

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Enraizamento e atividades enzimáticas associadas à forma de aplicação e doses de ácido indolbutírico em estacas de erva-mate

Laura Tres

Passo Fundo

2019

Laura Tres

Enraizamento e atividades enzimáticas associadas à forma de aplicação e doses de ácido indolbutírico em estacas de erva-mate

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Agronomia.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Augusto Nienow

Coorientadora:

Profa. Dra. Jurema Schons

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

T796e Tres, Laura

Enraizamento e atividades enzimáticas associadas à forma de aplicação e doses de ácido indolbutírico em estacas de erva-mate / Laura Tres. – 2019.

96 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Nienow.

Coorientadora: Profa. Dra. Jurema Schons.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. Erva-mate. 2. Ácido indolbutírico. 3. Plantio (Cultivo de plantas). 4. Plantas - Propagação por estaquia. I. Nienow, Alexandre Augusto, orientador. II. Schons, Jurema, coorientadora. III. Título.

CDU: 633.77

ATA DE DEFESA DE TESE



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

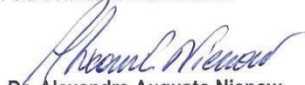
“Enraizamento e atividades enzimáticas associadas à forma de aplicação e doses de ácido indolbutírico em estacas de erva-mate”

Elaborada por

Laura Tres

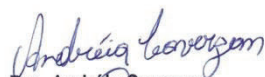
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”

Aprovada em: 26/08/2019
Pela Comissão Examinadora



Dr. Alexandre Augusto Nienow
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador


Dr. Milton Manóvani
UFSM – CESNORS FW


Dra. Jurema Schons
Coorientadora


Dra. Andréia Caverzan
UPF


Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Coordenador PPGAgro


Dr. Cristiano Roberto Buzatto
UPF


Dr. Eraldo Lourenço Zanella
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária,
Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

Aos meu pais Hilário e Mariliza, meu irmão Lucas.

Obrigada por me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar e guiar minha trajetória em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Hilário e Mariliza, e ao meu irmão Lucas, pela confiança e incentivo à busca deste sonho, pela compreensão, ajuda, ensinamentos e valores. Sem vocês nada disso seria possível. À minha sobrinha Bianca pelo amor e por tornar meus dias mais felizes. À toda minha família, pelo carinho e apoio.

Ao meu namorado Emanuel, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Augusto Nienow, pela oportunidade em ser sua orientada, pela confiança, ensinamentos, profissionalismo, dedicação e atenção na orientação deste trabalho.

À minha coorientadora Profa. Dra. Jurema Schons, pelos ensinamentos, contribuição, esforço e profissionalismo dedicados a este trabalho.

Aos professores do PPGAgro pelos conhecimentos transmitidos, pela contribuição na minha formação profissional e pessoal.

À Universidade de Passo Fundo pela oportunidade de participar do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro).

Aos colegas do PPGAgro, pelas experiências compartilhadas.

Aos colegas e amigos Sabrina, Djulia e Leonardo pela amizade, cumplicidade, apoio e ajuda, por tantos momentos compartilhados. Às amigas Milena, Bruna e Aline pelo incentivo, compreensão e amizade.

A todos os meus amigos, pela compreensão e pelo incentivo em mais esta etapa.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram em mais esta etapa da minha vida.

Obrigada!

“Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

TRES, Laura. Enraizamento e atividades enzimáticas associadas à forma de aplicação e doses de ácido indolbutírico em estacas de erva-mate. 2019. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

