bA	77,1 aA	35,4 cA	62,5 bA	58,3 bA	58,3 bA	12,5 dA	51,2
CVNI	0,0	12,5	35,4	0,0	0,0	0,0	NS	6,8 b	8,3 cB	2,1 cB	2,1 cB	16,7 bB	27,1 aB	12,5 bB	2,1 cB	10,1
Média	0,0 c	17,7 b	38,6 a	3,1 c	0,0 c	0,0 c	1,0 c	8,6	31,2	39,6	18,7	39,6	42,7	35,4	7,3	30,6

NR: Ausência de estacas enraizadas; *Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Tabela 19 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de *I. paraguariensis* da população de Urupema (UR) obtidas no outono e inverno para a relação entre sete genótipos e dois ambientes de enraizamento

Outono									Inverno								
Sobrevivência (%) (CV% = 13,5)									Sobrevivência (%) (CV% = 21,0)								
Amb.	Genótipo								Amb.	Genótipo							
	OUR1	OUR2	OUR3	OUR4	OUR5	OUR6	OUR7	Média		IUR1	IUR2	IUR3	IUR4	IUR5	IUR6	IUR7	Média
Estufim	18,8 eA*	79,2 aA	54,2 cA	56,2 cA	72,9 bA	6,2 fA	27,1 dA	44,9	Estufim	6,2 dA	72,9 aA	35,4 bA	27,1 cA	10,4 dA	39,6 bA	25,0 cA	30,9
CVNI	14,6 cA	22,9 bB	16,7 cB	2,1 dB	31,2 aB	4,2 dA	8,3 dB	14,3	CVNI	4,2 cA	10,4 bB	12,5 bB	0,0 cB	0,0 cB	25,0 aB	2,1 cB	7,7
Média	16,7	51,0	35,4	29,2	52,1	5,2	17,7	29,6	Média	5,2	41,7	24,0	13,5	5,2	32,3	13,5	19,3
Calos (%) (CV% = 26,3)									Calos (%) (CV% = 62,3)								
Estufim	8,3 eA	70,8 aA	47,9 cA	54,2 cA	60,4 bA	2,1 eA	20,9 dA	37,8	Estufim	4,2 dA	58,4 aA	29,2 bA	2,1 dA	0,0 dA	20,9 cA	14,6 cA	18,5
CVNI	14,6 bA	20,9 aB	10,4 bB	2,1 bB	22,9 aB	0,0 bA	8,3 bB	11,3	CVNI	0,0 aA	4,2 aB	12,5 aB	NS aA	NS aA	8,3 aB	2,1 aB	3,9
Média	11,5	45,8	29,2	28,1	41,7	1,0	14,6	24,5	Média	2,1	31,3	20,8	1,0	0,0	14,6	8,3	11,2
Enraizamento (%) (CV% = 159,2)									Enraizamento (%) (CV% = -)								
Estufim	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aA	0,0 aA	2,1 aA	0,0 aA	0,3	Estufim	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CVNI	8,3 aA	4,2 bA	4,2 bA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	2,4	CVNI	0,0	0,0	0,0	NS	NS	0,0	0,0	0,0
Média	4,2	2,1	2,1	0,0	0,0	1,0	0,0	1,3	Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Número de raízes (CV% = 238,8)									Número de raízes (CV% = -)								
Estufim	NR aB	NR aB	NR aA	NR aA	NR aA	< 0,1 aA	NR aA	< 0,1	Estufim	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
CVNI	0,2 aA	0,1 bA	0,1 bA	NR bA	NR bA	NR bA	NR bA	< 0,1	CVNI	NR	NR	NR	NS	NS	NR	NR	NR
Média	0,1	< 0,1	< 0,1	NR	NR	< 0,1	NR	< 0,1	Média	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Brotação (%) (CV% = 275,6)									Brotação (%) (CV% = 68,6)								
Estufim	0,0	2,1	0,0	2,1	6,3	0,0	2,1	1,8	Estufim	0,0 dA	37,5 aA	14,6 cA	8,3 dA	6,2 dA	27,1 bA	14,6 cA	15,5
CVNI	2,1	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	CVNI	0,0 bA	2,1 bB	8,3 bA	NS bA	NS bA	18,8 aA	2,1 bB	4,5
Média	1,0	1,0	1,0	1,0	3,1	0,0	1,0	1,2	Média	0,0	19,8	11,4	4,2	3,1	22,9	8,3	10,0
Folha original (%) (CV% = 32,4)									Folha original (%) (CV% = 111,1)								
Estufim	2,1 eB	66,7 aA	31,3 cA	43,8 bA	62,5 aA	0,0 eA	16,7 dA	31,9	Estufim	4,2 cA	33,3 aA	20,9 bA	0,0 cA	0,0 cA	16,7 bA	2,1 cA	11,0
CVNI	12,5 aA	20,9 aB	6,2 bB	0,0 bB	22,9 aB	0,0 bA	6,2 bB	9,8	CVNI	0,0 aA	0,0 aB	4,2 aB	NS aA	NS aA	2,1 aB	0,0 aA	0,9
Média	7,3	43,8	18,7	21,9	42,7	0,0	11,5	20,8	Média	2,1	16,7	12,5	0,0	0,0	9,4	1,0	6,0

NR: Ausência de estacas enraizadas; NS: Ausência de estacas sobreviventes; *Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O maior enraizamento ocorreu no verão (11,6%), enquanto a primavera (2,8%) e o outono (1,3%) foram inferiores, e o inverno não apresentou estacas enraizadas. Com exceção do verão e o estufim (19,9%), as demais estações apresentaram melhores porcentagens para o CVNI, mas não superiores a 4%. Para genótipos, se destacam apenas VUR5 (45,8%) e VUR1 (31,3%), com porcentagens acima de 30%.

O número de raízes foi equivalente ao enraizamento em si, em que a primavera e outono apresentaram porcentagens iguais ou menores a 0,1, sendo o verão cerca de cinco vezes maior que estas (0,5). As maiores médias de acordo com os genótipos ocorreram para VUR5 (3,3) e VUR6 (1,6).

A brotação das estacas não seguiu um padrão como observado entre a sobrevivência e a formação de calos, sendo maior para a primavera (12,6%) para o material mantido no estufim (17,3%) e para o inverno (10,0%) para o mesmo ambiente (15,5%). Neste quesito, as maiores médias foram apresentadas pelos genótipos PUR2 (47,9%), PUR3 (41,7%) e IUR2 (37,5%), acima de 30%.

Assim como para a porcentagem de brotações, a permanência das folhas originais não foi similar com alguma outra relação anteriormente destacada, com exceção do verão em que a média geral (30,6%) foi similar à de sobrevivência. As maiores permanências foram apresentadas pelos genótipos VUR2 (77,1%), VUR4 (62,5%) e OUR5 (62,5%), todas maiores do que 60%.

6.6 DISCUSSÃO

6.6.1 Estaquia de duas populações e seus genótipos em função das estações do ano e dois ambientes de enraizamento

A sobrevivência das estacas foi afetada por todas as condições testadas, seja de maneira positiva ou negativa, em nível de população ou de genótipos. As diferenças presentes entre as populações podem ser explicadas pelos seus locais de origem, possuindo condições climáticas singulares. Em trabalhos com a população de Urupema (UR), Nascimento *et al.* (2018, 2019a, 2020) destacam que a sobrevivência de estacas é conhecida, com valores podendo variar entre cerca de 20% a até 90% de acordo com os tratamentos aplicados. Ainda, os autores afirmam que a sobrevivência é menor em relação a outros trabalhos com mesma espécie de uma forma geral, possivelmente ocorrendo em função das condições climáticas do ambiente de origem, tais como menor incidência de luz solar e menores temperaturas anuais (MARTINS-RAMOS

et al., 2011). Isto ajuda a explicar não somente estas menores porcentagens, mas como todas as demais variáveis em relação a população de Três Barras (TB).

A variação de sobrevivência entre genótipos no presente trabalho, o qual chegou a ser superior a 40% em mesma época e ambiente, pode ser explicada pelas próprias características fisiológicas do indivíduo (FRANZON *et al.*, 2010). Nascimento *et al.* (2020) e Pimentel *et al* (2019) afirmam que, alguns genótipos ainda podem apresentar superioridade a outros mesmo em condições ambientais desfavoráveis, ultrapassando 70% de estacas e 80% de miniestacas vivas desta espécie. Isto possibilita a determinação de materiais superiores para esta variável (BRONDANI *et al.*, 2008).

Entretanto, a manutenção da sobrevivência também pode ser afetada pelas condições do ambiente de enraizamento. Neste caso, ambos os ambientes testados no presente trabalho não apresentaram ser ideias para sobrevivência de estacas de *I. paraguariensis*. Para o estufim, embora com umidade constante acima de 85%, este apresentou maiores amplitudes térmicas, principalmente entre dia e noite, enquanto a casa de vegetação com nebulização intermitente (CVNI) apresentou menores variações abruptas de temperatura, mas com baixa umidade, podendo ser inferiores a 60%. Estas variações entre os ambientes de enraizamento podem ser explicadas pelas suas estruturas. O estufim é uma estrutura simplificada, objetivando manter uma elevada umidade do ar e do substrato, enquanto o CVNI é uma casa de vegetação optimizada para o enraizamento de *Eucalyptus* sp., não demandante de umidade alta para seu enraizamento. Uma vez que os propágulos não possuem raízes, um ambiente com umidade relativa do ar acima de 80% é essencial para que não ocorra a sua desidratação excessiva (XAVIER *et al.*, 2013), mas quando associado a temperaturas mais altas, acima de 35 °C, é possível que ocorra sua rápida oxidação pela aceleração do metabolismo seguido de seu esgotamento energético.

Levando em perspectiva as épocas de coleta de material vegetal, TB apresentou maior sobrevivência de estacas no outono, enquanto UR demonstrou ser estatisticamente igual para o verão e outono, com as maiores porcentagens para esta população. Esta maior sobrevivência, principalmente no outono, possivelmente ocorreu em função da maior quantidade de energia reservada durante os períodos quentes associado ao início do estágio de dormência das plantas estudadas. De mesma forma, o ambiente de enraizamento também mostrou estar associado às estações testadas, em que o estufim apresentou maior sobrevivência no verão e no outono, com aproximadamente 65%.

Isto demonstra que a estação do ano também é um fator de elevada importância (STUEPP *et al.*, 2017a), podendo ser potencializado de acordo com a população de estudo e o

ambiente de enraizamento. Fisiologicamente, os períodos entre final do inverno e a primavera são ideais para obtenção de material vegetal para a propagação vegetativa, visto que há o aumento das temperaturas e a planta retoma suas atividades metabólicas, utilizando esta energia armazenada para enraizar (HARTMANN *et al.*, 2011). Testando as estações do ano na estação de *I. paraguariensis*, Stuepp *et al* (2017a) observaram que a porcentagem de sobrevivência pode ser quase quatro vezes maior para o verão em relação a primavera, enquanto o outono não atingiu 5% de sobrevivência. Ainda, a média de sobrevivência de miniestacas coletadas no verão, de acordo com Pimentel *et al.* (2019), é menor do que a metade das obtidas no inverno e outono, próximas a 80%.

Desta forma, é possível afirmar que não há consentimento na melhor época do ano para coleta de material vegetal para propagar vegetativamente esta espécie, e isto possivelmente ocorre em função das estações não estarem bem definidas para as regiões de estudo. É comum que estas regiões apresentem temperaturas menores mesmo em meados da primavera e início do verão, de mesma forma que pode haver um prolongamento de temperaturas médias mais elevadas durante o outono. Em suma, torna-se difícil esta relação levando em consideração as estações do ano em função do calendário, sendo necessário avaliar a partir de dados climatológicos.

Como constatado nos resultados do presente trabalho, houve uma aproximação dos resultados entre sobrevivência e formação de calos, não importando os tratamentos avaliados. A presença de calos em propágulos de *I. paraguariensis* é comum em materiais maduros que não passaram por quaisquer técnicas de revigoramento ou rejuvenescimento (WENDLING *et al.*, 2013; STUEPP *et al.*, 2017a; 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018). De acordo com um estudo sobre o mesmo tema, espécie e a população de UR, Nascimento *et al.* (2020) observaram que ao se testar diferentes genótipos os calos foram presentes em até 100% das estacas de alguns materiais, mas com diferenças de até 35%. Isto ocorreu de forma semelhante para o presente trabalho de uma forma geral, com alguns genótipos da população de TB apresentando diferenças maiores de 30%. Ainda, mesmo que minijardins apresentem grande vigor quando comparados com material de copa, Pimentel *et al.* (2019) e Vieira *et al.* (2021) observaram que determinados genótipos podem apresentar de 60% a até mais do que 80% de calos em suas miniestacas, propondo que o vigor vegetativo desta espécie seja extremamente sensível ao tempo.

Inversamente proporcional à sobrevivência, as estacas da população de TB obtidas no outono apresentaram baixas porcentagens de calos. Este resultado não corrobora com um trabalho similar com a mesma espécie (STUEPP *et al.*, 2017b), em que os autores obtiveram

um aumento na presença de calos para esta estação, em especial para plantas mãe mais maduras. Uma explicação para estes resultados estaria na destinação das reservas energéticas das estacas, objetivando a sobrevivência ao enraizamento em alguns genótipos desta população. Todavia, constata-se resultados próximos entre sobrevivência e calos para a população de UR, podendo indicar que não houve uma priorização de suas reservas energéticas, tal como ocorreu para TB. Entretanto, estacas de *I. paraguariensis* com calos podem ainda enraizar, caso permaneçam por maior período inseridas no ambiente de enraizamento (STUEPP *et al.*, 2017b), sendo isto observado para o genótipo OTB4 mantido no CVNI, com do que 50% de suas estacas com raízes após 90 dias, sendo o material destas obtida no outono.

O enraizamento variou consideravelmente de acordo com todos os tratamentos testados, mas principalmente em função dos ambientes de enraizamento, sendo isto melhor visualizado para a população de TB. Durante a primavera, as condições não foram as ideias para ambos os ambientes de enraizamento, como constatado anteriormente para a sobrevivência, mas o enraizamento no CVNI ocorreu em praticamente metade das estacas ainda vivas, mais do que o dobro obtido pelo estufim. Este resultado possivelmente ocorreu pois, durante as primeiras três semanas, o CVNI manteve uma umidade relativa próxima de 90%, favorecendo um determinado enraizamento de alguns genótipos, enquanto o estufim apresentou uma grande variação de temperatura, o que pode ter dificultado a diferenciação celular. Já para o verão, foi constatado o inverso, em que o estufim apresentou o maior enraizamento, pouco menos da metade das estacas ainda vivas. O menor enraizamento obtido pelo CVNI nesta estação ocorreu em função da baixa sobrevivência, causada pelo aumento de temperatura e umidade constante mais alta, podendo ter acarretado em uma oxidação acelerada. Todavia, novamente houve uma inversão do melhor ambiente de enraizamento, com o CVNI apresentando a maior porcentagem de enraizamento durante o outono, mas com apenas 10% de enraizamento. Isto provavelmente ocorreu devido ao início de estado de dormência deste material em função da diminuição das temperaturas.

Em relação às condições climáticas dos ambientes de enraizamento do presente estudo, é possível que a variação de temperatura tenha sido fator determinante no enraizamento das estacas. Em um estudo anterior com genótipos de *I. paraguariensis* provenientes da população de UR, Nascimento *et al.* (2020) determinaram um enraizamento médio total menor do que 10%, sendo 11,1% para estacas mantidas no CVNI e 4,9% no estufim, para material coletado na primavera. Resultados semelhantes foram obtidos para esta população no presente trabalho, com uma menor média geral próxima a 8%, sendo o enraizamento presente apenas no CVNI, com 16,7%. É necessário que os ambientes de enraizamento possuam condições específicas

para que ocorra a formação de raízes nos propágulos (XAVIER *et al.*, 2013), em que mudanças abruptas de temperaturas, principalmente de forma diária, podem dificultar a divisão celular devido a mudanças no metabolismo e na capacidade de absorção de nutrientes (CUNHA *et al.*, 2009). Temperaturas variando entre 15 °C e 35 °C e uma umidade elevada são ideais para que haja o melhor enraizamento, mantendo uma transpiração baixa e o metabolismo em níveis aceitáveis (GOULART e XAVIER, 2008).

Muito embora alguns genótipos tenham enraizado eficientemente, é possível que estes teriam apresentado resultados superiores caso utilizados material de maior vigor (WENDLING *et al.*, 2013, 2014b). Minijardins clonais desta espécie podem apresentar genótipos superiores com porcentagens de enraizamento entre 60% e 70%, enquanto materiais inferiores apresentam valores até menores do que 3% e 10% para mesmas épocas (PIMENTEL *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2021). Entretanto, Nascimento *et al.* (2020) destacam que é possível obter materiais com elevada capacidade de enraizamento diretamente de áreas nativas de brotações de copa, com genótipos podendo atingir valores maiores do que 45% de enraizamento quando mantidos no CVNI e cerca de 23% no estufim. Isto é facilmente observado no presente trabalho, em que determinados genótipos apresentaram enraizamento muito superior a outros, pertencentes a uma mesma população, dentro de um mesmo ambiente e de mesma estação do ano. Assim, é possível considerar que a variação no enraizamento não seja apenas intrínseca à espécie, não sendo apenas dependente do vigor vegetativo, mas também do genótipo utilizado, uma vez que materiais de mesma idade e das mesmas populações apresentam enraizamento de forma muito diferenciada.

Ainda, o enraizamento de genótipos em diferentes ambientes de enraizamento pode apresentar uma relação complicada de ser compreendida, visto que alguns estudos apresentem que talvez não haja diferença significativa nesta variável quando testados genótipos bem estabelecidos (BRONDANI *et al.*, 2008, 2009). Todavia, o presente estudo demonstra que houveram grandes variações no enraizamento de estacas de mesmos genótipos de acordo com os diferentes ambientes, podendo ser facilmente observado para OTB4, VTB6, VTB1, PTB3, VUR5 e VUR1, todos com diferenças acima de 30%. Isto indica a necessidade de novos estudos considerando diferentes ambientes de enraizamento com características estruturais e condições climáticas singulares para esta espécie.

Desta forma, a partir dos resultados obtidos e comparados, é possível perceber que existe uma dependência de todas as variáveis em função das populações de estudo e, de maneira mais evidente, entre os genótipos de uma mesma população. De fato, o potencial de enraizamento destes pode ser favorecido ou afetado negativamente pelo ambiente de enraizamento em que

este se encontra. O ambiente de enraizamento em si é determinante para o sucesso da estquia nesta espécie, em que a temperatura e a umidade em níveis adequados são essenciais para a manutenção da sobrevivência e formação de raízes, sendo aparentemente necessário que haja uma diminuição gradativa da umidade para indução do enraizamento. Ainda, as estações do ano estudadas demonstraram ser discrepantes em relação a outros trabalhos, sendo necessário avaliar o local de origem do material vegetal destes. As populações estudadas estão localizadas no Sul do Brasil, principalmente UR, sendo estas regiões conhecidas pelo prolongamento das estações frias, indicando que, embora determinada estação tenha iniciado de acordo com os calendários, fisiologicamente as plantas mãe estudadas podem estar ainda em outra.

Todos estes resultados demonstram a atual dificuldade de propagar vegetativamente esta espécie, podendo ser dependente de inúmeros fatores, sendo a seleção correta de genótipos um dos mais difíceis. Entretanto, por um lado positivo e corroborando com conclusões obtidas por Brondani *et al.* (2008, 2009), o estufim foi superior no enraizamento de estacas de forma geral, principalmente no verão, mesmo sendo um ambiente simplificado. Isto é importante em um aspecto produtivo, podendo ser facilmente aplicado por pequenas empresas, viveiros, ou por próprios produtores rurais, uma vez que se trata de um barato e eficiente na estquia de *I. paraguariensis*.

6.7 CONCLUSÃO

Para as populações, Três Barras obteve a melhor resposta à estquia do que a população de Urupema. Isto pode estar vinculado a aspectos genéticos e ambientais, considerando as especificidades do clima, solo e interações ecológicas de *I. paraguariensis* em cada local de origem.

Foi constatada interação entre genótipos por ambientes, ocorrendo a melhor adaptação de determinados indivíduos dentro de uma mesma população em ambientes específicos. De mesma forma, isto pode ocorrer diferentemente em função das estações do ano.

7 CAPÍTULO IV – BROTAÇÃO EPICÓRMICA DE GALHOS DESTACADOS DE *Ilex paraguariensis* PARA A PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

7.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a formação de brotações epicórmicas de galhos destacados e testar o enraizamento de estacas provenientes destas brotações. Para tanto, foram instalados três experimentos: I) brotação epicórmica de galhos de duas populações em função de seu diâmetro (finos – entre 10 e 20 mm; grossos – maiores do que 20 mm); II) brotação epicórmica de galhos de uma população em relação ao diâmetro e sentido de armazenamento (vertical ou horizontal), e; III) estaquia comparando material de copa e de brotações epicórmicas produzidas por galhos destacados. Os galhos foram obtidos de áreas produtoras em Três Barras (TB) e Urupema (UR) em dezembro de 2020, sendo alocados em estufim com irrigação por microaspersão. Em mesmo período, brotações de copa e de galhos destacados foram coletadas da população de TB para a estaquia, sendo acondicionados sob mesmo ambiente. Os galhos foram avaliados a cada sete ou 15 dias para: sobrevivência (%), brotação (%), número de brotos, comprimento de brotos (cm); enquanto para as estacas foram avaliadas após 90 dias: sobrevivência (%), calos (%), enraizamento (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm), novas brotações (%) e permanência das folhas originais (%). Para os galhos, TB apresentou ao menos 5 brotos a mais em todas as avaliações, com destaque para seus galhos grossos (37 em média, 336 no máximo), enquanto que para UR a maior brotação ocorreu para os galhos finos (24 em média, 219 no máximo). A sobrevivência dos galhos foi ao menos 30 dias superior para galhos mantidos horizontalmente, mas sua brotação foi ao menos 20% menor quando comparada com os galhos mantidos verticalmente. Embora a sobrevivência das estacas revigoradas tenha sido menor em relação ao material de copa seu enraizamento foi aproximadamente apenas 2% menor, obtendo cerca de 75% de suas estacas sobreviventes com raízes. A brotação epicórmica de galhos destacados é uma técnica eficiente para a obtenção de material revigorado, sendo mais evidente para os galhos grossos da população de TB. As estacas provenientes das brotações epicórmicas dos galhos possuem maior mortalidade mas apresentam enraizamento eficiente.

Palavras-chave: Resgate vegetativo; Revigoramento; Estaquia; Erva-mate.

7.2 ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the formation of epicormic sprouts from detached branches and to test the rooting of cuttings from these sprouts. Therefore, three experiments were carried out: I) epicormic sprouting of branches from two populations as a function of their diameter (thin – between 10 and 20 mm; thick – greater than 20 mm); II) epicormic sprouting of branches of a population in relation to the diameter and storage direction (vertical or horizontal), and; III) cuttings comparing material from canopy and epicormic sprouts produced by detached branches. The branches were obtained from producing areas in Três Barras (TB) and Urupema (UR) in December 2020, being placed in a greenhouse with micro-sprinkler irrigation. In the same period, canopy sprouts and detached branches were collected from the TB population for cuttings, being placed under the same environment. The branches were evaluated every seven or 15 days for: survival (%), sprouting (%), number of sprouts, length of sprouts (cm); while for cuttings the following were evaluated after 90 days: survival (%), callus (%), rooting (%), number of roots, root length (cm), new sprouts (%) and permanence of original leaves (%). For the branches, TB presented at least 5 more sprouts in all evaluations, with emphasis on its thick branches (37 on average, 336 at most), while for UR the highest sprouting occurred for the thin branches (24 on average, 219 maximum). Branch survival was at least 30 days higher for branches kept horizontally, but their sprouting was at least 20% lower when compared to branches maintained vertically. Although the survival of the reinvigorated cuttings was lower in relation to the canopy material, their rooting was approximately only 2% lower, obtaining about 75% of their surviving cuttings with roots. The epicormic sprouting of detached branches is an efficient technique for obtaining reinvigorated material, being more evident for the thick branches of the TB population. Cuttings from the epicormic sprouts of the branches have higher mortality but have efficient rooting.

Keywords: Vegetative rescue; Reinvigoration; Cuttings; Yerba-mate.

7.3 INTRODUÇÃO

Para *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire, o resgate vegetativo é uma etapa essencial para seu melhoramento genético, uma vez que pode haver certas dificuldades atreladas ao seu uso, sendo uma das principais o elevado estado de maturação (WENDLING *et al.*, 2013; STUEPP *et al.*, 2017a, 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018). A maturidade cronológica de plantas

lenhosas faz com que estas percam gradativamente sua totipotência celular, principalmente nas regiões mais apicais, muitas vezes impedido que propágulos enraízem eficientemente quando coletados destas regiões (WENDLING *et al.*, 2013; 2014b).

Entretanto, na porção basal de plantas lenhosas podem existir gemas dormentes com características de elevado vigor, consideradas ontogeneticamente mais jovens, uma vez que seu desenvolvimento ocorreu próximo aos períodos de pós-germinação (HARTMANN *et al.*, 2011). Existem diversas técnicas que objetivam a obtenção destas brotações oriundas de gemas juvenis, mas com resultados que podem variar entre si (XAVIER *et al.*, 2013). As técnicas mais utilizadas para *I. paraguariensis* são os anelamentos, que podem ocorrer em diferentes proporções e alturas do caule (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2018), e pela própria brotação a partir da decepa da planta (WENDLING *et al.*, 2014a; STUEPP *et al.*, 2015; 2016). Porém, é possível que danos drásticos causados ao caule venham a ocasionar a morte da planta mãe, tal como a própria decepa, ocorrendo a perda de um possível genótipo de interesse, além da não garantia de uma produção suficiente de brotações epicórmicas para o resgate.

Em contrapartida, podem ser coletados galhos destacados da planta de interesse, sendo estes armazenados em ambiente propício para a produção de brotações epicórmicas, podendo ser utilizadas para quaisquer meios de propagação vegetativa (ROSA *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007; WENDLING *et al.*, 2009; WENDLING *et al.*, 2013; MENEGUZZI, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2018). É uma técnica em que os danos a planta mãe podem ser muito minimizados, havendo facilidade no preparo, manejo e coleta das brotações produzidas (WENDLING e BRONDANI, 2015). São galhos fisiologicamente ativos, com capacidade de produção de brotos epicórmicos (HARTMANN *et al.*, 2011), mas o vigor destes sendo diretamente dependente da altura em que houve a coleta do galho em si, pois estes são dependentes do fator ontogenético (XAVIER *et al.*, 2013).

Além disso, pode haver diferentes capacidades de produção e vida útil destes galhos em função do diâmetro e sentido de armazenamento (WENDLING *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2018), além da arquitetura genética da planta mãe (ROSA *et al.*, 2003) e também possivelmente de acordo com diferentes populações. Entretanto, estes aspectos não são juntamente abordados em experimentos de brotação de galhos destacados, visto que podem ser necessárias grandes quantidades de material para que haja uma avaliação correta dos resultados a serem obtidos. Assim, torna-se necessário uma avaliação da associação destas variáveis, elaborando experimentos capazes de determinar de forma precisa as reais capacidades de brotação de galhos de *I. paraguariensis*.

Atualmente, o resgate de brotações epicórmicas é essencial para uma efetiva propagação vegetativa de *I. paraguariensis*, podendo ser realizada por estaquia, sendo uma técnica de fácil execução. A estaquia em si é uma técnica que apresenta ser dependente de vários fatores que vão além da maturação da planta mãe, tais como a população de origem e os próprios genótipos utilizados (NASCIMENTO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Geneticamente, esta é uma espécie com maior variância genética entre indivíduos do que entre populações (SILVA, 2019; STEDILLE, 2020), podendo indicar diferentes capacidades de enraizamento dentro de uma mesma população.

Portanto, o resgate é uma atividade crucial para o melhoramento de *I. paraguariensis*, sendo necessário garantir a sobrevivência das plantas mãe utilizadas bem como a produção brotações epicórmicas de maior vigor. Desta forma, o objetivo deste capítulo foi avaliar a produção de brotações epicórmicas de galhos destacados de duas populações em função de seu diâmetro, e para uma população o seu diâmetro associado ao seu sentido de armazenamento. Por fim, testar o enraizamento de estacas oriundas de brotações epicórmicas dos galhos em relação a brotações da copa de uma população.

7.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para análise estatística da brotação epicórmica de galhos destacados, foi realizada análise de regressão das variáveis dependentes em todos os experimentos, sendo: sobrevivência (%); galhos com brotações epicórmicas (%), número de brotações e comprimento de brotações (cm). Para tanto, foram utilizados os modelos lineares ou quadráticos, ajustados em função do valor de R^2 ajustado:

$$\text{Linear: } Y = \beta_1 x + \beta_0 + e$$

$$\text{Quadrática: } Y = \beta_2 x^2 + \beta_1 x + \beta_0 + e$$

Em que: Y – variável dependente; β_0 , β_1 e β_2 – variáveis independentes; x – nível das variáveis independentes, e; e – erro.

7.4.1 Brotação epicórmica de galhos destacados de duas populações de acordo com seu diâmetro

Pelos mesmos motivos explanados no capítulo III, para elaboração deste experimento foram utilizados somente galhos destacados das populações de Três Barras (TB) e Urupema (UR), oriundos do verão de 2020. Foram utilizados os mesmos procedimentos presentes nas metodologias comuns para os galhos, sendo estes avaliados a cada sete dias em função de seu diâmetro (finos – entre 10 e 20 mm; grossos – maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm; descritos no item 3.2.3 deste trabalho).

Este experimento de brotação epicórmica de galhos destacados foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Esta análise foi composta de oito observações, considerando as variáveis independentes de: população (TB e UR), diâmetro (finos e grossos), e diâmetro dentro de população. Foram utilizados 16 galhos para cada diâmetro dentro de cada população, compondo quatro repetições de quatro galhos cada.

7.4.2 Brotação epicórmica de galhos destacados de acordo com seu diâmetro e sentido de armazenamento

Assim como o item anterior, os galhos destacados utilizados neste experimento foram provenientes do verão de 2020, mas utilizando somente a população de TB, visto uma quantidade remanescente de material vegetal. Este experimento seguiu mesmo procedimento das metodologias comuns, considerando os galhos quanto ao seu diâmetro (finos e grossos) e no seu sentido de armazenamento (vertical e horizontal). A avaliação das brotações epicórmicas produzidas ocorreu a cada 15 dias.

Este experimento de brotação epicórmica de galhos destacados foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Esta análise foi composta de sete observações, considerando as variáveis independentes de: o sentido de armazenamento dos galhos (vertical e horizontal), o diâmetro (finos e grossos), e o diâmetro dentro de cada sentido. Foram utilizados 9 galhos para cada diâmetro dentro de cada sentido, compondo três repetições de três galhos cada.

7.4.3 Estaquia de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados

Para montagem deste experimento, foram utilizadas brotações epicórmicas produzidas pelos galhos destacados, oriundos do primeiro experimento de brotação de galhos em função do diâmetro (Ga2 – experimento não apresentado neste trabalho, Figura 3), e brotações de copa do verão de 2020, mesma origem do capítulo III. Entretanto, devido a quantidade de brotações dos galhos ser insuficiente para a população de UR, foram utilizados somente material da população de TB.

O material foi armazenado nos ambientes de enraizamento I (estufim do Viveiro Florestal da UDESC) e II (CNVI – casa de vegetação com nebulização intermitente de uma empresa florestal da região, situada em Otacílio Costa, SC), permanecendo por 90 dias logo após sua coleta em cada um destes, seguido de avaliação final. As estacas foram postas para enraizar em tubetes (110 cm³) utilizando o substrato II. O substrato era composto de uma mistura de turfa, vermiculita, resíduo orgânico classe “A” e calcário (densidade: 130 kg m⁻³).

Este experimento de estaquia foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), avaliando as duas origens das brotações (da copa e epicórmica). Para tanto, foram utilizadas oito repetições de 12 estacas para cada tratamento.

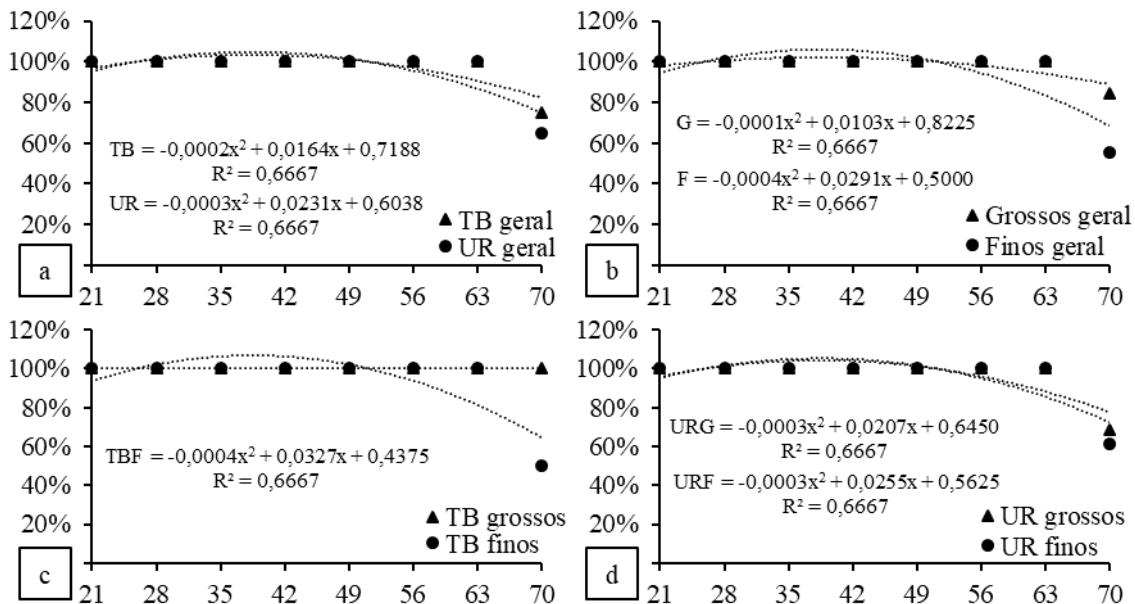
7.5 RESULTADOS

7.5.1 Brotção epicórmica de galhos destacados de duas populações de acordo com seu diâmetro

Para os períodos avaliados, a sobrevivência dos galhos destacados (Figura 9) variou pouco em relação às populações e diâmetros. Esta porcentagem variou semelhantemente entre as duas populações, em que a mortalidade dos galhos apenas foi presente para a avaliação final, permanecendo entre 60% e 75%. Apenas a população de Três Barras (TB) apresentou maior diferença entre galhos grossos e finos, ocorrendo apenas na avaliação de 70 dias.

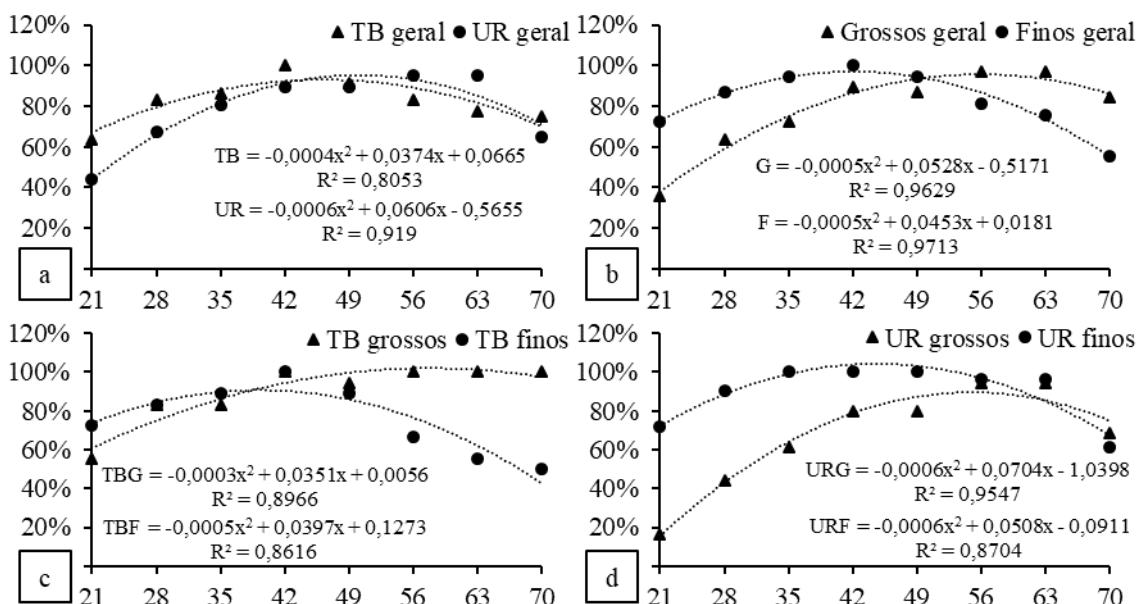
A presença de brotações epicórmicas dos galhos variou em função do diâmetro e deste dentro das populações, mas com desenvolvimento semelhante entre as populações (Figuras 10 e 11). Urupema (UR) apresentou uma brotação inicial mais lenta (44,4%) do que TB (63,9%). Entretanto, a brotação aumentou em função dos dias, com destaque para os galhos grossos de TB, apresentando seu máximo após 56 dias (100%), e para os galhos finos de UR, com seu máximo logo aos 35 dias (100%).

Figura 9 — Sobrevida (%) de galhos destacados de duas populações de *I. paraguariensis* (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d)



Eixo Y: sobrevida (%); Eixo X: avaliações (dias); Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 10 — Brotação (%) de galhos destacados de duas populações de *I. paraguariensis* (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d)



Eixo Y: brotação (%); Eixo X: avaliações (dias); Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

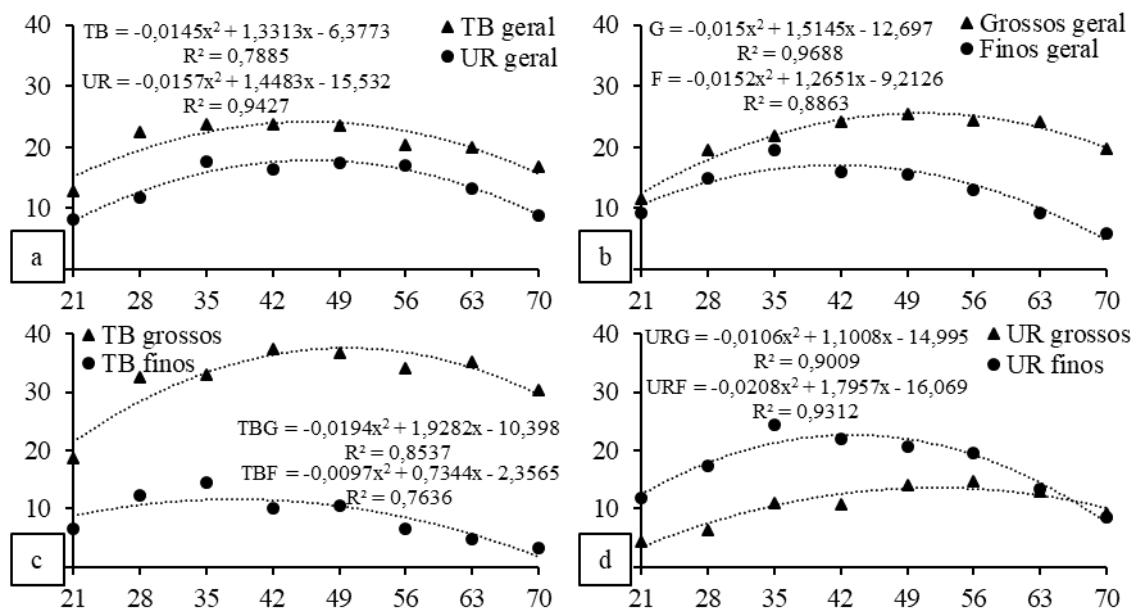
Figura 11 — Início da brotação de galhos destacados grossos de *I. paraguriensis* da população de TB



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O número de brotações variou em cada uma das relações testadas (Figura 12). Entre as populações, TB apresentou cerca de dez brotações a mais de forma constante em relação a UR. Os galhos grossos de TB brotaram mais em relação aos finos em todas avaliações, com média máxima próxima a 40 brotos aos 42 dias. Entretanto, UR apresentou o inverso, em que os finos apresentaram maior número de brotos, com cerca de 24 aos 35 dias.