As mudas de erva-mate são produzidas principalmente a partir de sementes, o que resulta em plantas com heterogêneas características fenotípicas, de desenvolvimento e qualidade do produto final. A propagação vegetativa por estaquia é uma alternativa para a implantação de ervais mais uniformes e produtivos. O processo de enraizamento adventício é influenciado por inúmeros fatores, como a época de estaquia, a presença natural de auxinas ou o tratamento com fitorreguladores, e a ação de enzimas oxidativas. O ácido indolbutírico (AIB) tem demonstrado ser eficiente na indução do enraizamento em erva-mate, porém, há evidências de efeitos de fitotoxidez ou estresse. O objetivo da pesquisa foi avaliar se a dose e a forma de aplicação de AIB influenciam o potencial de enraizamento de estacas de diferentes genótipos de erva-mate, realizando a estaquia em diferentes épocas, e que possíveis mudanças podem ocorrer nas atividades enzimáticas durante o processo. A estaquia foi realizada no verão/outono (janeiro a abril) e na primavera (setembro a dezembro) e conduzida por 90 dias. Foram avaliados quatro genótipos (G4, G15, G26 e G28) selecionados em um erval comercial, tratadas as estacas com AIB aplicado na forma de pó (2.000 e 4.000 mg kg⁻¹) e em solução hidroalcoólica (2.000 e 4.000 mg L⁻¹), comparando com estacas não tratadas. Na estaquia de verão também foram avaliadas as alterações nos níveis de atividade da peroxidase, polifenoloxidase e AIA oxidase, imediatamente após o plantio e a cada sete dias, até os 35 dias de estaquia. A estaquia no verão/outono (janeiro) é mais indicada que na primavera (setembro), com destaque nas duas épocas para os genótipos G4 e G26, com maior porcentagem de estacas enraizadas e desenvolvimento do sistema radicial. As formas e doses de aplicação do AIB não alteraram as taxas de enraizamento, mas a forma de pó pode ser uma alternativa para obter melhores taxas de retenção foliar e de sobrevivência, inclusive em doses mais elevadas, oportunizando maior qualidade do sistema radicial. A acentuada queda de folhas nas três a quatro primeiras semanas, considerado o período mais crítico, apresenta relação com a elevação da atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, mas o grau de respostas difere de acordo com o genótipo, forma de aplicação e, principalmente, a dose de AIB. A atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, em relação às estacas não tratadas, não é maior ao submeter aos tratamentos com AIB. A atividade da AIA oxidase apresenta um pico nos primeiros sete dias de estaquia, decrescendo posteriormente. Em erva-mate não é possível estabelecer, nos primeiros 35 dias, a relação da atividade das enzimas com os resultados obtidos de enraizamento.

Palavras-chave: 1. *Ilex paraguariensis*. 2. Estaquia. 3. Peroxidase. 4. Polifenoloxidase. 5. AIA oxidase.

ABSTRACT

TRES, Laura. Rooting and enzymatic activities associated with the application form and doses of indolbutyric acid in mate herb cuttings. 2019. 96 f. Thesis (Doctor in Agronomy) - University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

Mate herb seedlings are mainly produced from seeds, which results in plants with heterogeneous characteristics related to the phenotype, development and quality of the final product. The vegetative propagation by cutting is an alternative for the implantation of more uniform and productive herbs. The process of adventitious rooting is influenced by many factors, such as the cutting season, the natural presence of auxins or the treatment with phytohormones and the action of oxidative enzymes. Indolbutyric acid (IBA) has been shown to be efficient in inducing rooting in mate herb, but there are evidences of phytotoxicity or stress effects. The objective of this research was to evaluate if the dose and the application form of IBA influence the rooting potential of cuttings of different mate herb genotypes, performing the cutting at different times and detecting what possible changes may occur in enzymatic activities during the process. The cutting was performed in the summer/fall (January to April) and in the spring (September to December) and conducted for 90 days. Four genotypes (G4, G15, G26 and G28), which were selected in a commercial place with mate herb cultivation, were assessed and the cuttings were treated with IBA applied as talc powder (2,000 and 4,000 mg kg⁻¹) and in hydroalcoholic solution (2,000 and 4,000 mg L⁻¹), compared to untreated cuttings. During the summer cutting season, changes in activity levels of peroxidase, polyphenoloxidase and IAA oxidase were also evaluated immediately after planting and repeated every seven days until 35 days after cutting. Cutting in summer/fall (January) is more indicated than in spring (September), with emphasis on the G4 and G26 genotypes, that presented higher percentage of rooted cuttings and development of the root system in both seasons. The forms and doses of IBA application did not change rooting rates, but the powder form may be an alternative to obtain better leaf retention and survival rates, even at higher doses, providing a better quality of the root system. The intense fall of leaves in the first three to four weeks, which is considered the most critical period, is related to the increased activity of peroxidase and polyphenoloxidase enzymes, but the degree of responses differs according to the genotype, IBA application form and, mainly, by the IBA dose. The peroxidase and polyphenoloxidase activities in relation to untreated cuttings, are not higher when subjected to IBA treatments. IAA oxidase activity peaks in the first seven days of cuttings, decreasing thereafter. In mate herb, it is not possible to establish, in the first 35 days, the relationship between enzyme activity and rooting results.