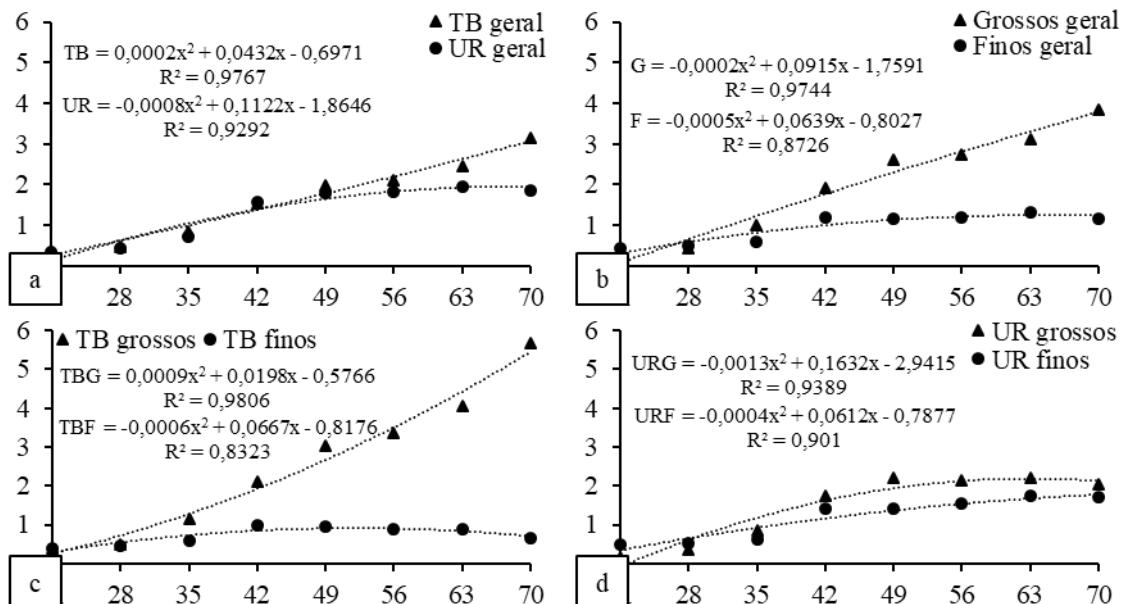
Figura 12 — Número de brotações de galhos destacados de duas populações de *I. paraguriensis* (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d)



Eixo Y: número de brotações; Eixo X: avaliações (dias); Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O comprimento das brotações produzidas variou principalmente entre os diâmetros e em função da população de TB, mas pouco entre populações e a população de UR (Figura 13). Considerando as duas populações, o desenvolvimento foi similar até os 49 dias (1,6 cm), sendo que após este período houve uma estabilização no comprimento de UR até a avaliação final (2,0 cm), enquanto TB permaneceu a desenvolver suas brotações, atingindo seu valor máximo na avaliação final (3,2 cm). Isto é facilmente visualizado para os galhos grossos de TB, em que sua superioridade aos galhos finos ocorreu a partir dos 35 dias, com média máxima aos 70 dias (5,7 cm).

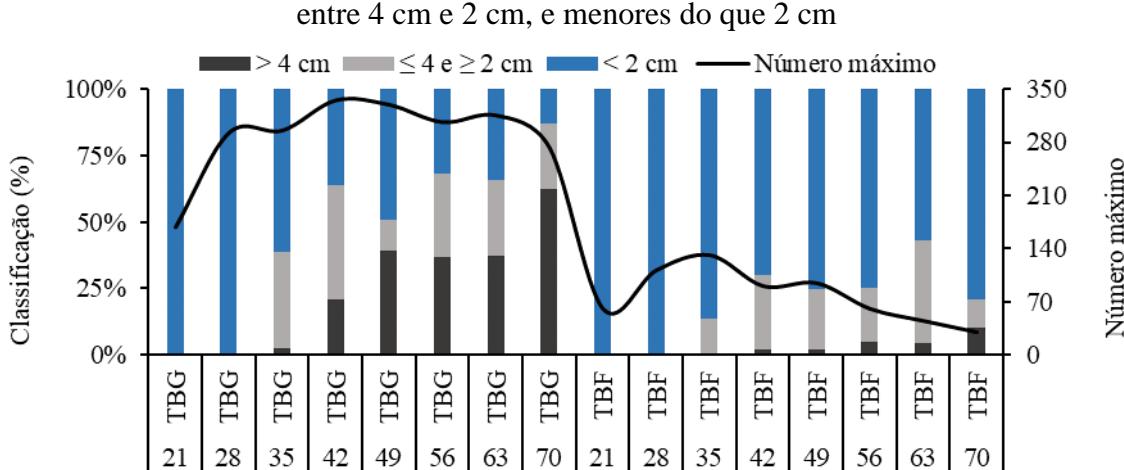
Figura 13 — Comprimento de brotações (cm) de galhos destacados de duas populações de *I. paraguariensis* (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para a população de TB (c) e dois diâmetros para a população de UR (d)



Eixo Y: comprimento de brotações (cm); Eixo X: avaliações (dias); Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Em relação à classificação das brotações epicórmicas produzidas pelos galhos, foram observadas consideráveis diferenças entre os diâmetros e populações. Para TB (Figura 14), a quantidade de brotos observadas foi semelhante para os galhos grossos entre os 28 dias e 70 dias (entre 296 e 330), com a presença de brotações maiores do que 4 cm aos 35 dias (2,7%), e seu valor máximo ocorrendo ainda na última avaliação (62,7%). Para os galhos finos houve uma diminuição gradativa no número de brotações após os 35 dias (131) a até os 70 dias (29), mas estas remanescentes continuaram a desenvolver, com aproximadamente três brotações (10,7%) maiores do que 4 cm para este mesmo período.

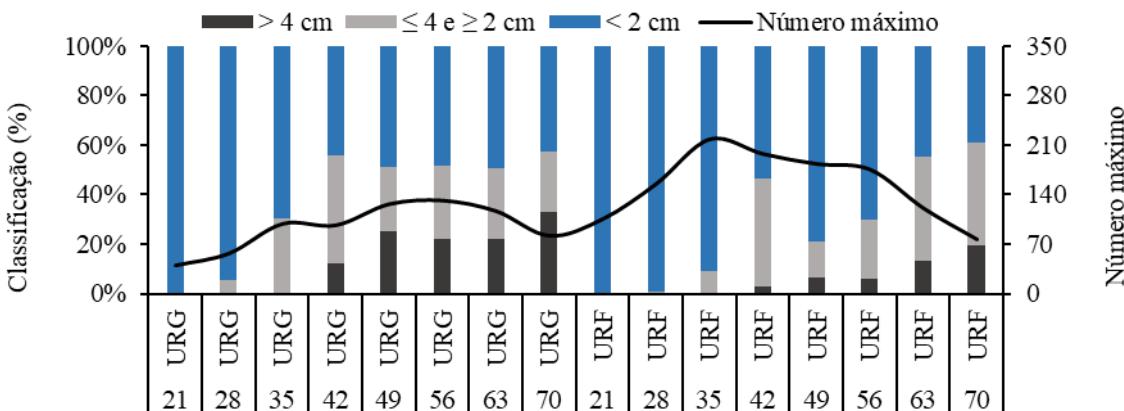
Figura 14 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de *I. paraguaryensis* da população de TB de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm



Eixo X: avaliações (dias); Sendo: TB – Três Barras; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para a população de UR (Figura 15), o máximo de brotações produzidas foi menor (219) e ocorrendo para os galhos finos aos 35 dias. De forma geral, os galhos finos desta população apresentaram cerca do dobro de brotos em relação aos grossos. Sobre a classificação, os resultados foram próximos entre os diâmetros, mas em que os galhos grossos obtiveram maiores quantidades de brotos maiores do que 4 cm logo após os 42 dias (12,4%). Para os galhos finos, estes apresentaram brotos nesta mesma classificação somente aos 42 dias (3,0%).

Figura 15 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de *I. paraguaryensis* da população de UR de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm

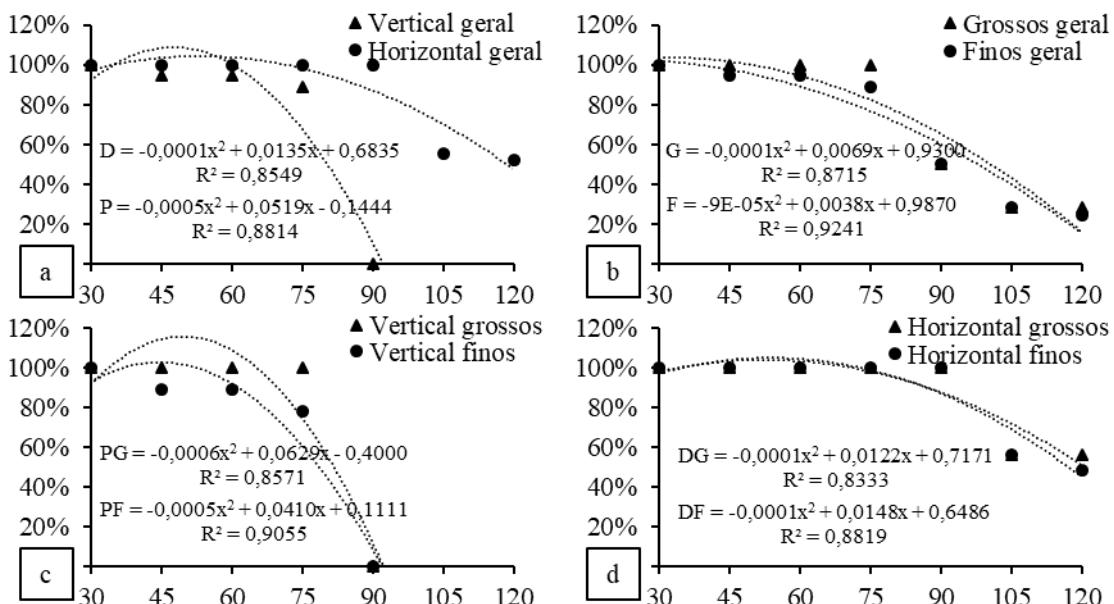


Eixo X: avaliações (dias); Sendo: UR – Urupema; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

7.5.2 Brotação epicórmica de galhos destacados de acordo com seu diâmetro e sentido de armazenamento

A sobrevivência dos galhos destacados variou de acordo com o sentido utilizado, mas pouco em função do diâmetro (Figura 16). Para o sentido, a porcentagem de sobrevivência dos verticais foi menor em ao menos 30 dias em relação aos horizontais, estes que apresentaram galhos vivos ainda durante os 120 dias. Isto se repetiu para as demais avaliações.

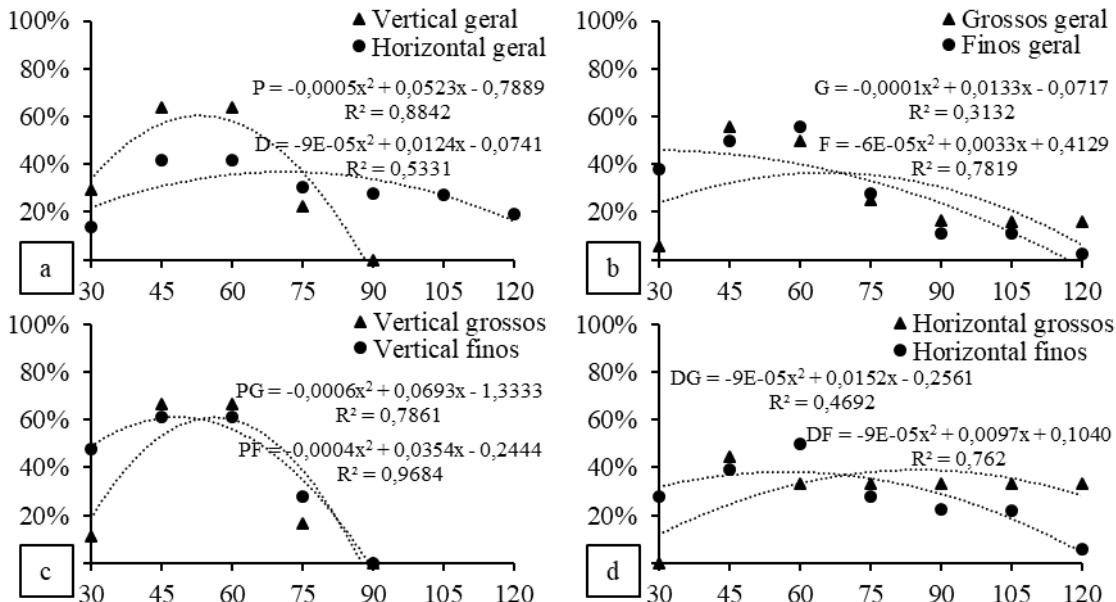
Figura 16 — Sobrevivência (%) de galhos destacados de *I. paraguariensis* de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d)



Eixo Y: sobrevivência (%); Eixo X: avaliações (dias); Sendo: D – galhos dispostos horizontalmente; P – galhos dispostos verticalmente; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Embora a sobrevivência tenha sido relativamente semelhante dentro dos diâmetros, isto não ocorreu de mesma forma para a presença de brotações epicórmicas (Figura 17). De forma geral, os galhos mantidos verticalmente apresentaram maior brotação (63,9%), mas por um menor período de tempo em relação aos horizontais, os quais apresentaram sua maior brotação entre os 45 dias e 60 dias (41,7%), mas que se mantiveram com brotações presentes até a avaliação final (19,4%). De maneira semelhante entre os sentidos, os galhos finos apresentaram uma brotação inicial mais rápida, mas sendo ultrapassados pelos galhos grossos no decorrer das avaliações.

Figura 17 — Brotação (%) de galhos destacados de *I. paraguariensis* de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d)

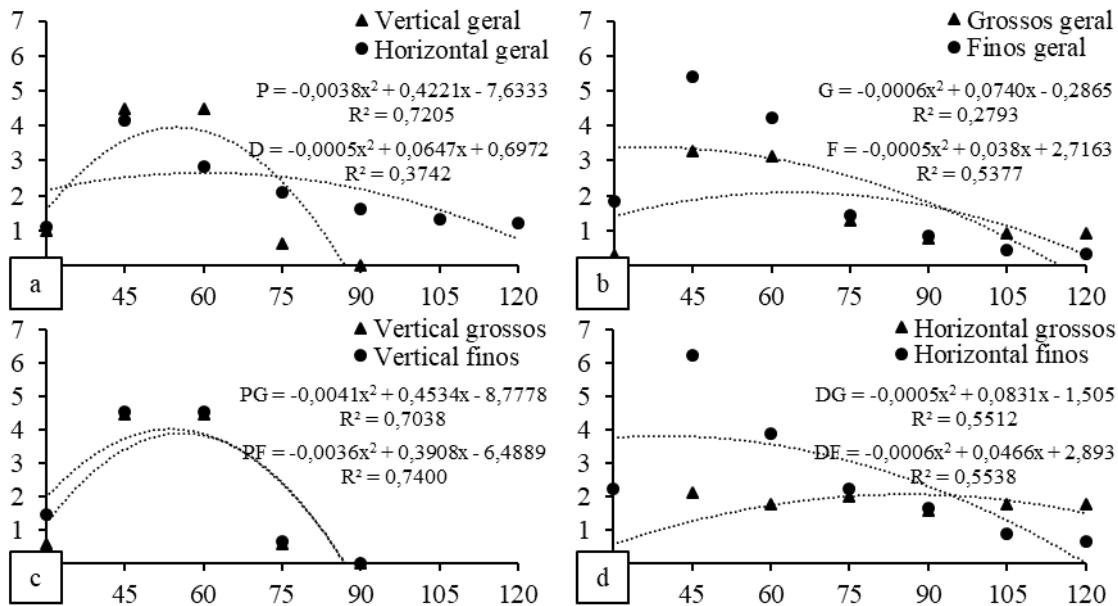


Eixo Y: brotação (%); Eixo X: avaliações (dias); Sendo: D – galhos dispostos horizontalmente; P – galhos dispostos verticalmente; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O número de brotos produzidos variou em relação ao sentido de armazenamento e os diâmetros, mas pouco para os galhos mantidos verticalmente (Figura 18). Entre os dois sentidos, a maior produtividade de brotações ocorreu para os galhos verticais, com seu número máximo ocorrendo entre os 45 dias e 60 dias (ambos 4,5), sendo próximo em relação aos galhos horizontais aos 45 dias (4,2), os quais se mantiveram produtivos até os 120 dias (1,2). Para os galhos verticais, os resultados seguiram tendências semelhantes para ambos os diâmetros, com média próxima a 5 brotações entre os 45 e 60 dias. Já para os galhos mantidos horizontalmente, os finos apresentaram aproximadamente 4 brotos a mais do que os grossos logo aos 45 dias, mas decaindo em seguida.

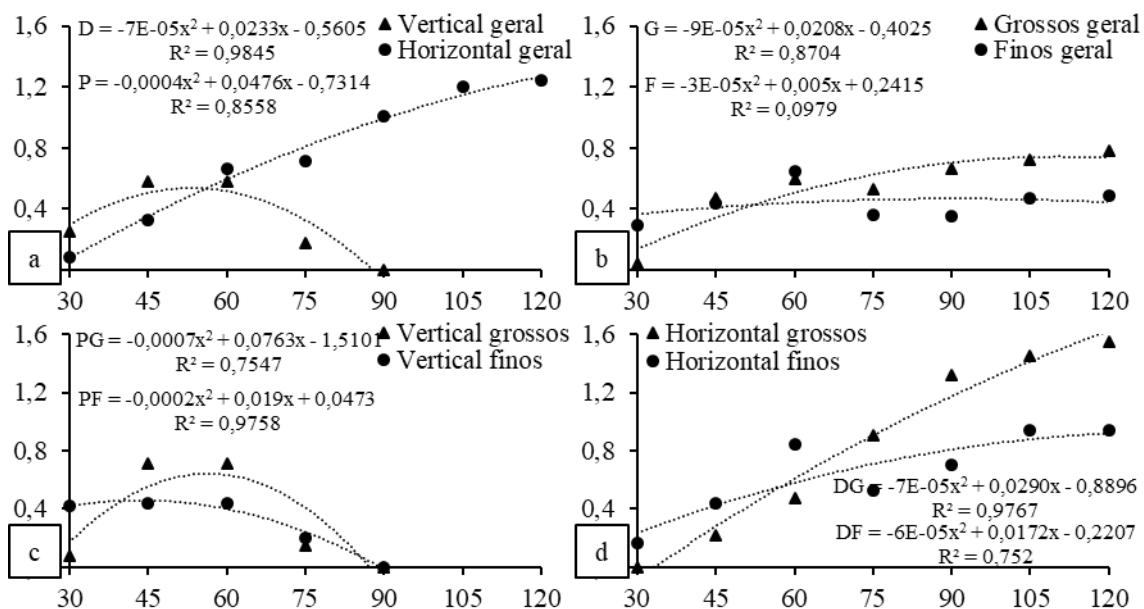
Quanto ao comprimento de brotações, os resultados observados foram muito diferentes entre as categorias analisadas (Figura 19). De forma geral, os galhos armazenados verticalmente foram muito inferiores em comprimento de brotações, mas sendo maiores entre os 30 dias (0,3 cm) e 45 dias (0,6 cm), enquanto os galhos mantidos horizontalmente apresentaram menores comprimentos inicialmente, mas sendo maiores na avaliação final (1,2 cm). Isto está melhor evidenciado para os galhos horizontais, principalmente os grossos, que mesmo apresentando brotações de curto comprimento de forma inicial, estes atingiram até 1,6 cm de médias aos 120 dias.

Figura 18 — Número de brotações de galhos destacados de *I. paraguariensis* de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d)



Eixo Y: número de brotações; Eixo X: avaliações (dias); Sendo: D – galhos dispostos horizontalmente; P – galhos dispostos verticalmente; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

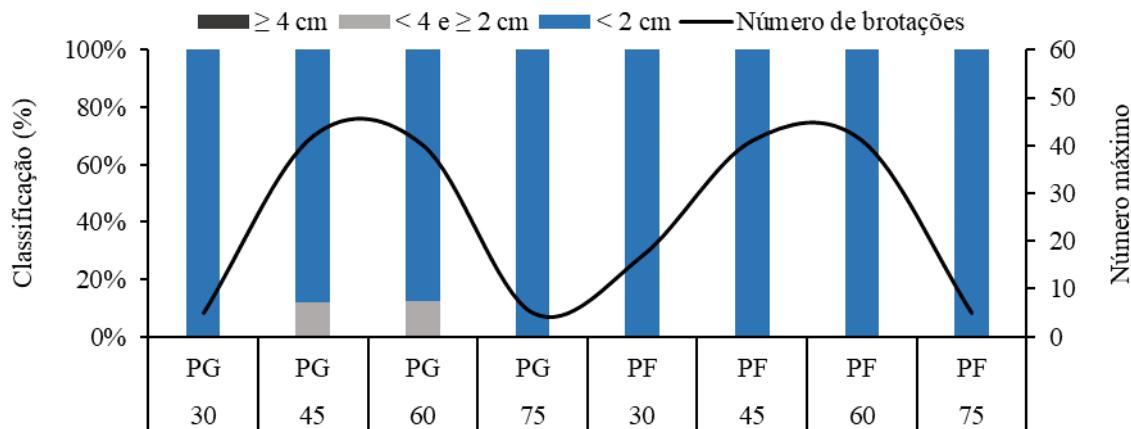
Figura 19 — Comprimento de brotações (cm) de galhos destacados de *I. paraguariensis* de acordo com o sentido de armazenamento (a), dois diâmetros (b), dois diâmetros para galhos mantidos verticalmente (c) e dois diâmetros para galhos mantidos horizontalmente (d)



Eixo Y: comprimento de brotações (cm); Eixo X: avaliações (dias); Sendo: D – galhos dispostos horizontalmente; P – galhos dispostos verticalmente; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

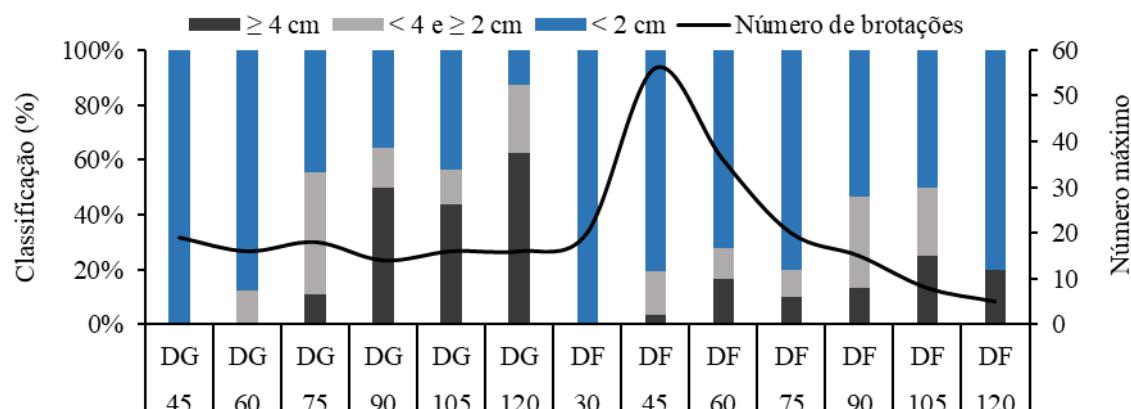
Os galhos armazenados verticalmente (Figura 20) apresentaram classificações inferiores em relação aos galhos mantidos horizontalmente (Figura 21). O número máximo de brotações produzidas foi semelhante entre os diâmetros dos galhos mantidos verticalmente (entre 40 e 41), mas somente os galhos grossos apresentaram porcentagens de brotos com comprimento entre 2 cm e 4 cm, nas avaliações de 45 dias (11,9%) e 60 dias (12,5%).

Figura 20 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de *I. paraguariensis* mantidos verticalmente de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm



Eixo X: avaliações (dias); Sendo: D – galhos dispostos horizontalmente; P – galhos dispostos verticalmente; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 21 — Classificação das brotações epicórmicas de galhos destacados de *I. paraguariensis* mantidos horizontalmente de acordo com seu diâmetro em maiores do que 4 cm, entre 4 cm e 2 cm, e menores do que 2 cm



Eixo X: avaliações (dias); Sendo: D – galhos dispostos horizontalmente; P – galhos dispostos verticalmente; G – galhos grossos (maiores do que 20 mm a um máximo de 60 mm); F – galhos finos (entre 10 e 20 mm). Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Levando em consideração os galhos mantidos horizontalmente, o número máximo de brotações ocorreu aos 45 dias para os galhos finos (56) com sua redução gradual, enquanto os galhos grossos mantiveram um número médio de brotações (16,5 – entre 14 e 19) no decorrer das avaliações. Entretanto, os galhos finos apresentaram brotações de tamanho maior do que 4 cm logo aos 45 dias (3,6%), aumentando e diminuindo consecutivamente, mas chegando a 20% na avaliação final. Embora as primeiras brotações de tamanho igual ou maior do que 4 cm tenham sido detectadas mais tarde para os galhos grossos, estas já obtinham valores maiores do que 10% aos 60 dias (11,1%).

7.5.3 Estaquia de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados

Das variáveis analisadas, a sobrevivência, formação de calos e novas brotações foram significativas, todas com AE% considerada muito alta (> 90%) (ANEXO H). Entretanto, as variáveis de enraizamento, número de raízes e permanência das folhas originais não foram significativas.

Considerando as variáveis significativas, a sobrevivência variou em função da origem. O material da copa apresentou aproximadamente uma vez e meia mais estacas sobreviventes (72,9%) do que as epicórmicas produzidas por galhos destacados (45,8%) (Tabela 20).

Tabela 20 — Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%), enraizamento (%), número de raízes, brotação (%) e permanência das folhas originais (%) de estacas de brotações de copa de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados de *I. paraguariensis*

Origem	Sobrevivência (CV% = 7,0)	Calos (CV% = 18,9)	Enraizamento (CV% = 47,4)	Nº de raízes (CV% = 94,6)	Brotão (CV% = 51,6)	Folha original (CV% = 35,0)
	%		Qt.		%	
Copa	72,9 a*	65,6 a	36,5	1,8	38,5 a	58,3
Epic.	45,8 b	11,5 b	34,4	1,4	9,4 b	42,7
Média	59,4	38,5	35,4	1,6	24,0	50,5

Médias seguidas de mesmas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Entretanto, o material de copa apresentou calos quase em sua totalidade de estacas vivas (65,6%), com uma diferença inferior a 10%. Já o material epicórmico apresentou uma diferença maior do que 30% para esta relação (11,5%).

Para a presença de novas brotações, o material de copa apresentou aproximadamente 40% das estacas com sua presença, sendo esta a maior média (38,5%). Neste quesito, a fonte epicórmica apresentou até quatro vezes menos brotações (9,4%).

Para as variáveis não significativas, o enraizamento foi semelhante entre o material de copa (36,5%) e epicórmica (34,4%), com médias próximas a 35%. O mesmo ocorreu para o número médio de raízes (1,6) e a permanência da folha original (50,5%).

7.6 DISCUSSÃO

7.6.1 Brotação epicórmica de galhos destacados

A sobrevivência dos galhos seguiu um padrão esperado para a espécie, sendo a principal resposta atrelada ao sentido de armazenamento e pouco relacionado a população de origem e o diâmetro. Em trabalho semelhante com *I. paraguariensis*, Wendling *et al.* (2013) observaram que após cerca de 70 dias do estabelecimento dos galhos na posição vertical no novo ambiente, estes deixaram de produzir brotações de forma eficiente. O mesmo foi observado para os galhos deste trabalho armazenados neste mesmo sentido, ocorrendo uma diminuição seguida de uma oxidação das brotações ainda presentes entre 50 e 60 dias. Isto pode ter ocorrido em função do esgotamento das reservas energéticas dos galhos, associado ao ambiente de armazenamento, o qual apresenta temperaturas e umidades altas, acelerando este processo (XAVIER *et al.*, 2013).

Entretanto, quando foram armazenados horizontalmente, sua vida útil foi prolongada, restando alguns indivíduos ainda fisiologicamente ativos após os 120 de avaliação. De acordo com Nascimento *et al.* (2018), os galhos de *I. paraguariensis* da população de Urupema (UR), quando dispostos horizontalmente, podem permanecer ativos por aproximadamente 300 dias, quando obtidos no final do inverno. Isto não foi detectado no presente trabalho para os galhos mantidos neste mesmo sentido, possivelmente em função das populações e épocas diferentes. No trabalho citado, foi utilizado material da população de UR, sendo uma região conhecida por ter baixas temperaturas ao longo do ano, possuindo espécie adaptadas para tanto, o que pode sugerir uma atividade fisiológica mais lenta em relação a população de Três Barras (TB). Ainda, para ambos os experimentos do presente trabalho, a coleta de material ocorreu durante a primavera e início do verão, ajudando a justificar estas diferenças de vida útil.

Em relação a brotação, todos os tratamentos apresentaram brotos de forma inicial lenta, mas ocorrendo em ao menos 80% dos galhos verticais para as duas populações avaliadas e 40% para a relação entre sentidos e diâmetros da população de TB. Mais evidentemente no primeiro

experimento, maiores diferenças foram obtidas entre os diâmetros de forma geral, em que os galhos finos apresentaram brotos mais rapidamente, com redução após as avaliações seguintes, ocorrendo o inverso para os galhos grossos. Ao se testar a técnica de anelamento completo em diferentes alturas em *I. paraguariensis*, Nascimento *et al.* (2019b) observaram que a maior altura favoreceu a brotação, ultrapassando 50%. É possível que isto tenha ocorrido em razão da disposição das gemas presentes, em que materiais obtidos em maiores alturas, podem possuir gemas mais próximas aos meristemas, facilitando o desenvolvimento destas (HARTMANN *et al.*, 2011; STUEPP *et al.*, 2016). Considerando que neste trabalho os galhos grossos foram normalmente obtidos de regiões mais próximas do critério mínimo estipulado para obtenção (1,3 m) e os finos de regiões mais apicais, é possível afirmar que esta relação seja verdadeira para ambos os experimentos em função dos diâmetros.

Levando em consideração o sentido de armazenamento dos galhos em um aspecto geral, a brotação foi mais rápida nos galhos mantidos verticalmente do que nos galhos mantidos horizontalmente. Em um trabalho semelhante elaborado por Nascimento *et al.* (2018), a brotação epicórmica de galhos destacados mantidos horizontalmente da população de UR foi de aproximadamente 45%, corroborando com os resultados obtidos para os galhos em mesmo sentido no presente trabalho. O *start* de desenvolvimento das gemas é dependente de um desbalanço entre hormônios, principalmente pelo acúmulo de citocininas (HARTMANN *et al.*, 2011). Todavia, ainda é necessário que ocorra um rearranjo no sentido e direção desta classe hormonal para que haja seu total funcionamento quando há alteração do sentido natural (TAIZ e ZEIGER, 2009). Desta forma, entende-se que os galhos armazenados verticalmente possuem uma facilidade no desenvolvimento das gemas dormentes, enquanto que para os horizontais é necessária uma movimentação das citocininas, podendo levar mais tempo para se desenvolver, auxiliando na justificativa dos resultados do presente trabalho.

O número de brotações produzidas foi significativo em todos os tratamentos avaliados. Primeiramente em função do primeiro experimento, as populações de TB e UR apresentaram curvas semelhantes, mas com números diferentes de forma proporcional, podendo novamente ser justificado pela sua origem, principalmente pela menor atividade fisiológica do material de UR. Entretanto, os galhos finos desta população foram muito superiores no número de brotos aos grossos e inclusive em comparação aos finos de TB. É possível que o desenvolvimento mais lento de *I. paraguariensis* em UR promova um maior acúmulo de gemas mesmo em galhos mais finos, tendo sua indução mais facilmente realizada. De acordo com experimento realizado por Wendling *et al.* (2013), com 50 dias de avaliação, os galhos destacados desta espécie podem produzir mais de 10 brotações. Os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes

em proporção ao trabalho citado, mas foram mais representativos, possivelmente devido a maior quantidade de galhos utilizados como repetições, podendo chegar a quase 40 aos 42 dias.

Para o sentido de armazenamento dos galhos, uma resposta semelhante pode ser constatada em relação ao diâmetro. Quando armazenados horizontalmente, os galhos grossos produziram brotações mais lentamente, enquanto os finos apresentaram valores máximos logo aos 45 dias. De acordo com Nascimento *et al.* (2018), os galhos de menor diâmetro produzem mais brotos em média do que os de maior diâmetro de maneira contínua em todas as avaliações realizadas, quando armazenados de forma horizontal. Isto não foi observado neste trabalho, em que os galhos finos produziram uma maior quantidade de brotos mais rapidamente, mas que igualmente diminuiu logo após este aumento.

O comprimento das brotações em ambos os experimentos realizados variou em todos os tratamentos. Avaliando populações e diâmetros no primeiro experimento, é possível observar que houve uma variação entre os galhos grossos e finos em função do tempo, principalmente para a população de TB, enquanto o mesmo não foi detectado para UR. Além do efeito de origem, é possível que os galhos de TB também tenham apresentado maiores reservas, o que possibilitou um desenvolvimento contínuo de suas brotações. Quando armazenados em sentido vertical, Wendling *et al.* (2013) observaram apenas brotos menores do que 4 cm entre 30 e 38 dias, em que tamanhos maiores foram detectados somente após 50. No presente trabalho, estes dados foram semelhantes para a população de TB, mas mais tarde, uma vez que somente entre 55 e 63 dias que estas brotações apresentaram médias parecidas ou maiores do que 4 cm. Em proporções menores, o mesmo foi observado para o segundo experimento, em que os galhos grossos mantidos horizontalmente apresentaram uma continuidade no desenvolvimento das brotações mesmo após a avaliação de 120 dias.

A partir da classificação das brotações em função de seu comprimento e número máximo, é possível observar os dados de maneira mais eficiente. Para o primeiro experimento, destaca-se os galhos grossos de TB, os quais mantiveram um grande número de brotações continuando a se desenvolver até a avaliação final. O mesmo ocorreu de forma semelhante para os galhos grossos de UR, mas em proporção e número máximo muito menores, enquanto os galhos finos de ambas as populações apresentaram uma redução no seu número máximo, mas ainda foram capazes de manter brotações se desenvolvendo. Wendling *et al.* (2013) observaram que as brotações passaram a possuir tamanhos maiores do que 4 cm após 50 dias de avaliação, sendo a partir de então disponíveis para a estação. Esta constatação confirma com os dados obtidos neste trabalho, principalmente com os galhos grossos de TB, os quais apresentaram

grande produtividade de brotações (273) maiores do que 4 cm (62,7%) aos 70 dias, sendo capazes de fornecer uma grande quantidade de material para propagação vegetativa.

Uma relação próxima à anterior foi obtida para o segundo experimento, principalmente para os galhos mantidos horizontalmente, em que para os grossos houve um menor número máximo, mas que ao final das avaliações contemplavam mais do que 60% das brotações maiores do que 4 cm, enquanto os finos obtiveram um elevado número inicial de brotações, mas seguida de drástica redução em função do tempo. Nascimento *et al.* (2018) afirmam que galhos destacados da população de UR não são eficientes no desenvolvimento destas em comprimento, mesmo obtendo grandes quantidades. De acordo com os autores do trabalho citado, a brotação de galhos apresentou tamanhos variando entre 0,5 cm e 0,9 cm em diferentes avaliações, fazendo com que este material não possua uma utilidade imediata, diferentemente do obtido no presente trabalho.

É importante destacar que os galhos foram coletados de diferentes indivíduos dentro de cada uma das populações, em que uma variação de resultados pode ter ocorrido em função de diferentes genótipos. Em *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm., Silva *et al.* (2021) observaram que o número de brotações dos galhos destacados variou em função da planta mãe, com resultados variando de cerca de 6 brotos a mais de 20. Entretanto, como foram utilizadas grandes quantidades de galhos de diversas plantas mãe, é provável que esta variação esteja mais relacionada ao formato do galho em si, principalmente para os grossos. Para estes, muito do material coletado era consideravelmente tortuoso e com presença de diversos nós, o que pode justificar uma maior quantidade de gemas dormentes.

De fato, trata-se de uma técnica de fácil aplicação e com resultados muito positivos para a obtenção de brotações epicórmicas (HARTMANN *et al.*, 2011), com um grande número de brotos produzidos em um curto espaço de tempo e de fácil obtenção para *I. paraguariensis*. Todavia, ainda podem ser estudadas a fundo em pesquisas futuras sua capacidade de produção de acordo com algumas características principais, tais como outras populações da espécie e seus genótipos, seu volume, grau de tortuosidade, época de coleta, altura de coleta na planta mãe, o sentido de armazenamento e as condições climáticas do ambiente de acondicionamento.

7.6.2 Estaquia de brotações epicórmicas obtidas de galhos destacados

A porcentagem de sobrevivência das estacas para o material de copa ultrapassou 70% enquanto para as brotações epicórmicas foi aproximadamente 25% menor, corroborando com dados de outros trabalhos com *I. paraguariensis* (STUEPP *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*,

2018, 2020). Stuepp *et al.* (2015, 2017b) afirmam que plantas mãe que passaram por alguma técnica de revigoramento apresentam uma maior porcentagem de sobrevivência de seus propágulos, uma vez que estes possuem maior vigor vegetativo. O contrário foi obtido para os resultados do presente trabalho, em que a sobrevivência foi menor para os propágulos de origem epicórmica.

Uma das possíveis causas desta menor sobrevivência talvez tenha sido a própria característica do material epicórmico, o qual muito deste aparentava ser pouco significado. Esta fragilidade talvez tenha ocorrido a partir da associação entre dois fatores, sendo o próprio galho destacado utilizado para produção das brotações epicórmicas e as condições climáticas do ambiente de acondicionamento. Os galhos, por terem sido destacados das plantas mãe e estarem ainda fisiologicamente ativos, obtiveram como função única o desenvolvimento de suas gemas como estratégia de sobrevivência, ocasionada pela maior concentração de citocininas após a degradação mais rápida das auxinas. O ambiente de acondicionamento possuía características de temperatura e umidade sempre ideais para o seu desenvolvimento (XAVIER *et al.*, 2013), fazendo com que estes brotos crescessem de forma acelerada e assim não sendo capazes de tolerar por muito tempo o desligamento com o galho de origem.

A calogênese nas estacas de origem epicórmica foi muito inferior em relação ao material de copa, algo que é esperado para um material com maior vigor (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2017a). Entretanto, o local de origem do material vegetal aparenta influenciar na formação de calos para os dois tipos de brotos, em que Nascimento *et al.* (2018) determinam que, embora de caráter revigorado, as estacas provenientes de brotações epicórmicas apresentaram valores estatisticamente iguais para os de copa. Isto não ocorreu para as estacas do presente trabalho, em que o material utilizado no trabalho citado teve origem na população de UR e foi originado de brotações epicórmicas oriundas das técnicas de anelamento e semi-anelamento. Desta forma, é necessário considerar que o ambiente em que os galhos foram acondicionados tenha favorecido este aspecto em relação ao material produzido no campo, sujeito às condições ambientais adversas, e um possível aumento da maturação.

A presença de calos é um fator importante a ser observado nas técnicas de propagação vegetativa, visto que sua presença é um indicativo da atividade de diferenciação celular, embora não ocorrendo de forma eficiente, mas indicando a possibilidade de o enraizamento acontecer (HARTMANN *et al.*, 2011). Considerando que os níveis de auxinas podem ser diferentes de acordo com as características do material vegetal utilizado (TAIZ e ZEIGER, 2009), é possível que este hormônio não tenha sido presente em quantidades suficientes para determinar o tipo de tecido a ser produzido, neste caso, as raízes. Ainda, por estar diretamente relacionado ao

vigor da planta, a presença deste tecido indeterminado pode demonstrar um elevado grau de maturidade (WENDLING *et al.*, 2014b).

Embora o enraizamento não tenha obtido diferença estatística entre os tratamentos, é possível que as estacas de material epicórmico viessem a ser superiores, caso a sobrevivência fosse mais elevada. As estacas de brotos epicórmicos apresentaram ao menos 25% mais estacas enraizadas do que as originadas de material de copa ao se considerar apenas o material ainda vivo. Em *I. paraguariensis*, a formação de raízes ocorre de forma direta, ou seja, o enraizamento é dificultado quando há a presença de calos (TARRAGÓ *et al.*, 2005), mas ainda possível (STUEPP *et al.*, 2017b), o que foi facilmente observado com os resultados deste trabalho. Nascimento *et al.* (2018) destacam que estacas originadas de brotações de copa apresentam enraizamento abaixo de 30%, enquanto o material revigorado pode chegar a quase 40%, com porcentagens de sobrevivência semelhantes. Porém, de acordo com Nascimento *et al.* (2020), estes resultados são afetados pelo ambiente de enraizamento tal como o genótipo utilizado, em que o próprio material de copa pode atingir 50% de enraizamento. Embora os resultados deste trabalho corroborem com os citados, demonstrando que a formação de raízes é possível mesmo fazendo uso de material não revigorado, este é melhorado a partir de brotações epicórmicas, podendo ser aprimorados se mantidos em ambientes sob melhores condições de enraizamento.

7.7 CONCLUSÃO

A brotação epicórmica de galhos destacados de *I. paraguariensis* se mostrou influenciada por todos os fatores analisados, com as respostas sendo mais dependentes das populações estudadas.

Quanto ao sentido de armazenamento, a maior brotação ocorreu para galhos destacados posicionados verticalmente, enquanto o maior tempo de brotação foi obtida para os galhos mantidos horizontalmente.

As brotações epicórmicas oriundas de galhos destacados se mostraram eficientes para o enraizamento de estacas desta espécie.

8 CAPÍTULO V – ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Ilex paraguariensis* SOB DIFERENTES FONTES DE ILUMINAÇÃO ARTIFICIAL

8.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar o estabelecimento *in vitro* de *I. paraguariensis* sob diferentes LEDs a partir de três experimentos específicos, sendo: I) estabelecimento *in vitro* de uma população (Três Barras – TB), utilizando material de copa; II) estabelecimento de duas populações (TB e Urupema – UR), utilizando de material de copa, e; estabelecimento de duas populações (TB e UR) a partir do uso de material epicórmico proveniente de galhos destacados. Em todos os experimentos foram utilizadas lâmpadas LED nas composições: LED branco (420 nm); LED vermelho (660 nm); LED azul (460 nm), e; mistura de 50% LED vermelho (660 nm) e 50% LED azul (460 nm). Após 15 dias foram avaliadas: oxidação (%), contaminação por bactérias (%) e contaminação por fungos (%). Independentemente dos experimentos ou tratamentos aplicados, a oxidação foi elevada, podendo chegar a 100% para a população de UR, enquanto TB apresentou porcentagens até 20% menores. A contaminação por bactérias variou entre 40% e 50% em todos os experimentos, com resultados podendo chegar a abaixo de 30% para a população de TB. Fungos foram presentes em todos os experimentos e em todas as amostras, com médias gerais sempre acima de 75% de contaminação. A elevada oxidação e a contaminação por fungos pode ser explicada pelo uso de material maduro, mesmo para as brotações epicórmicas, visto que estas levaram 150 dias para atingir tamanhos necessários. Todavia, a maior possibilidade destes resultados ocorreu em função da presença de contaminantes endógenos. Foi detectado um potencial de uso de LED azul e a mistura entre vermelho e azul na descontaminação bacteriana. Novos experimentos são necessários para determinar a real interação entre diferentes fontes luminosas e a estabelecimento *in vitro* de espécies arbóreas.