Key words: 1. *Ilex paraguariensis*. 2. Cutting. 3. Peroxidase. 4. Polyphenol oxidase. 5. IAA oxidase.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>Erva-mate: aspectos gerais</i>	16
2.2	<i>Propagação da erva-mate</i>	18
2.2.1	Propagação sexuada	18
2.2.2	Propagação vegetativa	19
2.2.2.1	Estaquia	20
2.3	<i>Hormônios envolvidos na propagação por estaquia</i>	23
2.3.1	Auxinas	24
2.3.2	Hormônios vegetais envolvidos no enraizamento adventício em interação com auxina	29
2.4	<i>Alterações nos níveis de atividade de enzimas durante a formação de raízes adventícias</i>	31
2.4.1	Peroxidase	31
2.4.2	Polifenoloxidase	33
2.4.3	AIA Oxidase	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	<i>Material vegetal</i>	36
3.2	<i>Local e período de execução da pesquisa</i>	36
3.3	<i>Estudo 1: Forma de aplicação e doses de AIB na estaquia de erva-mate em diferentes épocas</i>	37
3.3.1	Tratamentos e delineamento experimental	37
3.3.2	Procedimentos	37
3.3.3	Avaliações	39
3.3.4	Análise dos dados	39
3.4	<i>Estudo 2: Atividades enzimáticas em estacas de erva-mate associadas à doses e forma de aplicação de AIB</i>	39
3.4.1	Procedimentos	40
3.4.1.1	Determinação da atividade da peroxidase	40
3.4.1.2	Determinação da atividade da polifenoloxidase	41
3.4.1.3	Determinação da atividade da AIA oxidase	42
3.4.2	Análise dos dados	42

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	<i>Estudo 1: Forma de aplicação e doses de AIB na estaquia de erva-mate em diferentes épocas</i>	43
4.1.1	Estaquia de verão/outono	43
4.1.2	Estaquia de primavera	56
4.2	<i>Estudo 2: Atividades enzimáticas em estacas de erva-mate associadas à doses e forma de aplicação de AIB</i>	69
4.2.1	Peroxidase	69
4.2.2	Polifenoloxidase	74
4.2.3	AIA oxidase	79
5	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma espécie arbórea nativa do Brasil, Argentina e Paraguai de grande importância econômica, ambiental, social e cultural. É cultivada principalmente em pequenas propriedades rurais, gerando renda e mão-de-obra, contribuindo para a permanência do produtor no meio rural. Por ser uma espécie nativa, pode ser utilizada para a recomposição de Áreas de Preservação Permanente e de Reserva Legal nas propriedades rurais.

A colheita de erva-mate se dá por extrativismo, a partir de plantas nativas mantidas nas propriedades, ou cultivada, de ervais implantados. Os plantios podem ser no sistema solteiro (apenas a erva-mate), consorciados com outras culturas agrícolas ou em sistemas agroflorestais (SAFs), intercalando outras espécies arbóreas, com o objetivo de causar certo grau de sombreamento para a melhoria da qualidade da folha produzida, a alternativa considerada mais sustentável e ambientalmente recomendada.

Consumida tradicionalmente na forma de chimarrão, tereré e chá de mate, as folhas apresentam propriedades que possibilitam a utilização para a produção de medicamentos, alimentos, bebidas, cosméticos, dentre outros nichos de mercado em grande expansão. Cada produto requer qualidades específicas da erva-mate, consequentemente, demanda materiais de melhor qualidade genética e produtividade.