Palavras-chave: LED; Propagação vegetativa; Contaminação; Erva-mate.

8.2 ABSTRACT

The objective of this work was to test the *in vitro* establishment of *I. paraguariensis* under different LEDs from three specific experiments, being: I) *in vitro* establishment of a population (Três Barras – TB), using canopy material; II) establishment of two populations (TB and

Urupema – UR), using canopy material, and; establishment of two populations (TB and UR) using epicormic material from detached branches. In all experiments LED lamps were used in the following compositions: white LED (420 nm); red LED (660 nm); blue LED (460nm), and; mixture of 50% red LED (660 nm) and 50% blue LED (460 nm). After 15 days, the following were evaluated: oxidation (%), bacterial contamination (%) and fungal contamination (%). Regardless of the experiments or treatments applied, oxidation was high, reaching 100% for the UR population, while TB presented percentages up to 20% lower. Bacterial contamination varied between 40% and 50% in all experiments, with results reaching below 30% for the TB population. Fungi were present in all experiments and in all samples, with general averages always above 75% of contamination. The high oxidation and fungal contamination can be explained by the use of mature material, even for the epicormic sprouts, as they took 150 days to reach the required sizes. However, the greatest possibility of these results was due to the presence of endogenous contaminants. A potential use of blue LED and the mixture between red and blue in bacterial decontamination was detected. New experiments are needed to determine the real interaction between different light sources and the in vitro establishment of tree species.

Keywords: LED; Vegetative propagation; Contamination; Yerba-mate.

8.3 INTRODUÇÃO

A seleção natural trata-se de um processo evolutivo, permitindo que genótipos melhor adaptados transmitam suas características para gerações futuras. Esta seleção natural de materiais melhor adaptados, embora diminua a variabilidade em um aspecto amplo, pode ser ocasionada pela mutação ou pela migração, gerando nova variabilidade ou transmitindo genes importantes, tornando espécies melhor adaptadas a possíveis perturbações ambientais (PAULS *et al.*, 2013; SCHABERG *et al.*, 2013; KONZEN, 2014). Além disso, tratando-se de espécies nativas com importante vínculo comercial, tal como é para *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), estas adaptações podem resultar em materiais com características superiores, como incremento da produção de compostos secundários desejados (cafeína e teobromina) (WENDLING e BRONDANI, 2015).

Todavia, esta espécie, embora tendo suas folhas muito utilizadas como uma importante matéria-prima na elaboração de alimentos, medicamentos e cosméticos em nível mundial (CARDOZO JUNIOR e MORAND, 2016), tem apresentado sua produção ameaçada devido a

sua exploração excessiva e pela fragmentação de seu ambiente natural, principalmente no Sul do Brasil (ELIAS *et al.*, 2016), podendo afetar a ocorrência de plantas com características desejáveis.

A fim de garantir a manutenção destas plantas e da produtividade de ervais nativos ou comerciais, pode ser necessária a introdução de novos indivíduos que possuam estas mesmas características. Para tanto, podem ser utilizadas mudas produzidas a partir de sementes, as quais podem garantir uma maior variação genética, favorecendo a adaptação à futuras alterações ambientais. Porém, as sementes de *I. paraguariensis* são conhecidas por apresentar diversas dificuldades de germinação, como sementes vazias, predadas ou deterioradas por patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2020), associado a suas dormências física, fisiológica e morfológica, sendo esta última a mais difícil de superar, podendo levar semanas e até meses para sua germinação (GALÍNDEZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020). Como solução para estes problemas, podem ser utilizadas técnicas de propagação vegetativa, sendo selecionados somente genótipos com características de interesse, podendo ser utilizados para enriquecer ou até mesmo recompor áreas pouco produtivas (WENDLING e BRONDANI, 2015).

Entretanto, tal como a propagação pela via seminal, a propagação vegetativa desta espécie também apresenta desafios. Para a estaquia e miniestaquia, atualmente, o principal fator está baseado no grau de maturação da planta mãe (WENDLING *et al.*, 2014b; STUEPP *et al.*, 2017a; 2017b; NASCIMENTO *et al.*, 2018), em que há uma redução na capacidade de diferenciação e divisão celular em materiais com idades ontogenéticas elevadas, caracterizando uma diminuição na sua totipotência (HARTMANN *et al.*, 2011). De mesma forma, podem ocorrer diferenças na capacidade de enraizamento de acordo com os genótipos utilizados (PIMENTEL *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021) e suas diferentes populações, sendo a elevada variação no enraizamento algo corriqueiro nesta espécie. Desta forma, por possuir elevado interesse econômico e visando uma garantia na grande produção de indivíduos com características superiores, a técnica de micropopulação pode ser utilizada, em que há maior controle das variáveis que podem afetar o seu enraizamento (HARTMANN *et al.*, 2011).

Para rejuvenescer e propagar genótipos de interesse, a micropopulação é uma técnica ideal, sendo capaz de multiplicar em grandes quantidades os indivíduos selecionados em pequenos espaços laboratoriais, acelerando o melhoramento e produção de clones de espécies florestais, embora ainda não haja protocolos eficientes para *I. paraguariensis* (DUTRA e SILVA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Em contrapartida, esta técnica pode ser dependente de fatores semelhantes à estaquia e miniestaquia, como o grau de maturação das plantas mãe dos

propágulos (SANSBERRO *et al.*, 2000) e os diferentes genótipos utilizados (WENDLING e BRODNANI, 2015).

Mas, o principal fator que afeta o sucesso do estabelecimento *in vitro*, o qual é uma das etapas iniciais da micropropagação, são os tratamentos de descontaminação, comumente se demonstrando ineficientes ou ocasionado a oxidação dos propágulos (DUTRA *et al.*, 2008; DUTRA e SILVA, 2009; MENEGUZZI *et al.*, 2016). Ainda, não especificamente testada no gênero *Ilex*, o uso de lâmpadas LED de diferentes frequências luminosas aparenta ser positivo para a micropropagação de outras espécies de vegetais em questões de produtividade, tais como *Musa* spp. (FAÇANHA *et al.*, 2019), *Oncidium baueri* Lindl (CAMARGO *et al.*, 2015) e para híbridos como *Fragaria x ananassa* Duch. (ROCHA *et al.*, 2010), ocorrendo um melhor desenvolvimento vegetativo dos propágulos em relação a lâmpadas convencionais, como fluorescentes. Entretanto, não há estudos da utilização de LEDs para a descontaminação de explantes para a sua micropropagação.

Desta forma, o objetivo deste capítulo foi testar o estabelecimento *in vitro* de duas populações de *I. paraguariensis* sob diferentes comprimentos de ondas luminosas, utilizando lâmpadas LED, e diferentes condições de maturidade do material vegetal.

8.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Após as coletas do material vegetal e seu devido processamento em explantes (item 3.2.5), estes foram conduzidos para o Laboratório de Propagação e Melhoramento Florestal (LAPROMEF) da UDESC, como anteriormente citado nas metodologias comuns. A fonte do material vegetal utilizado consta em cada experimento.

Para descontaminação, o material foi primeiramente lavado em água corrente por cerca de cinco minutos, seguida de imersão em etanol (70%) por um minuto, sendo enxaguado com água destilada e autoclavada. Em seguida, o material foi submerso em solução contendo 2% de NaOCl por dez (item 8.4.1) ou quinze minutos (8.4.3), passando posteriormente por três enxágues com água destilada autoclavada.

Como recipientes para os propágulos foram utilizados frascos de vidro (150 ml) com 30 ml de meio de cultura e tubos de ensaio (70 ml) com 15 ml de meio de cultura, tendo suas extremidades seladas com papel alumínio. O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE e SCOOOG, 1962) (1/1), sendo preparado a partir de soluções estoque de macronutrientes, micronutrientes, Fe.EDTA e misturas orgânicas, com acréscimo de 2% de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,7, em metodologia descrita por Quisen e Angelo (2008). Após

a inserção do meio nos recipientes, estes foram autoclavados por aproximadamente 20 minutos a fim de eliminar quaisquer agentes contaminantes restantes.

Em seguida, os recipientes contendo os propágulos foram levados para sala de cultivo, a qual era mantida sob temperatura de 24 ± 1 °C e iluminação artificial por 16 horas. Neste ambiente foram utilizados quatro tipos de lâmpadas LED, caracterizando os tratamentos: Branca – 100% de lâmpada LED branco (420 nm); Vermelha – 100% lâmpada de LED vermelho (660 nm); Azul – 100% de LED azul (460 nm), e; Azul/Vermelha – 50% lâmpada LED vermelho (660 nm) e 50% LED azul (460 nm).

Após 15 dias no ambiente de cultivo, os propágulos foram avaliados quanto à: suas porcentagens de oxidação (%), contaminação bacteriana (%) e contaminação fúngica (%). Foram considerados propágulos oxidados aqueles que apresentassem quaisquer indícios de oxidação, principalmente a partir da alteração de sua coloração, de forma mais escura, em quaisquer proporções. A contaminação por bactérias foi considerada pela alteração na coloração do meio, a partir de uma cor marrom escura, ou a partir de forma chata e circular junto à superfície do meio. Para fungos, foram considerados meios contaminados aqueles que apresentassem quaisquer tipos de filamentos ou leveduras sobre o meio ou o propágulo.

A porcentagem de oxidação foi avaliada diferentemente de acordo com o recipiente utilizado. Para vidros, foram contados todos os propágulos com indícios de oxidação, não importando o nível de oxidação do próprio propágulo, formando uma porcentagem por vidro. Para tubos de ensaio foram considerados níveis, obtendo valores de 0 a 3 para cada propágulo, em que: 0 – sem quaisquer indícios de oxidação; 1 – oxidação em 1/3 do propágulo; 2 – oxidação em 2/3, e; 3 – propágulo completamente oxidado.

A contaminação por bactérias foi avaliada de mesma forma em ambos os recipientes utilizados. Para tanto, foram determinados níveis de contaminação, obtendo valores de 0 a 3 para cada recipiente, sendo: 0 – sem quaisquer indícios de contaminação; 1 – contaminação parcial do meio, principalmente por uma leve alteração de sua coloração; 2 – alteração da cor do meio de forma mais acentuada, normalmente em tom marrom escuro, e; 3 – meio completamente escurecido, tendendo a uma coloração preta.

A contaminação por fungos foi avaliada de maneira diferente entre os recipientes. Para os frascos, foi considerada a área em que o meio foi afetado, obtendo valores de 0 a 3, em que: 0 – sem quaisquer indícios de contaminação; 1 – até 1/3 do meio contaminado, afetando os propágulos ou não; 2 – 2/3 do meio contaminado, e; 3 – meio completamente contaminado. Para os tubos de ensaio, foi considerado a contaminação do meio e do propágulo, também obtendo valores de 0 a 3, sendo: 0 – sem quaisquer indícios de contaminação; 1 – meio

contaminado, mas sem afetar o propágulo; 2 – meio contaminado com afetando parcialmente o propágulo, e; 3 – meio e propágulo completamente contaminados.

8.4.1 Estabelecimento *in vitro* de uma população sob diferentes lâmpadas LED

O material deste experimento foi obtido em setembro de 2020, sendo o mesmo material utilizado para esta época nos experimentos do capítulo III (item 6.4.1), mas utilizando somente a população de Urupema (UR), visto uma maior disponibilidade do material vegetal, com imersão em NaOCl por dez minutos. Este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando somente material proveniente da população de UR, sendo utilizados ao todo sete vidros contendo três propágulos para cada tratamento de lâmpada LED.

8.4.2 Estabelecimento *in vitro* de duas populações sob diferentes lâmpadas LED

Semelhantemente, o material deste experimento foi obtido em julho de 2021, sendo o mesmo material utilizado para esta época nos experimentos do capítulo III (item 6.4.1), utilizando ambas as populações, sendo os propágulos imersos em NaOCl por dez minutos. Este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2, sendo o fator “A” as quatro lâmpadas e o fator “B” as duas populações. Foram utilizadas cinco repetições de quatro tubos de ensaio contendo um propágulo para cada tratamento de lâmpada LED e população (Três Barras – TB; e UR).

8.4.3 Estabelecimento *in vitro* de duas populações sob diferentes lâmpadas LED a partir de brotações epicórmicas de galhos destacados

Para a produção das brotações epicórmicas, galhos destacados foram coletados em julho de 2021 nas populações de TB e UR, sendo mantidos na posição vertical, sob mesmas etapas descritas nas metodologias comuns. Aproximadamente cinco meses após a coleta e o estabelecimento dos galhos (novembro de 2021), suas brotações foram tratadas com fungicida (difenoconazol – 1,67%) por duas semanas em que a solução diluída (10 ml de produto para 1 L de água) foi borrifada diariamente sobre as brotações, ao menos uma hora antes de ocorrer a irrigação. Após este período, as brotações foram coletadas com tesoura de poda e seccionadas em explantes, sendo levadas ao LAPROMEF para descontaminação e estabelecimento *in vitro*.

Excepcionalmente para este experimento, o tempo de utilização de NaOCl para desinfecção foi prolongado, passando de dez minutos para 15 minutos.

Este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2, sendo o fator “A” as quatro lâmpadas e o fator “B” as duas populações. Para tanto, foram utilizados ao todo oito frascos de vidros contendo cinco propágulos para cada população em cada tratamento.

8.5 RESULTADOS

8.5.1 Estabelecimento *in vitro* de uma população sob diferentes lâmpadas LED

Houve interação significativa para as porcentagens de oxidação e presença de fungos de acordo com os tratamentos, ambas com AE% consideradas altas (entre 70% e 90%) (ANEXO I). Somente a presença de bactérias não apresentou ser significativa.

As porcentagens de oxidação variaram de acordo com o tipo de lâmpada utilizada, mas apresentaram média geral acima de 70% (73,6%) (Tabela 21). As menores porcentagens foram observadas para a lâmpada azul (56,9%) e azul/vermelha (70,1%). A lâmpada branca (90,3%) apresentou a maior porcentagem, com aproximadamente apenas 10% de explantes sem indícios de oxidação.

Tabela 21 — Médias de oxidação (%), contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) de propágulos de uma população de *I. paraguriensis* utilizados no estabelecimento *in vitro* sob diferentes lâmpadas LED

LEDs	Oxidação (%) (CV% = 23,0)	Bactéria (%) (CV% = 59,6)	Fungo (%) (CV% = 16,4)
Branca	90,3 b*	51,4	100,0 b
Vermelha	76,9 b	48,6	91,4 b
Azul	56,9 a	31,4	77,1 a
Azul/vermelha	70,1 a	34,3	97,1 b
Média	73,6	41,4	91,4

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5 % de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A contaminação por bactérias não atingiu metade das unidades amostrais (41,4%), sendo observada em aproximadamente oito dias após o estabelecimento. Para os tratamentos, as médias variaram entre 51,4%, para a lâmpada branca, e 31,4%, para a azul.

A contaminação por fungos foi detectada aos cinco dias em quase todos os vidros (91,4%), independentemente das lâmpadas LED. Considerando os tratamentos, a menor

porcentagem ocorreu para a lâmpada azul (77,1%), embora acima de 75%. Com exceção da lâmpada branca, a qual obteve fungos presentes em todas as unidades amostrais (100%), a lâmpada vermelha (91,4%) e a lâmpada azul/vermelha (97,1%) apresentaram acima de 90% de contaminação.

8.5.2 Estabelecimento *in vitro* de duas populações sob diferentes lâmpadas LED

Ao todo, todos os propágulos, independentemente dos tratamentos, apresentaram algum grau de oxidação (Tabela 22). Quanto a bactérias, 15% dos tubos de ensaio não apresentaram contaminação deste tipo, sendo sua maior presença na população de Três Barras (TB) e na lâmpada azul/vermelha. Apenas 5% dos explantes apresentaram estar livres de fungos.

Tabela 22 — Relação entre as porcentagens de oxidação (%) e contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) para o número de propágulos de *I. paraguariensis* estabelecidos *in vitro* sem estas condições, de acordo com duas populações e diferentes lâmpadas LED

Variável	Oxidação (%)	Bactéria (%)	Fungo (%)
População de TB	100,0 (0)*	87,5 (10)	96,3 (3)
População de UR	100,0 (0)	97,5 (2)	98,8 (1)
LED Branca	100,0 (0)	95,0 (2)	97,5 (1)
LED Vermelha	100,0 (0)	100,0 (0)	100,0 (0)
LED Azul	100,0 (0)	95,0 (2)	95,0 (2)
LED Azul/vermelha	100,0 (0)	80,0 (8)	97,5 (1)
Total	100,0 (0)	85,0 (12)	95,0 (4)

Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; *Número total de propágulos que não se encontram nesta condição, ou seja, livres de oxidação e contaminados por bactérias e/ou fungos. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Estatisticamente, ambas as contaminações ocasionadas por bactérias e por fungos apresentaram significância de forma factorial com uma alta AE% (entre 70% e 90%) (ANEXO J). Apenas a porcentagem de oxidação não foi significativa.

Apenas 25% dos explantes não oxidaram neste experimento (75,8%). Suas médias foram próximas, variando entre 68% e 81,4%, independentemente das lâmpadas LED e da população.

A contaminação por bactérias variou entre tratamentos e populações, sendo primeiramente detectada aos nove dias, em que sua média geral não atingiu metade dos explantes (48,2%) (Tabela 23). Para a população de TB destaca-se a lâmpada azul/vermelha, a qual apresentou a menor porcentagem de contaminação por bactérias (28,1%), enquanto a lâmpada branca (48,0%) e a vermelha (42,9%) apresentaram valores abaixo de 50%. Para

Urupema (UR), a contaminação foi maior, principalmente na lâmpada vermelha (64,6%), seguida da azul/vermelha (58,0%).

Tabela 23 — Médias de oxidação (%), contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) de propágulos de duas populações de *I. paraguariensis* utilizados no estabelecimento *in vitro* sob diferentes lâmpadas LED

Pop.	Lâmpadas LED				
	Branca	Vermelha	Azul	Azul/vermelha	Média
Oxidação (%) (CV% = 17,9)					
TB	73,0	68,0	75,4	78,1	73,6
UR	78,0	79,7	81,4	72,9	78,0
Média	75,5	73,9	78,4	75,5	75,8
Bactéria (%) (CV% = 28,4)					
TB	48,0 bA*	42,9 bA	52,9 bA	28,1 aA	43,0
UR	41,3 aA	64,6 aB	49,6 aA	58,0 aB	53,4
Média	44,7	53,8	51,3	43,1	48,2
Fungo (%) (CV% = 20,8)					
TB	79,8 bA	83,1 bA	61,3 aA	91,6 bB	79,0
UR	76,5 aA	83,1 aA	88,2 aB	69,6 aA	79,4
Média	78,2	83,1	74,8	80,6	79,2

Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; *Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A contaminação por fungos atingiu aproximadamente 80% de todos os explantes, com a sua primeira observação ocorrendo no sexto dia. As menores porcentagens de contaminação ocorreram para TB em lâmpada azul (61,3%) e UR em lâmpada azul/vermelha (69,6%), enquanto as maiores ocorreram inversamente, para TB em lâmpada azul/vermelha (91,6%) e para UR em lâmpada azul (88,2%).

8.5.3 Estabelecimento *in vitro* de duas populações sob diferentes lâmpadas LED a partir de brotações epicórmicas de galhos destacados

Não houve interação significativa em nenhuma das variáveis analisadas. Em nível de população, todas as variáveis foram significativas com muito alta AE% (> 90%) (ANEXO K). Entretanto, apenas a contaminação por bactérias foi significativa para os tratamentos, com uma alta AE% (entre 70% e 90%).

De forma geral, a oxidação ocorreu em mais de 80% dos explantes. As médias foram semelhantes entre os tratamentos de LED, mas para as populações houve uma diferença maior do que 25%, em que a população de TB apresentou a menor porcentagem (70,3%).

Para a contaminação por bactérias, novamente se manteve em menos da metade das unidades amostrais (48,4%) e sendo detectada no sétimo dia. Com relação aos tratamentos de lâmpadas LED, a maior porcentagem de contaminação ocorreu para a lâmpada branca (64,5%), seguida da vermelha (49,9%), lâmpada azul/vermelha (43,7%) e lâmpada azul (35,4%). Entre as populações, TB apresentou a menor porcentagem (37,5%), enquanto UR apresentou mais do que 20% a mais (59,4%).

Os fungos foram presentes em grande parte das unidades amostrais, com cerca de apenas 10% livres desta contaminação (89,6%), mas ocorrendo de forma ainda mais precoce, sendo observada com quatro dias (Tabela 24). Foram somente detectadas diferenças entre as duas populações, em que a menor porcentagem ocorreu para UR (81,2%), aproximadamente 15% a menos do que TB (97,9%).