A produção de mudas de erva-mate de boa qualidade está entre os maiores desafios da cadeia produtiva. As mudas são produzidas principalmente a partir de sementes, sem seleção das melhores plantas, o que resulta em plantios com desenvolvimento heterogêneo, com reflexos negativos na produtividade e qualidade do produto final. Este fato, por si só, justifica a variabilidade observada nos ervais comerciais. Porém, no caso da erva-mate, se soma o fato de ser uma espécie dioica, com plantas carpeladas e plantas estaminadas, necessitando de fecundação cruzada. Além disso, a germinação das

sementes é baixa e desuniforme, sendo necessário um longo período de estratificação para a quebra da dormência.

A propagação vegetativa é o método mais utilizado para a propagação comercial de espécies florestais e apresenta-se como uma alternativa para a produção de mudas erva-mate. A estaquia mostra-se como a mais viável pela facilidade de execução, menor custo, possibilidade de obtenção de um maior número de mudas em menor período de tempo e manutenção das características genéticas das plantas matrizes. Para tanto, é fundamental a seleção de plantas matrizes com capacidade genética de enraizamento e características agronômicas desejáveis, como produtividade, qualidade da matéria-prima, resistência à pragas e doenças, e composição química de interesse do mercado que a demanda.

O principal ponto crítico para o sucesso na propagação por estaquia é a formação de raízes adventícias. Mas é fundamental, também, que o sistema radicial apresente uma qualidade que proporcione bom pegamento no campo e desenvolvimento das plantas. O processo de formação de raízes adventícias é determinado por fatores genéticos, fisiológicos, bioquímicos e anatômicos, sendo que o fitohormônio auxina desempenha papel crucial.

Na estaquia de erva-mate, a aplicação exógena de auxinas, especialmente o ácido indolbutírico (AIB), tem demonstrado ser eficiente na indução de raízes em estacas, porém os resultados obtidos variam com o material genético, época de realização da estaquia, tipo de estaca, doses e formas de aplicação do fitorregulador, entre outros fatores. No entanto, alguns estudos têm demonstrado um possível efeito fitotóxico do AIB, afetando negativamente a retenção de folhas e sobrevivência das estacas, e por consequência os resultados de enraizamento.

Entre os fatores que podem influenciar o enraizamento adventício, as auxinas e as enzimas oxidativas são os mais estudados e discutidos (PORFIRIO et al., 2016). Durante o enraizamento ocorrem mudanças na atividade de algumas enzimas oxidativas que resultam na indução ou inibição da formação de raízes. A peroxidase, a polifenoloxidase e a AIA oxidase são enzimas que reconhecidamente desempenham um importante papel

nas diferentes fases do processo de formação de raízes adventícias, constatado em diversos estudos, com diferentes espécies.

O processo de enraizamento adventício consiste em três fases: indução, iniciação e expressão (HUSEN et al., 2015; ZHANG et al., 2017), onde ocorrem mudanças fisiológicas e anatômicas. As alterações na atividade de enzimas vem sendo utilizadas como marcadores bioquímicos das diferentes fases do processo. O estudo destas alterações pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos.

Assim, buscou-se com esta pesquisa avaliar se a dose e a forma de aplicação de AIB influenciam o potencial de propagação por estaquia de genótipos de erva-mate, em diferentes épocas, e verificar as mudanças nas atividades da peroxidase, polifenoloxidase e AIA oxidase. A hipótese proposta é de que a dose e a forma de aplicação do AIB oportunizam resultados diferenciados de enraizamento de estacas de acordo com o genótipo e a época de estaquia, proporcionando alterações na atividade das enzimas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Erva-mate: aspectos gerais

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., pertencente à família Aquifoliaceae, é conhecida popularmente como erva-mate, erveira, pau-de-erva, caúna, congonha ou erva-piriquita. É uma espécie arbórea característica da Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária), sempre em associações nitidamente evoluídas com o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). É encontrada naturalmente no Brasil, Argentina e Paraguai (CARVALHO, 2003, p. 457-459). No Brasil, ocorre nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (CARVALHO, 2003, p. 459). No Rio Grande do Sul, sua distribuição abrange principalmente a região Centro-Oeste. No Paraná, ocorre desde a região Centro-Sul e Sudoeste, até a Serra do Mar, exceto no litoral. Ocorre também no Sul do Mato Grosso do Sul, nos vales de Dourados, Brillhante e em outros municípios sulinos. Pode ocorrer com pouca frequência em São Paulo, aparecendo em áreas localizadas no Sudoeste do Estado, onde são encontradas manchas de floresta com araucária (DA CROCE; FLOSS, 1999).