Tabela 24 — Médias de oxidação (%), contaminação bacteriana (%) e fúngica (%) de propágulos de material revigorado de duas populações de *I. paraguariensis* utilizados no estabelecimento *in vitro* sob diferentes lâmpadas LED

Pop.	Lâmpadas LED				
	Branca	Vermelha	Azul	Azul/vermelha	Média
Oxidação (CV% = 15,7)					
TB	75,0	71,3	77,5	57,5	70,3 a*
UR	97,5	97,5	100,0	90,0	96,3 b
Média	86,3	84,4	88,8	73,8	83,3
Bactéria (CV% = 33,2)					
TB	54,1	49,9	20,8	25,0	37,5 a
UR	74,9	49,9	50,0	62,5	59,4 b
Média	64,5 b	49,9 a	35,4 a	43,7 a	48,4
Fungo (CV% = 17,2)					
TB	100,0	100,0	91,7	100,0	97,9 b
UR	95,8	79,1	75,0	75,0	81,2 a
Média	97,9	89,6	83,3	87,5	89,6

Sendo: TB – Três Barras; UR – Urupema; *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de médias Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

8.6 DISCUSSÃO

8.6.1 Estabelecimento *in vitro* sob diferentes lâmpadas de LED

Independentemente dos experimentos realizados, das populações testadas, das lâmpadas LED utilizadas e do grau de maturação do material dos propágulos, as porcentagens de oxidação apresentadas foram superiores a 70% nas médias gerais, com exceção da lâmpada azul durante o primeiro experimento e da lâmpada azul/vermelha para a população de Três Barras (TB) no terceiro experimento, em que médias abaixo de 60% foram apresentadas. Trabalhando com a

micropropagação de *I. paraguariensis* Dutra e Silva (2009) determinaram que a sobrevivência de seus explantes pode ser próxima a 5%, em decorrência da sua elevada contaminação, sendo esta espécie conhecida por apresentar diversos contaminantes endofíticos, aumentado sua oxidação mesmo quando aplicados processos de descontaminação teoricamente eficientes (PIMENTEL *et al.*, 2006). Isto pode justificar as elevadas porcentagens de oxidação observadas no presente trabalho, em que procedimentos semelhantes foram aplicados, embora no trabalho citado tenha sido utilizado apenas 1% de NaOCl.

Todavia, de acordo com Dutra *et al.* (2008), a oxidação pode ser nula quando utilizado NaOCl a 2,5%, mas com uma sobrevivência menor do que 20% dos explantes, não diferindo dos tratamentos com maiores concentrações. Neste sentido, é possível que o grau de maturação tenha exercido efeito no presente trabalho, principalmente nos dois primeiros experimentos, em que foram utilizadas brotações de copa para sua elaboração, aumentando as chances de contaminação (SANSBERRO *et al.*, 2000; PIMENTEL *et al.*, 2006). Trabalhando com plantas mãe de idades diferentes, Tomasi *et al.* (2018) observaram que o material oriundo de plantas com dez anos de idade, sua oxidação é de aproximadamente 40%, enquanto plantas de 80 anos esta variável pode ser próxima de 90%. Estas informações auxiliam a justificar a elevada oxidação obtida.

Entretanto, em teoria, o terceiro experimento deveria ter apresentado melhor resultado quanto sua oxidação. Neste, foram obtidas brotações epicórmicas, teoricamente de maior vigor vegetativo, possivelmente com menores chances da presença de contaminantes, o que de fato não ocorreu, mesmo com a utilização de fungicida por um período de duas semanas. É provável que o uso deste material não tenha sido ideal, visto o período de 150 dias para a formação de brotações epicórmicas, pode ter favorecido o acesso de fungos e bactérias, estando presentes de forma endógena. Associado a este fator, o ambiente de armazenamento dos galhos destacados pode não ser ideal para a produção e obtenção de propágulos, em que o mesmo é utilizado para outros experimentos, podendo servir como fonte de contaminação. Ainda, a própria utilização de fungicida pode ter sido ineficiente, em que Dutra *et al.* (2008) aplicaram tratamentos com outros compostos com somente um dia de antecedência da coleta de explantes de minicepas, com tratamentos de descontaminação semelhantes aos do presente trabalho, mas apresentando uma contaminação fúngica ao menos 30% menor.

Quanto as populações testadas, TB apresentou uma porcentagem de oxidação ligeiramente menor em comparação a Urupema (UR), próximo de 25%, principalmente para o terceiro experimento de estabelecimento *in vitro*. Tomasi *et al.* (2018) afirmam que determinados clones podem apresentar porcentagens similares de oxidação em curtos espaços

de tempo, com diferenças não maiores do que 3% aos 30 dias, mas aumentando aos 60 dias, podendo atingir entre 5% e quase 20% para materiais mais maduros. É possível que este efeito também esteja presente em nível populacional, o que justificaria os resultados obtidos, uma vez que os mesmos tratamentos foram aplicados para ambas as origens. Para Rosa *et al.* (2006), as épocas de coleta do material afetaram a oxidação dos propágulos, em que a maior porcentagem de não sadios ocorre no verão, com mais de 30% de oxidados. Embora tenham sido testadas épocas diferentes no presente trabalho, não foram detectadas diferenças significativas entre seus resultados, não importando os tratamentos e as populações. Ainda, Rosa *et al.* (2006) trabalharam com material proveniente de estacas de *I. paraguariensis*, utilizando as brotações formadas nestas, o que podem garantir uma menor presença de contaminantes endógenos (PIMENTEL *et al.*, 2006).

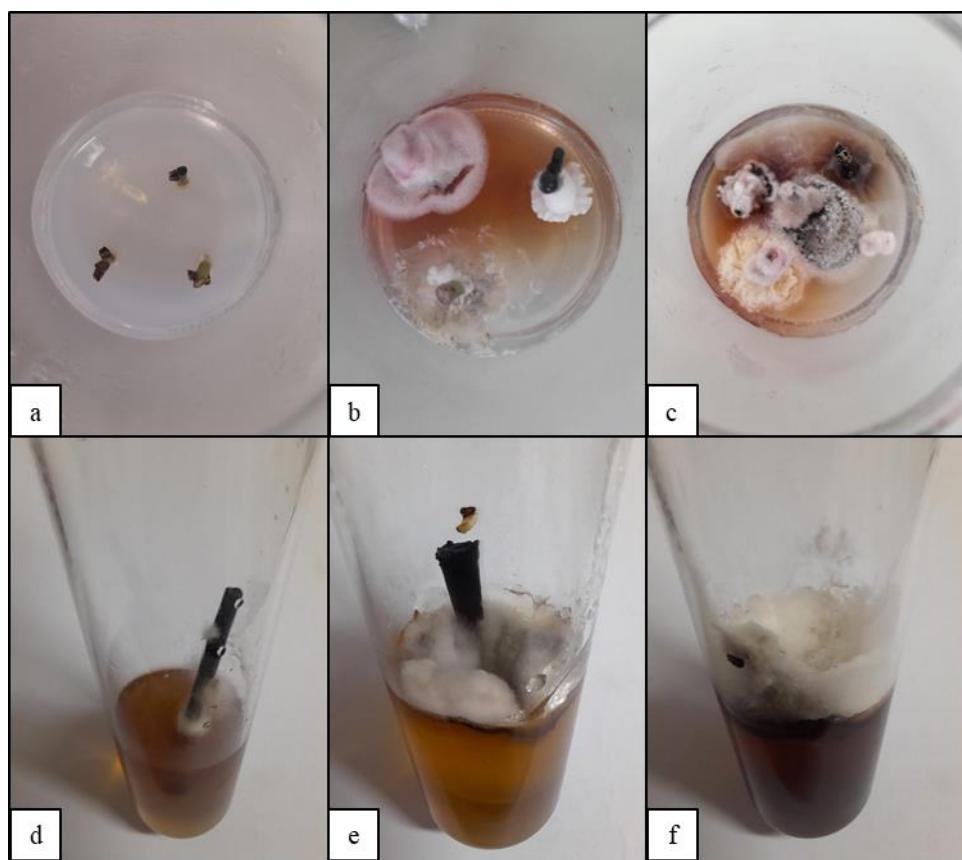
Enquanto a contaminação por fungos foi praticamente superior a 70% em todos os experimentos (Figura 22), a presença de bactérias foi ligeiramente menor, mantendo-se sempre com médias abaixo de 50%, podendo ser inclusive menores do que 35% quando mantidas em lâmpadas LED das cores azul e azul/vermelha. Embora não haja estudos sobre a temática quanto a micropropagação ou estabelecimento *in vitro* de plantas, alguns estudos da área médica demonstram que a utilização de lâmpadas LED azul nas ondas entre 405 nm e 470 nm podem ser eficientes para a eliminação de microrganismos (LU *et al.*, 2019), e a lâmpada LED azul logo após o processo cirúrgico na região dentária pode reduzir em até 54% a contaminação microbiana (NUNES *et al.*, 2018). Isto pode ajudar a justificar os resultados de menor proporção da contaminação bacteriana nos propágulos, em que a lâmpada azul e a lâmpada azul/vermelha apresentaram algum grau de eficiência no seu controle.

De acordo com Silva *et al.* (2020), a utilização de lâmpadas LED de cor vermelha de 660 nm, é capaz de inibir de forma eficaz o fungo *Candida albicans* em superfícies acrílicas, sendo uma alternativa barata e não tóxica de descontaminação. Isto não foi detectado no presente trabalho, uma vez que a contaminação por fungos foi constantemente próximo de 100%. *I. paraguariensis* é conhecida por ter uma dificultosa micropropagação devido às grandes porcentagens de contaminação, principalmente fúngica, podendo facilmente atingir níveis de quase 60% ou mais (HÖRNER *et al.*, 2001; DUTRA e SILVA, 2009), mas podem reduzir ao se utilizar concentrações de NaOCl mais elevadas (DUTRA *et al.*, 2008). Este efeito positivo pode estar presente mesmo em explantes de plantas maduras de ambientes nativos em até 40% (MENEGUZZI *et al.*, 2016).

Entretanto, mesmo com alteração do protocolo de descontaminação, este não apresentou ser eficiente. Ainda, é importante destacar que as chances de estas contaminações terem sido

ocasionadas durante o estabelecimento, embora seja mínima, ainda é existente. Durante observações preliminares dos propágulos, foi possível observar que os primeiros sinais de contaminação partiam diretamente do material vegetal, não sendo detectadas contaminações no meio, reforçando a justificativa da presença de contaminantes endofíticos (PIMENTEL *et al.*, 2006).

Figura 22 — Exemplos do estabelecimento *in vitro* de *I. paraguariensis* em vidros sem contaminação (a), com contaminação intermediária (b) e elevada (c), e tubos de ensaio com somente contaminação bacteriana intermediária (d), bacteriana e fúngica intermediária (e) e bacteriana e fúngica elevada (f)



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Os trabalhos que relacionam micropropagação de espécies vegetais com a utilização de lâmpadas LED estão concentradas no ganho de biomassa e desenvolvimento de tecidos específicos (ROCHA *et al.*, 2010; CAMARGO *et al.*, 2015; FAÇANHA *et al.*, 2019), mas não em plantas arbóreas. Desta forma, há a necessidade da elaboração de novos experimentos que melhor avaliem as relações citadas, principalmente para o estabelecimento *in vitro*, devendo ser trabalhado com espécies arbóreas em que o controle dos agentes contaminantes seja facilitado,

sendo capaz de observar as verdadeiras influências das origens dos materiais, seu grau de maturação e sua resposta à diferentes lâmpadas.

8.7 CONCLUSÃO

Não foi possível o estabelecimento *in vitro* de explantes de *I. paraguariensis* de acordo com os tratamentos aplicados.

Foi detectado um potencial de utilização de lâmpadas LED nas cores azul e combinação de azul e vermelha na descontaminação bacteriana. São necessários novos estudos para averiguar possíveis efeitos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora seja muito trabalhada, a propagação vegetativa de *I. paraguariensis* ainda possui inúmeros desafios, principalmente quando o resgate de populações nativas é o objetivo. A partir deste trabalho, é possível observar que os temas comumente abordados para a espécie nesta temática, especialmente o grau de maturação da planta mãe, são relevantes, mas ainda existem outros fatores que podem ser cruciais para sua propagação.

O principal fator observado neste trabalho, destacado nos capítulos I, III e IV, está na população de origem, ou seja, na região geográfica em que determinado grupo de indivíduos desta espécie está presente. Isto é justificável a partir dos processos de seleção natural, em que ao longo das gerações a espécie passou por diferentes adaptações que permitiram a ela ocupar ambientes que podem ser muito divergentes, possibilitando uma melhor capacidade de propagação vegetativa de determinadas populações. Entretanto, aparentemente a sua capacidade também está atrelada ao genótipo em si, em que podem ser obtidos diferentes resultados dentro de uma mesma população, considerando plantas sob características semelhantes. A determinação de genótipos superiores se torna o verdadeiro desafio, uma vez que podem se tratar de plantas fenotipicamente similares, mas que, uma vez capazes de se obter, podem auxiliar muito a propagação vegetativa e melhoramento da espécie, associado a demais fatores inerentes a sua clonagem, como o grau de maturação.

Um outro fator importante no resgate observado nos capítulos II e III foi a época em que houve a coleta das brotações para a estquia, em que os resultados não corroboraram com a literatura. Diferentemente dos trabalhos estudados, os quais trouxeram informações de que as melhores épocas de coleta seriam antes ou durante o retorno do aumento das temperaturas, os melhores resultados neste trabalho foram sempre obtidos após estes períodos, destacando a estação do verão. Isto talvez seja explicado por dois fatores principais. O primeiro sendo o lento aumento de temperatura no ambiente de origem em função da sua localização geográfica, tal como ocorrente na população de UR, enquanto o segundo estaria nesta mesma perspectiva, mas em relação a região em que se encontra o ambiente de enraizamento, em que as temperaturas durante a época de armazenamento no verão, normalmente início do mês de dezembro e final de fevereiro, apresentam um aumento mais lento. A associação entre estes dois fatores, ou seja, devido às estações não serem bem definidas, pode ter feito com que o material vegetal tivesse o retorno completo de seu metabolismo após este período.

Entretanto, os ambientes de enraizamento também apresentaram ser determinantes na sobrevivência e enraizamento desta espécie, sendo isto observado no capítulo III. Em um estudo

semelhante, os resultados obtidos foram similares para a mesma época de ocorrência, com uma superioridade para o CVNI, o que não ocorreu para de forma evidente para as outras estações do ano no presente trabalho, principalmente o verão, podendo isto estar associado com o que foi descrito no parágrafo anterior. O CVNI apresentou menor amplitude térmica na primavera, sendo ainda uma estação fria para a região, o que possivelmente auxiliou na superação do estado de dormência das estacas e facilitou o seu enraizamento. Porém, quando o material já apresenta algum nível de superação desta dormência, este apresenta ser mais dependente da umidade do que a temperatura, facilmente observado nos resultados obtidos pelo estufim durante o verão. Isto indica que, assim como maioria das espécies florestais, *I. paraguariensis* é altamente dependente uma umidade elevada para que ocorra um enraizamento eficaz, quando coletada em época propícia.

O possível incremento do resgate e enraizamento a partir da adubação das plantas mãe, estudado no capítulo II, já foi constatado em outros estudos, o que muito provavelmente não foi detectado neste trabalho devido ao desconhecimento das condições químicas do solo, uma vez que a análise ocorreu em mesmo período de aplicação dos tratamentos. Embora não tenha sido detectado efeito das doses de adubo, a utilização da técnica de anelamento se mostrou muito eficiente no resgate e na estaquia da espécie para a população estudada, resultados os quais já eram esperados de acordo com a literatura existente. Todavia, a hipótese de que a adubação auxilia na propagação vegetativa da espécie não pode ser descartada, podendo ser futuramente estudada para o resgate de genótipos de interesse que apresentem dificuldade de enraizamento.

O resgate a partir de galhos destacados, testado no capítulo IV, se mostra uma técnica promissora para a obtenção de brotações epicórmicas, sendo capazes de produzir em quantidades e comprimentos suficientes para a estaquia ou micropropagação. Entretanto, eles se mostraram dependentes de todos os fatores testados em função das populações, sendo capaz de selecionar o diâmetro ou o sentido de armazenamento de acordo com a velocidade e tamanho de brotação epicórmica desejada. De fato, a estaquia a partir das brotações produzidas por estes obteve resultados de enraizamento promissores, no entanto, ainda é necessário aprimorar a sobrevivência deste material, o qual apresenta uma elevada sensibilidade. Enquanto que para a micropropagação de explantes obtidos destes galhos, presente no capítulo V, são necessários novos estudos priorizando o controle da contaminação endógena.

Ainda, para a micropropagação, a literatura demonstra grande variação de resultados, principalmente quanto a contaminação, corriqueiramente explicada em função da contaminação endógena, o que provavelmente seja a principal explicação para os resultados deste trabalho.

Mesmo não tendo obtido sucesso no estabelecimento de explantes, alguns resultados inferiores de contaminação bacteriana não podem ser desconsiderados, principalmente em relação a lâmpada LED de cor azul.

Para aprofundamento das pesquisas aqui realizadas para a estaquia, podem ser efetuados trabalhos visando a utilização de mais populações de *I. paraguariensis*, contemplando mais regiões do Sul do Brasil, a fim de obter materiais com características específicas, essências para o melhoramento. Conjuntamente, podem ser testadas as estações do ano, a fim de observar a capacidade de enraizamento em diferentes condições climáticas, tal qual em diferentes ambientes de enraizamento, preferencialmente em locais mais distantes. Ainda, a seleção dos indivíduos deve ser mais rigorosa, obtendo mais informações no momento de coleta para que sejam observadas características que possam ser resposta de um enraizamento superior.

Quanto à adubação, é necessário que nos futuros experimentos seja realizada a análise química do solo previamente a aplicação dos adubos, sendo este corrigido quando necessário, principalmente quanto a acidez. Entretanto, outras medidas podem ser ainda tomadas, como aplicar um experimento semelhante em mudas clonais desta ou outras espécies em um ambiente mais controlado, como um viveiro florestal. Destas mudas podem ser retiradas folhas de forma periódica para análise hormonal, tanto para citocininas quanto auxinas para averiguar a real capacidade dos adubos na produção de materiais com maior vigor vegetativo. Associado a isto, a estaquia pode ser realizada esporadicamente para relacionar estes dados.

Podem ser elaborados experimentos de brotação epicórmica de galhos destacados dentro do próprio laboratório de micropopulação, utilizando métodos de descontaminação mais eficientes e por mais longos períodos, também obtendo a porção mais fisiologicamente jovem possível das brotações produzidas, por exemplo. Isto pode ajudar a complementar os trabalhos de micropopulação, uma vez que a grande gama de trabalhos com esta técnica apresenta ser difícil, não havendo um protocolo específico para tanto. Ainda, a utilização de explantes provenientes de brotações de copa devem ser evitados ao máximo, visto que a contaminação presente dificilmente pode ser eliminada, além do maior grau de maturação que pode inutilizar este processo.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 2nd, ed. New York: Academic Press. 1978, 703 p.
- ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.
- ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 209-215, 2006.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, p. 261-296, 1998.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação & interesse ecológico: as principais espécies nativas sul-brasileiras. Instituto Souza Cruz. 2002, 60 p.
- BALZON, D. R.; SILVA, J. C. G. L.; SANTOS, A. J. Aspectos mercadológicos de produtos florestais não madeireiros - análise retrospectiva. **Revista Floresta**, v. 34, n. 3, p. 363-371, 2004.
- BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMAMM, M. J. A **Contaminação in vitro de plantas**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006, 20 p.
- BELLOTTE, A. F. J.; STURION, J. A. Deficiências minerais em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.): resultados preliminares. In: **SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS**: silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). EMBRAPA/CNPF, p. 124-127, 1983.
- BENEDETTI, E. L.; SANTIN, D.; STASKOVIAK, A. P.; NOVAK, C. F.; JANSEN, T. A. L.; MORAIS, B. C. Adubação orgânica estimula o crescimento de erva-mate e araucária a campo. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 2, n. 9, 2019.
- BERNASCONI, N. K.; MROGINSKI, L. A.; SANBERRO, P. A.; REY, H. Y. Micropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Efecto del genotipo y de la época del año en el establecimiento *in vitro* de los explantes. **Phyton**, v. 2, n. 1/2, p. 95-99, 1998.
- BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N. A.; HOFMANN JUNIOR, A. E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 582-585, 2008.
- BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, p. 277-281, 2009.

BITTENOURT, L. **Diversidade e estrutura genética de diferentes coortes demográficas em populações de *Ilex paraguariensis* a. St. Hil. no sul do Brasil.** 2021. Tese – Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, setor de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina, 115p., 2021.

BONDARIK, R.; KOVALESKI, J. L.; PILATTI, L. A. A produção de erva-mate e o início da atividade industrial no estado do Paraná. In: **II Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais**, 2006.

BORILLE, W. M. A.; REISSMANN, B. C.; DE FREITAS, S. J. R. Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **B. Ceppa**, n. 23, p. 183-198, 2005.

BRONDANI, G. E.; ARAUJO, M. A.; WENDLING, I.; KRATZ, D. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 57, p. 29-38, 2008.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; ARAÚJO, M. A.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F. Composições de substratos e ambiente de enraizamento na estaca de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Revista Floresta**, v. 39, n. 1, p. 41-49, 2009.

BURTNIK, O. J. **Yerba Mate:** Manual de Producción. INTA, AER Santo Tomé. 2006. 52 p.

CAMARGO, S. S.; RODRIGUES, D. B.; RODRIGUES, C. M.; ASSIS, A. M.; FARIA, R. T.; SCHUCH, M. W. Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2007-2012, 2015.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CECHET, M. L.; CARVALHO, A. Z.; ECHEVERRIGARAY, S.; COREA, G. Identificação de polinizadores na progênie da matriz de erva-mate Cambona-4. usando marcadores RAPD. In: **CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE**. Secão: Conservação, Melhoramento e Multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 2003.

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.

CARPANEZZI, A. A.; CARPANEZZI, O. T. B. **Especies nativas recomendadas para recuperação ambiental no Estado do Paraná, em solos não degradados.** Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 52p.

CARVALHO, P. E. R. **Especies arbóreas brasileiras:** (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras). Embrapa Informação Tecnológica, Embrapa Florestas. 2003, 466 p.

CARVALHO. P. E. R. *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire: erva-mate. In: CARVALHO. P. E. R. **Especies florestais brasileiras:** recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA-CNPF, EMBRAPA-SPI, p. 280-287, 1994.

CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 109 p., 1998.

CHALUPA, V. In vitro propagation of birch (*Betula verrucosa* Ehrh). **Biologia Plantarum**, v. 23, n. 6, p. 472-474, 1981.

CORREA, G.; FONSECA, T. B.; MELO, I. B.; GRISON, A.; RUFFATO, A.; MEDRADO, M. J. S.; CANSIAN, R. L.; VILCAHUAMÁN, L. J. M.; FELIZARI, S. R. **Cambona 4: desenvolvimento de uma progênie biclonal de erva-mate em Machadinho, RS.** Embrapa Florestas, 2011, 30 p.

COSTA, R. B.; RESENDE, M. D. V.; CONTINI, A. Z.; REGO, F. L. H.; ROA, R. A. R.; MARTINS, W. J. Avaliação genética de indivíduos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) na região de Carapó, MS, pelo procedimento REML/BLUP. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 4, p. 371-376, 2005.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; LEITE, H. G.; BARROS, N. F.; LEITE, F. P. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 33, n.4, 607-615, 2009.

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. 51, n. 3, p. 415-421, 1994.

DA CROCE, D. M. **Cadeias produtivas de Santa Catarina:** Erva-mate. Florianópolis: Epagri, 2000, 41p.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina.** Florianópolis: Epagri, 1999, 81p.

DA CROCE, D. M. **Cadeia Produtiva da erva-mate em Santa Catarina.** Chapecó: EPAGRI/CPGP, 1996, 35 p.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; PAIVA, S. M.; SCOPARO, C. T.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A.; RATTMANN, Y. D.; SASSAKI, G. L. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1776-1782, 2013.

DICKEL, M. L.; RITTER, M. R.; BARROS, I. B. I. *Ilex paraguariensis*: Erva-mate. In: COORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial:** plantas para o futuro – Região Sul. Brasília: MMA. 2011, 934 p.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropopulação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas.** 2006. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, 2006.

DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDozo JUNIOR, E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos

em amostras de erva mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. In: **CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE**, 3, 2000, Encantado/RS. Anais... Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000, p. 158-161.

DUARTE, M. M.; GABIRA, M. M.; TOMASI, J. C.; VIEIRA, L. M.; AGUIAR, N. S.; MAGGIONI, R. A.; AMANO, E.; LAZZAROTTO, M.; NOGUEIRA, A. C.; WENDLING, I. Adubação nitrogenada na miniestaquia de erva-mate. **Advances in Forestry Science**, v. 7, n. 2, 2020.

DÜNISCH, O.; REISSMANN, C. B.; OLISIEKI, A. Variability do vessel characteristics in the xylem of *Ilex paraguariensis* (mate-tree) from south Brazil. **IAWA Journal**, v. 25, n. 4, p. 449-458, 2004.

DUTRA, L. D.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. **Introdução ao cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, Embrapa Florestas, 2008.

DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. **Estabelecimento In Vitro de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. EMBRAPA, comunicado técnico 215, 7 p., 2009.

EDWING, G.; REITZ, R. **Aqüifoliáceas**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1967.

ELIAS, G. A.; PADILHA, P. T.; SANTOS, R. O Bioma Mata Atlântica. In: **Biodiversidade em Santa Catarina**: Parque Estadual da Serra Furada. SANTOS, R.; *et al.* (Orgs.). Criciúma, SC: UNOESC, 2016, 188 p.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 199-204, 2002.

EVANS, W. C. **Trease and Evan's Pharmacogosy**. 14.ed., Londres: WB Saunders Company. 1998, p. 403

FAÇANHA, D. C.; SILVA, E. J. D.; SANTOS, C. A.; PEREIRA, M. C. N.; LOPES, R.; QUISEN, R. C. Efeitos de diferentes tipos de luz na micropropagação de brotações de bananeira cultivar Pacon. In: **XV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL**, Brasília, DF, Anais... Embrapa, 2019.

FERREIRA, A. G.; CUNHA, G. G.; SILVEIRA, T. S.; HU, C. Y. In vitro germination of immature embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**. Buenos Aires, v. 52, n. 1, p. 27-32, 1991.

FERREIRA, A.G. Erva-mate & chimarrão: seleção genética aprimora tradição secular. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 111, p. 47-50, 1995.

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

FERREIRA, D. F. SISVAR: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS. **REVISTA BRASILEIRA DE BIOMETRIA**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FLORA DO BRASIL. 2020. Aquifoliaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4904>. Acesso em: 12 jun. 2020

FOSSATI, L. C. **Avaliação do estado nutricional e da produtividade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.), em função do sítio e da dioxina.** 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, 1997.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate.** EMBRAPA-CNPQ. 2000, 5 p.

FRANZON, R. C.; GONÇALVES, R. S.; ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B. Propagação vegetativa de genótipos de pitangueira do sul do Brasil por enxertia de garfagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, 262-267, 2010.

GALÍNDEZ, G.; CECCATO, D.; BUBILLO, R.; LINDOW-LÓPEZ, L.; MALAGRINA, G.; ORTEGA-BAES, P.; BASKIN, C. C. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, v. 28 n. 2, p. 1-9, 2018.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture.** 3rd edition. Dordrecht: Springer, 1993.

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P.; Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.. Aquifoliaceae). **Quim Nova**, n. 2, p. 304-307, 2007.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq Inst Biol**, n. 3, p. 353-358, 2005.

GONÇALVES, M.; GUERREIRO, M. C.; BIANCHI, M. L.; OLIVEIRA, L.; C. A.; PEREIRA, E. I.; DALLAGO, R. D. Produção de carvão a partir de resíduo de erva-mate para a remoção de contaminantes orgânicos de meio aquoso. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1386-1391, 2007.

GRAÇA, M.. E.. C.; TAVARES, F. R.; RODIGHERI, H. R.; COOPER, M. A. **Produção de mudas de erva-mate por estaquia.** Embrapa Florestas. 1990, 20p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1, p.43-76, 1998.

GUGLIUCCI, A, Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 224-338, 1996.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, p. 47-56, 1995.

GUIOTOKU, M.; LAZARIZ, V.; DALLAGO, R. M.; MAGALHÃES, W. L. E. **Utilização de Palitos de Erva-Mate na Produção de Painéis de Aglomerado**. Comunicado Técnico, 214, Embrapa Florestas. 2008, 6 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Hartmann and Kester's Plant propagation: principles and practices**. 8. ed., 915 p., 2011.

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

HÖRNER, L. A.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A.; MIELKE, M. S.; SUZIN, M.; DENARDIN, N. S. Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2001.

HU, C. Y. Holly (*Ilex* spp.). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Y.P.S Bajaj. Ed. Springer-Verlag, v. 5, p. 412-487, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção da extração vegetal e da silvicultura de 2020**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2020> Acesso em: 15 de outubro de 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Dados históricos anuais de 2019 a 2021**. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos> Acesso em: 7 de dezembro de 2021.

JONES JR, J. B.; WOLF, B.; MILLS, H. A. **Plant Analysis Handbook**. Georgia, 1991.

KASEKER, J. F.; BASTOS, M. C.; REISSMANN, C. B.; OLISZESKI, A.; GAIAD, S. Análise Química Foliar Compartimentada em Folhas e Talos de Morfotipos e Procedências de Erva-mate. **FertBio**, 2010.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa SPI, b. 2, p. 519-532, 1999.

KIBA, T.; KUDO, T.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid and cytokine. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1399-1409, 2011.

KONZEN, E. R. Towards conservation strategies for forest tree endangered species: the meaning of population genetic statistics. **Advances in Forestry Science**, v.1, n.1, p.45-51, 2014.

KOWALCZYK, E. C.; VALDUGA, T. A.; HOFMANN, J. R. E. A.; ROMAN, S. S. **Efeito do extrato de *Ilex paraguariensis* (Erva-Mate) no reparo tecidual de feridas em ratos**. 4º

Congreso Sudamericano de la Yerba Mate - 4º Reunión Técnica de la Yerba Mate; 2º Exposición de Agronegocios de la Yerba Mate. Posadas, Argentina, 2006.

KRATZ, D.; PIRES, P. P.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Produção de mudas de erva-mate por miniestaquia em substratos renováveis. **Revista Floresta**, v.45, p.609-616, 2015.

KUBOTA, T. Y. K.; MORAES, M. A.; SILVA, E. C. B.; PUPIN, S.; AGUIAR, A. V.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SATO, A. S.; MACHADO, J. A. R.; SEBBENN, A. M. Variabilidade genética para caracteres silviculturais em progêneres de polinização aberta de *Balfourodendron riedelianum* (Engler). **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 106, p. 407-415, 2015.

KUNIYOSHI, Y. S. Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária. 1983. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 1983.

LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 103, p. 155-163, 2010.

LIEBSCH, D.; MIKICH, S. Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 2, p. 375-391, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1, 7. ed., 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. 1 ed., Instituto Plantarum. 2002, p. 72.

LOURENÇO, R. S.; CURCIO, G. R.; RACHWAL, M. G.; MEDRADO, M. J. S. 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.

LOVATEL, Q. C.; ROSA, G. T.; SÁ, A. C. S.; LOPES, B. C.; TONETT, E. L. DIAS, R. A. R.; PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C. Impacts of genetic selection on *Sequoia sempervirens* mini-cutting rooting and initial growth in the field. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 51, n. 11, 2021.

LU, M.; DAI, T.; HU, S.; ZHANG, Q.; BHAYANA, B.; WANG, L.; WU, M. X. Antimicrobial blue light for decontamination of platelets during storage. **Journal of Biophotonics**, v. 13, n. 1, e201960021, 2019.

LUNA, C.; SANSBERRO, P.; MROGINSKI, L.; TARRAGÓ, J. Micropropagation of *Ilex dumosa* (AQUIFOLIACEAE) from nodal segments in a tissue culture system. **BIOCELL**, v. 27, n. 2, p. 205-212, 2003.

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

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants.** AP. 1986, 674 p.

MARTINS-RAMOS, D.; CHAVES, C. L.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Florística de Floresta Ombrófila Mista Altomontana e de Campos em Urupema, Santa Catarina. Brasil. **Revista brasileira Biociências**, v. 9, n. 2, p. 156-166, 2011.

MATTOS, N. F. Revisão taxonômica da erva-mate. In **X seminário sobre atualidades e perspectivas florestais:** silvicultura da erva-mate. Curitiba. EMBRAPA - CNPF documentos, 15, p. 37-46, 1985.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).** Curitiba: Emater, 1991.

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RUCKER, N. G. A. **Diagnóstico e alternativas para a erva-mate *Ilex paraguariensis*.** Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural. 1993, 141 p.

MEDEIROS, A. C. S. **Dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguarisensis* St. Hil.).** EMBRAPA-CNPF. 1998, 24 p.

MEDRADO, M. J. S. **Cultivo da Erva-Mate:** Sistemas de Produção, v. 1, 2005.

MEDRADO, M. J. S.; DALZOTO, D. N.; MOSELE, S. H. **Recuperação de ervais degradados.** Embrapa Florestas. 2002, 6 p.

MEDRADO, M. J. S.; LOURENÇO, R. S.; RODIGHERI, H. R.; DEDECEK, R. A.; PHILIPOVSKY, J. F.; CORREA, G. **Implantação de ervais.** Embrapa Florestas. 2000, 26 p.

MEJÍA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMÍREZMARES, M. V. 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.

MENEGUZZI, A.; NAVROSKI, M. C.; CAMARGO, S. S.; PEREIRA, M. O.; NASCIMENTO, B.; BUENO, D. H.; RUFATO, L. Efeito da assepsia com NaOCl no estabelecimento *in vitro* de erva-mate. In: **SEMINÁRIO ERVA-MATE XXI: MODERNIZAÇÃO NO CULTIVO E DIVERSIFICAÇÃO DO USO DA ERVA-MATE,** Curitiba. Anais... Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2016.

MENEGUZZI, A. **Resgate vegetativo e propagação in vitro de *Persea willdenovii* Kosterm.** 2017. Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, setor de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Santa Catarina, 83 p., 2017.

MOKOTEDI, M. E. O.; WATT, M. P.; PAMMETER, N. W. In vitro rooting and subsequent survival of two clones of cold-tolerant *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus nitens* Hybrid. **HortScience**, v. 35, p. 1163-1165, 2000.

MORAES, M. L. T.; MORI, E. E.; SILVA, A. M.; CANUTO, D. S. O.; SILVA, J. M.; GOMES, J. E.; AUDES, D. S. Demonstração da utilização do software SELEGEN – “seleção genética computadorizada” para o melhoramento de espécies perenes. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 7, n. 12, 2008.

MORANDI, M. A. **Desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.).** 2020. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 127 p., 2020.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 3-35, 2003.

MROGINSKI, L. A.; SANBERRO, P. A.; REY, H. Y.; COLLAVINO, M. M. **Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Estado Actual y perspectivas.** Proc. I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate, p. 141-151, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology plant**, v.15, p. 473-497, 1962.

NAGAOKA, R. E.; PERES, F. S. B.; CARMO, A. L. M.; GARCIA, F. A. O. Efeito do AIB no desenvolvimento de mudas clonais em genótipos de erva-mate. **Enciclopédia Bioesfera**, v. 9, n. 17, p. 1182-1191, 2013.

NASCIMENTO, B.; SÁ, A. C. S.; NAVROSKI, M. C.; PEREIRA, M. O. Alturas de anelamento completo em *Ilex paraguariensis* para produção de brotações epicórmicas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, p. 306-306, 2019b.

NASCIMENTO, B. **Resgate e propagação vegetativa de *I. paraguariensis* St. Hil.** 2018. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, setor de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2018.

NASCIMENTO, B.; SÁ, A. C. S.; LEMOS, L. B.; ROSA, D. P.; PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C. Three epicormic shoot techniques in *I. paraguariensis* mother trees and its cutting according to the material rejuvenation degree. **CERNE**, v. 24, n. 3, p. 240-248, 2018.

NASCIMENTO, B.; SÁ, A. C. S.; SOUZA, G.; PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C. Nitrogenated fertilization favors vegetative rescue and propagation of *Ilex paraguariensis*. **CERNE**, v. 25, n. 1, p. 76-83, 2019a.

NASCIMENTO, N.; SÁ, A. C. S.; MORAES, C.; SANTOS, J. C. P.; PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C. Rooting cuttings of *Ilex paraguariensis* native to southern Brazil according to mother tree genotype, rooting environment and IBA use. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, e3087, 2020.

NAVROSKI, M. C.; REINIFER, L. R. S.; PEREIRA, M. O.; CURTI, A. R.; PAIM, A. F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **CERNE**, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

NUNES, C. S. R.; PROIETTI JUNIOR, A. A.; BARCESSAT, A. R. P. Descontaminação fotoquímica de alvéolos dentários em técnicas distintas de terapia fotodinâmica: relato de dois casos clínicos. **Estação Científica**, v. 8, n. 2, p. 129-137, 2018.

OLIVA, E. V. Composição química e produtividade de procedências e progêneres de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em Latossolo Vermelho distrófico no município de Ivaí – PR. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal do Paraná, 2007.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropopulação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLIVEIRA, M. E. Patologia de sementes. Palmas: Universidade Federal do Tocantins; 2013.
OLIVEIRA, R. J. P.; BIANCHI, V. J.; AIRES, R. F.; CAMPOS, A. D. Teores de carboidratos em estacas lenhosas de mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 199-207, 2012.

OLIVEIRA, S. V.; WAQUIL, P. D. Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul. Brasil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 750-756, 2015.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural da erva-mate. In: **X SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, p. 17-36, 1985.

PANICK, B. Multiplicación clonal de plantas elite de yerba mate mediante técnicas de cultivo in vitro. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C.; **Erva-mate: biología e cultura no Conesul**, Porto Alegre: UFRGS, p. 157-160, 1995.

PASSINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, socioeconómicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 112 p., 2003.

PAULS, S. U.; NOWAK, C.; BÁLINT, M.; PFENNINGER, M. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 4, p. 925-946, 2013.

PENNA, E. B. da S. **Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. por RAPD**. 2000. Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 123 p., 2000.

PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C. Rooting environments in *Sequoia sempervirens* mini-cuttings of clone a228. **CERNE**, v. 25, n. 4, p. 386-393, 2019.

PICOLOTTO, L.; VIGNOLO, G. K.; PEREIRA, I. S.; GONÇALVES, M. A.; ANTUNES, L. E. C. Enraizamento de estacas de amoreira-preta em função da adubação nitrogenada na planta matriz. **Revista Ceres**, v. 62, n. 3, p. 294-300, 2015.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 124-128, 2006.

PIMENTEL, N.; LENCINA, K. H.; KIELSE, P.; RODRIGUES, M. B.; SOMAVILLA, T. M.; BISOGNIN, D. A. Produtividade de miniepas e enraizamento de miniestacas de clones de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 2, p. 559-570, 2019.

PIMENTEL, N.; LENCINA, K. H.; PEDROSO, M. F.; SOMAVILLA, T. M.; BISOGNIN, D. A. Morphophysiological quality of yerba mate plantlets produced by mini-cuttings. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 6, p. 3515-3528, 2017.

PIRES, E. Z.; STEDILLE. L. I. B.; MACHADO, S.; MANTOVANI, A.; BORTOLUZZI, R. L. C. Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. **Revista Ciências Agroveterinárias**, v. 13, n. 2, p. 171-180, 2014.

PIRES, E. Z. **Ecologia de *Ilex paraguariensis* a. St. Hil. em um fragmento de floresta ombrófila mista na região do planalto catarinense**. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, setor de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2012.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S.; RESENDE, M. D. V. D. Genetic evaluation of selections and hybrids of rangpur lime, volkamer and rough lemons rootstocks for Valênciânia orange trees in the presence of the citrus sudden death. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35, 199-209, 2013.

PRAT KRICUN, S. D.; BELINGHERI, L. D.; PICCOLO, G. A.; FLORES, S. E. R.; FONTANA, H. P. **Yerba mate:** informe sobre envestigaciones realizadas, período 1984-1985. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul. 1986, 32 p.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratorio de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos, 61, 2008.

RADOMSKI, M. I.; SUGAMOSTO, M. L.; GIAROLA, N. F. B.; CAMPIOLO, S. Avaliação dos teores de macro e micronutrientes em folhas jovens e velhas de erva-mate nativa. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, p. 453-456, 1992.

RADOSTA, P.; PAQUES, L. E.; VERGER, M. Estimation of genetic and non-genetic parameters for rooting traits in hybrid larch. **Silvae Genetica**, v. 43, p. 108-114, 1994.

RAPP, R. A.; WENDEL, J. F. Epigenetics and plant evolution. **New Phytologist**, v. 168, n. 1, p. 81-91, 2005.

REICHERT, C.; FRIEDRICH, J. C.; CASSOL, G. H.; PENSIN, C. F.; MITSUI, M. L.; DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JUNIOR, E. L. Chemical stability and dissolution study of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extract and some formulations. **International Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 8, p. 33-49, 2013.

REISSMANN, C. B.; ROCHA, H. O.; KOEHLER, C. W.; CALDAS, R. L. S.; HILDEBRAND, E. E. Bio-elementos em folhas e hastes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) sobre cambissolos na região de Mandirituba – PR. **Revista Floresta**, v. 14, n. 2, p. 49-54, 1983.

REISSMANN, C. B.; CARNEIRO, C. Crescimento e composição química de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), transcorridos oito anos de calagem. **Floresta**, n. 34, p. 381- 386, 2004.

REISSMANN, C. B.; DÜNISCH, O.; BOEGER, M. R. T. Beziehungen Zwischen Ernährungsbiologischen (Fe, Mn und Ca) und strukturellen merkmahlen ausgewälter morphotypen der mate-pflanze (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: HÜTTEL, R. (Ed.). **Bodenwald und wasser**. Aachen: Shaker Verlag, p. 146-171, 2003.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. Herbário Barbosa Rodrigues. 1988, 525p.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil**. Lunardelli. 1979, 320p.

RESENDE, M. D. V. **Selegen Reml/Blup – Sistema Estatístico e Seleção Genética Computadorizada**: Manual Complementar do Selegen-Reml/Blup 2017. UFV, Viçosa, 2017, 29 p.

RESENDE, M. D. V. Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 330–339, 2016.

RESENDE, M. D. V.; OLIVEIRA, E. B. Sistema "SELEGEN" – Seleção Genética Computadorizada para o Melhoramento de Espécies Perenes. **Revista PAB**, v. 9, n. 32, 1997.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 182-194, 2007.

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

ROCHA, P. S. G.; OLIVERIA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U, L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangoiro. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1922-1928, 2010.

ROSA, F. C.; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; QUADROS, K. M. **Micropropagação de erva-mate**: efeito de diferentes épocas do ano no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais. EMBRAPA, comunicado técnico. 2006, 163 p.

ROSA, L. S.; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Brotações epicórmicas no resgate vegetativo de árvores selecionadas de *I. paraguariensis* St. Hil. In: **CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE**, 3., 2003, Chapecó. Anais. [Chapecó]: EPAGRI, 2003. s.3-2.

SÁ, F. P.; PORTES, D. C.; WENDLING, I.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Miniestaquia de erva-mate em quatro épocas do ano. **Ciência Florestal**, v. 28 n. 4, p. 1431-1442, 2018.

SAINT-HILAIRE, A. **Viagem pela comarca de Curitiba**. Tradução de Cassiana Lacerda Carollo. Fundação Cultural de Curitiba, 1995.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 431-49, 2006.

SAND, H. A. Propagación agamica de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). INTA. Estación Experimental Agropecuaria Missiones., 11 p., 1989.

SANSBERRO, P. A.; REY, G. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVERNO, M. M. *In vitro* culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, p. 101-105, 1998.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. *In vitro* culture of zygotic embryos of *Ilex* species. **Hort Science**, n. 36, p. 351-352, 2001.

SANSBERRO, P.; REY, H.; BERNARDIS, A.; LUNA, C.; COLLAVERNO, M.; MROGINSKI, L. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by in vitro culture of nodal segments. **BIOCELL**, v. 24, n. 1, p. 53-63, 2000.

SANTIN, D.; BENEDETTI, E.; BARROS, N. F.; FONTES, L. L.; ALMEIDA, I. C.; NEVES, J. C. L.; WENDLING, I. Manejo de colheita e adubação fosfatada na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em fase de produção. **Ciência Florestal**, v. 27, p. 783-797, 2017.

SANTIN, D.; BENEDETTI, L.; BASTOS, M. C.; KASEKER, J. F.; REISSMANN, C. B.; BRONDANI, G. E.; BARROS, N. F. Crescimento e nutrição de erva-mate influenciados pela adubação NPK. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 2, p. 363-375, 2013.

SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; BRONDANI, G. E.; REISSMANN, C. B.; ORRUTÉA, A. G.; ROVEDA, L. F. Nitrogênio, fósforo e potássio no crescimento de mudas de erva-mate. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 59-66, 2008a.

SANTIN, D.; BENEDETTI, L.; REISSMAN, C. B. Nutrição e recomendação de adubação e calcário para cultura da erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. EMBRAPA, 21 ed., 2015.

SANTIN, D.; WENDLING, I.; BENEDETTI, E. L.; BRONDANI, G. E.; REISSMANN, C. B.; MORANDI, D.; ROVEDA, L. F. Poda e anelamento em erva-mate (*Ilex paraguariensis*) visando à indução de brotações basais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.56, p.97-104, 2008b.

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

SCHABERG, P. G.; DEHAYES, D. H.; HAWLEY, G. J.; NIJENSOHN, S. E. Anthropogenic alterations of genetic diversity within three populations: implications for forest ecosystem resilience. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n.5, p. 855-862, 2008.

SCHUCHMANN, C. E. Z. **Ações para a formulação de um protocolo de rastreabilidade de erva-mate**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Programa de Pós-graduação em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

SEBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética ex situ de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruron urundeava* e *Peltrophorum dubium* em teste de progêneres misto. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 201-211, 2001.

SILVA, D. F.; MACHADO, M. F.; FOGGIATO, A. A. Efeito da terapia fotodinâmica potencializada pela câmara ultrassônica em descontaminação de superfícies acrílicas. In: MACHADO, R. R. **As ciências biológicas e a interface com vários saberes**, Atena, 2020.

SILVA, R. D.; SIQUEIRA, D. P.; CARVALHO, G. C. M. W.; SILVA, M. K. D; BARROSO, D. G. Vegetative rescue of *Paratecoma peroba* adult trees: adventitious rooting of epicormic sprouts from detached branches. **Rhizosphere**, n. 19, e100419, 2021.

SILVA, D. T. **Diversidade e estrutura genética de populações de Ilex paraguariensis A. St.-Hil.** 2019. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, setor de Agronomia. Universidade do Estado de Santa Catarina, 101 p., 2019.

SOUZA, C. S.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, G. F.; SCHMIDT, S. S.; LIESCH, P. P. Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* samples (Araliaceae). **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 4, e20170960, 2020.

SOUZA, V. C., LORENZI H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG IV. 4 ed., 2019.

SOUZA, A. C. **Dormência em sementes de Ilex paraguariensis**. 2018. Tese, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, setor de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina, 80 p., 2018.

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.

STEDILLE, L. I. B. **Genética e ecologia de erva-mate na Floresta Ombrófila Mista: fundamentos para o manejo**. 2020. Tese. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, setor de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina, 175 p., 2020.

STUEPP, C. A.; WENDLING, I.; XAVIER, A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Vegetative propagation and application of clonal forestry in Brazilian native tree species. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 9, p. 985-1002, 2018.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Age of stock plants. seasons and iba effect on vegetative propagation of *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, v. 41, n. 2, 2017a.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Indução de brotações epicórmicas por meio de anelamento e decepa em erva-mate. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 3, p. 1009-1022, 2016.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Métodos de resgate e idade cronológicas de plantas-matrizes no enraizamento de

brotações epicórmicas de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1409-1413, 2017b.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação de erva-mate utilizando brotações de anelamento e decepa em matrizes de duas idades. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 519-526, 2015.

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V.; MENDES, S. proporção de sexo e produtividade de massa foliar em ervamate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 30/31, p.19-27. 1995.

STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Genetic parameters estimates and visual selection for leaves production in *Ilex paraguariensis*. **Plant Breeding**, v. 76, n. 4, p. 492-500, 2017.

STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate**. EMBRAPA-CNPF, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed, Artmed, 2009, 624 p.

TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; TANIGUCHI, M.; SUGIYAMA, T. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, p. 85-93, 2001.

TARRAGÓ, J.; SANSBERRO, P.; FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GONZÁLEZ, A.; LUNA, C.; MROGINSKI, L. Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings. **Scientia Horticulturae**, n. 103, p. 479–488. 2005.

TAVARES, F. R.; PICHETH, J. A.; MASCHIO, L. M. A. Alguns fatores relacionados com a estação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: **CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL**, Nova Prata. Florestas: desenvolvimento e conservação: anais. UFSM, v. 2, p. 626-640, 1992.

TOMASI, J. C.; GOLDBACH, J. D.; GRUNENNVALDT, R. L.; SANTOS, G. D.; VICENTE, V. A.; FRANCISCON, L.; BONA, C.; QUOIRIN, M. In vitro establishment of shoot meristems of *Ilex paraguariensis* and identification of endophytic bacteria. **Journal of Forestry Research**, n. 30, p. 1765-1777, 2019.

VASCONCELLOS, F. C. F. **Os impactos da criação do Mercosul no mercado de erva-mate no Rio Grande do Sul**. 2012. Monografia (Graduação em Ciências Econômicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 66 p. 2012.

VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L.; LINGNER, D. V. **Diversidade e conservação dos remanescentes florestais**. Blumenau: Edifurb, v. 1, Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, 2012, 344 p.

VIEIRA, L.; MAGGIONI, R.; TOMASI, J.; NUNES GOMES, E.; WENDLING, I.; HELM, C.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. Vegetative propagation, chemical

composition and antioxidant activity of yerba mate genotypes. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 1, n.1, p. 1-10, 2021.

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

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. Produção de mudas de erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. EMBRAPA, 21 ed, 2015.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; BIASSIO, A. de; DUTRA, L. F. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormics sprouts. **Acta Scientiarum**, v.35, n.1, p.117-125, 2013.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; HOFFMANN, H. A.; BETTIO, G.; HANSEL, F. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomia Costarricense**, v. 33, n. 2, p. 309-319, 2009.

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

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, p.449-471, 2014a.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, n. 1, p. 1-14, 2014b.

WENDLING, I.; WARBURTON, P. M.; TRUEMAN, S. J. Maturation in *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* stock plants: effects of pruning height on sprout production, adventitious rooting capacity, stem anatomy, and auxin and abscisic acid concentrations. **Forests**, v. 6, p. 3763-3778, 2015.

WENDT, S. N. Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil. 2005. Tese – Programa de Pós-Graduação em Processos Biológicos, setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 165 p, 2005.

ZAMPIER, A. C. Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.). 2001. Dissertação – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 114p, 2001.

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

ZANIOLO, S. R.; ZANETTE, F. Obtenção de brotações múltiplas de erva-mate através da micropropagação. **Agrárias**, v. 18, n. ½, p. 17-22, 1999.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1988, 7 p.

ANEXOS

ANEXO A — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de cinco populações de *I. paraguariensis* e seus genótipos

FV	Análise	Sobrevivência	Calos	Enraizamento	Brotação	Folhas originais
População	F	125,2	13,9	1,8	38,3	4,4
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,1190	< 0,0001	0,0017
	AE%	99,6	96,3	-	98,7	87,8
Genótipos	F	61,2	13,3	2,3	19,6	3,9
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	AE%	99,2	96,2	75,2	97,4	86,5

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO B — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de brotação epicórmica de galhos destacados de cinco populações de *I. paraguariensis*

FV	Análise	Brotação	Número de brotações	Comprimento de brotações
Pop.	F	3,6	13,3	0,4
	p	0,0131	< 0,0001	0,5198
	AE%	85,0	96,2	-
Aval.	F	157,6	199,0	17,6
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	AE%	99,7	99,7	97,1
Pop.*Aval.	F	6,4	6,2	0,6
	p	0,0004	0,0006	0,6523
	AE%	91,9	91,6	-

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO C — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de adubação de *I. paraguariensis* para o resgate de brotações epicórmicas oriundas da técnica de anelamento completo.

FV	Análise	Brotação	Número de brotações	Comprimento de brotações
Tratamentos	F	1,5	9,4	2,9
	p	0,2407	< 0,0001	0,0364
	AE%	-	94,5	80,9
Avaliação	F	< 0,1	0,8	0,6
	p	0,9975	0,3668	0,4300
	AE%	-	-	-
Trat.*Aval.	F	0,2	1,0	1,5
	p	0,9594	0,4250	0,2263
	AE%	-	-	-

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO D — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaqueia de *I. paraguariensis* de brotações epicórmicas e da copa oriundas de plantas adubadas

FV	Análise	Sobrevivência	Calos	Enraizamento	Número de raízes	Brotação	Folha original
Adub.	F	0,1	2,2	2,8	2,6	1,0	1,4
	p	0,1110	0,0807	0,0325	0,0424	0,3907	0,2323
	AE%	-	-	80,2	78,4	-	-
Material	F	4,4	0,4	6,3	11,8	< 0,1	1,1
	p	0,0404	0,5411	0,0143	0,0011	0,8742	0,2914
	AE%	87,9	-	91,7	95,7	-	-
Estação	F	50,6	67,1	2,7	0,3	37,0	18,9
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,1028	0,5661	< 0,0001	0,0001
	AE%	99,0	99,3	-	-	98,6	97,3
Adub.*Mat.	F	3,7	3,8	2,7	2,4	4,9	1,9
	p	0,0092	0,0076	0,0345	0,0575	0,0016	0,1202
	AE%	85,4	85,8	79,3	-	89,2	-
Adub.*Est.	F	5,2	4,7	6,7	5,2	2,9	7,8
	p	0,0012	0,0023	0,0001	0,0011	0,0272	< 0,0001
	AE%	89,9	88,7	92,2	89,9	80,9	93,4
Mat.*Est.	F	6,0	12,3	2,1	1,7	0,1	5,5
	p	0,0171	0,0008	0,1552	0,1948	0,7877	0,0221
	AE%	91,3	95,8	-	-	-	90,5

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO E — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estquia de duas populações de *I. paraguariensis* de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

FV	Análise	Sobrevivência	Calos	Enraizamento	Número de raízes	Brotação	Folhas originais
Estação	F	86,9	84,1	48,9	26,8	30,2	123,1
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
População	AE (%)	99,4	99,4	99,0	98,1	98,3	99,6
	F	137,7	107,8	52,4	38,3	55	103,5
Ambiente	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,6	99,5	99,0	98,7	99,1	99,5
Est.*Pop.	F	185,5	104,9	3,6	0,3	34,2	132,9
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,0573	0,5595	< 0,0001	< 0,0001
Est.*Amb.	AE (%)	99,7	99,5	-	-	98,5	99,6
	F	34,2	24,2	6,6	5,9	17,9	42,1
Pop.*Amb.	p	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	0,0060	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	98,5	97,9	92,1	91,1	97,2	98,8
	F	23,4	20,7	57,4	33,2	14,8	21,6
	AE (%)	97,8	97,6	99,1	98,5	96,6	97,7
	F	3,2	9,4	2,6	5,4	0,1	5,5
	p	0,0764	0,0024	0,1102	0,0208	0,7690	0,5909
	AE (%)	-	94,5	-	90,3	-	-

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO F — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de genótipos de *I. paraguariensis* da população de TB de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

Primavera							
FV	An.	Sob.	Calos	Enr.	Núm. raízes	Brot.	Folha original
Amb.	F	10,0	0,5	40,9	41,2	17,4	93,3
	p	0,0029	0,4919	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	< 0,0001
	AE (%)	94,9	-	98,8	98,8	97,1	99,5
	F	199,2	20,6	16,5	10	11,7	11,0
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,7	97,5	96,9	94,9	95,6	95,3
Gen.	F	11,4	0,8	4,7	4,6	3,1	13,4
	p	< 0,0001	0,5538	0,001	0,0012	0,0142	< 0,0001
	AE (%)	95,5	-	88,7	88,5	82,3	96,2
	Verão						
	F	1433,6	366,2	101,4	47,3	80,4	188,2
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Amb.	AE (%)	100,0	99,9	99,5	98,9	99,4	99,7
	F	149,5	45,7	7,4	10,4	2,7	50,9
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0273	< 0,0001
	AE (%)	99,7	98,9	93,0	95,1	79,3	99,0
	F	24,0	3,8	3,3	3,3	2,8	17,0
	p	< 0,0001	0,0044	0,0095	0,0088	0,0218	< 0,0001
Gen.*Amb.	AE (%)	97,9	85,8	83,5	83,5	80,2	97,0
	Outono						
	F	203,9	2,1	83,9	81,5	7,3	18,9
	p	< 0,0001	0,1554	< 0,0001	< 0,0001	0,0099	0,0001
	AE (%)	99,8	-	99,4	99,4	92,9	97,3
	F	40,2	2,2	13,5	21,3	6,0	1,1
Gen.	p	< 0,0001	0,066	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	0,2914
	AE (%)	98,7	-	96,2	97,6	91,3	30,2
	F	58,9	18,4	13,5	21,3	3,8	5,5
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0038	0,0221
	AE (%)	99,1	97,2	96,2	97,6	85,8	90,5
	Inverno						
Amb.	F	695,2	64,3	-	-	41,3	21,7
	p	< 0,0001	< 0,0001	-	-	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,9	99,2	-	-	98,8	97,7
	F	142,5	19,8	-	-	16,2	7,8
	p	< 0,0001	< 0,0001	-	-	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,6	97,4	-	-	96,9	93,4
Gen.*Amb.	F	109,4	17,3	-	-	11,4	6,5
	p	< 0,0001	< 0,0001	-	-	< 0,0001	0,0001
	AE (%)	99,5	97,1	-	-	95,5	92,0

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO G — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de genótipos de *I. paraguariensis* da população de UR de acordo com a estação do ano em dois ambientes de enraizamento

Primavera							
FV	An.	Sob.	Calos	Enr.	Núm. raízes	Brot.	Folha original
Amb.	F	56,7	38,7	0,5	0,6	50,6	4,9
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,4705	0,4274	< 0,0001	0,0321
	AE (%)	99,1	98,7	-	-	99,0	89,2
	F	228,5	99,8	12,3	9,6	78,5	47,3
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,8	99,5	95,8	94,6	99,4	98,9
Gen.	F	7,4	7,3	0,7	1,2	12,3	0,9
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,6767	0,3266	< 0,0001	0,4811
	AE (%)	93,0	92,9	-	-	95,8	-
	Verão						
	F	2070,2	345,2	98,0	43,7	19,1	499,6
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	< 0,0001
Amb.	AE (%)	100,0	99,9	99,5	98,8	97,3	99,9
	F	132,5	31,9	22,4	15,7	28,8	28,7
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,6	98,4	97,7	96,8	98,2	98,2
	F	67,2	6,7	8,3	9,4	2,1	16,3
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0779	< 0,0001
Gen.*Amb.	AE (%)	99,3	92,2	93,8	94,5	-	96,9
Outono							
F	820,9	235,6	13,4	9,8	1,8	149,5	
p	< 0,0001	< 0,0001	0,0007	0,0031	0,1812	< 0,0001	
AE (%)	99,9	99,8	96,2	94,8	-	99,7	
F	158,4	51,3	4,3	3,1	0,7	50,3	
Gen.	p	< 0,0001	< 0,0001	0,0019	0,0131	0,6845	< 0,0001
	AE (%)	99,7	99,0	87,6	82,3	-	99,0
	F	63,1	26,5	5,7	3,1	1,6	22,2
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	0,0131	0,1776	< 0,0001
	AE (%)	99,2	98,1	90,8	82,3	-	97,7
	Inverno						
Amb.	F	455,6	61,7	-	-	36,4	32,8
	p	< 0,0001	< 0,0001	-	-	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,9	99,2	-	-	98,6	98,5
	F	93,0	22,8	-	-	12,8	8,5
	p	< 0,0001	< 0,0001	-	-	< 0,0001	< 0,0001
	AE (%)	99,5	97,8	-	-	96,0	93,9
Gen.*Amb.	F	45,2	14,2	-	-	5,6	6,9
	p	< 0,0001	< 0,0001	-	-	0,0003	< 0,0001
	AE (%)	98,9	96,4	-	-	90,6	92,5

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO H — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estaquia de brotações obtidas de *I. paraguariensis*.

FV	Análise	Sobrevivência	Calos	Enraizamento	Número de raízes	Brotação	Folha original
Origem	F	169,1	220,0	< 0,1	0,2	22,3	3,1
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,8076	0,6330	0,0003	0,0986
	AE (%)	99,7	99,8	-	-	97,7	-

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO I — Significância estatística das variáveis observadas para a fonte de variação do experimento de estabelecimento *in vitro* de uma população de *I. paraguariensis* sob diferentes lâmpadas LED

FV	Análise	Oxidação	Bactéria	Fungo
LED	F	4,7	1,2	3,2
	p	0,0100	0,3469	0,0400
	AE%	88,7	-	82,9

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO J — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estabelecimento *in vitro* de duas populações de *I. paraguariensis* sob diferentes lâmpadas LED

FV	Análise	Oxidação	Bactéria	Fungo
Pop.	F	1,0	5,7	< 0,1
	p	0,3155	0,0227	0,9411
	AE%	-	90,8	-
LED	F	0,2	1,4	0,5
	p	0,8995	0,2571	0,7065
	AE%	-	-	-
Pop.*LED.	F	0,7	4,4	3,7
	p	0,5757	0,0107	0,0206
	AE%	-	87,9	85,4

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO K — Significância estatística das variáveis observadas para as fontes de variação do experimento de estabelecimento in vitro de duas populações de *I. paraguariensis* com uso de material revigorado sob diferentes lâmpadas LED

FV	Análise	Oxidação	Bactéria	Fungo
Pop.	F	31,4	14,9	9,4
	p	< 0,0001	0,0008	0,0054
	AE%	98,4	96,6	94,5
LED	F	2,0	4,7	1,3
	p	0,1362	0,0102	0,3077
	AE%	-	88,7	-
Pop.*LED.	F	0,3	2,0	0,7
	p	0,8539	0,1392	0,5710
	AE%	-	-	-

Em que: F: valor de F obtido da ANOVA; p: probabilidade de erro obtido pela ANOVA; AE%: acurácia experimental obtida para variáveis significativas à 5% de probabilidade de erro ($p < 0,0050$). Fonte: Elaborado pelo autor (2022).