A erva-mate possui tronco cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, com copa baixa e altura variável. Quando cultivada varia entre 3 e 5 m, podendo atingir até 30 m na floresta. Suas folhas são do tipo simples, alternas, geralmente estipuladas, subcoriáceas até coriáceas, glabras, verde-escuras na face adaxial e mais claras na face abaxial, ápice obtuso, margem irregularmente serrilhada ou dentada da porção mediana até a porção superior, e base lisa, comumente com 5 a 10 cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura (CARVALHO, 2003, p. 457-458).

É uma espécie dioica, de fecundação cruzada. Ainda que em todas as flores se encontrem estames e pistilos, nas flores femininas os estames não são funcionais, e nas

masculinas, o pistilo aborta. São pequenas, brancas e pouco vistosas, dispostas em inflorescências cimosas de até cinco flores e axilares. A floração ocorre entre os meses de setembro a dezembro (CARVALHO, 2003, p. 458; DA CROCE; FLOSS, 1999; GROppo; PIRANI, 2005).

Os frutos são do tipo drupa, globosos, com mesocarpo carnoso, endocarpo ósseo-envolvendo a semente, de 4 a 6 mm de diâmetro (CARVALHO, 2003, p. 458). Apresentam coloração verde quando imaturos e vermelho-arroxeados quando maduros, com quatro sementes envoltas em uma polpa gelatinosa (DA CROCE; FLOSS, 1999).

A erva-mate é uma das espécies arbóreas nativas mais importantes economicamente para a região sul do Brasil, cultivada principalmente em pequenas propriedades (HETTWER; NIENOW; SCHONS, 2017). É um dos principais produtos florestais não madeireiros do país (ALMEIDA et al., 2009), atingindo uma produção de 354.398 toneladas em 2017, ficando atrás apenas do açaí em valor de produção (IBGE, 2017).

É utilizada na América do Sul principalmente como bebida tônica e estimulante, desde o período pré-colombiano (DANIEL, 2009, p. 55). Sua principal utilização está no preparo do chimarrão, do tereré e do chá mate, através da infusão do produto industrializado, obtido pela trituração das folhas e ramos (VIDOR et al., 2002; MEINHART et al., 2010). Os extratos, essências e concentrados de erva-mate são utilizados em indústrias de bebidas, corantes naturais, cosméticos, higiene e limpeza (ALMEIDA, 2007), nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (HELM et al., 2017).

A erva-mate apresenta diversos benefícios à saúde humana devido à presença de polifenóis, saponinas, minerais, vitaminas, flavonoides, aminoácidos e metilxantinas. Estudos demonstram benefícios relacionados ao consumo de erva-mate como o combate de radicais livres, o efeito estimulante, terapêutico, diurético, antirreumático, laxante, no auxílio da digestão, perda de peso, tratamento de diabetes, antimutagênica e hipoglicêmica (HELM et al., 2017), na proteção dos sistemas biológicos do estresse

oxidativo, ações anticancerígenas e cardioprotetoras, envolvendo a presença de compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes (DUTRA; SILVA, 2009).

Os mais conhecidos componentes químicos presentes na erva-mate são os alcaloides e os taninos. Os alcaloides são as metilxantinas, cafeína, teobromina e teofilina. O teor de cafeína encontrado na erva-mate não é inferior ao do café, podendo alcançar até 2,2 % nas folhas novas, diminuindo nas folhas mais velhas, variando com o genótipo e a forma de cultivo. A cafeína é responsável pela ação estimulante do chimarrão ou do chá-mate (CARVALHO, 2003, p. 464).

Também é uma espécie de grande importância ambiental, utilizada no paisagismo, na recuperação de áreas degradadas e na recomposição florestal (LORENZI, 2002, p. 31). Ainda, o cultivo da erva-mate, associada à outras espécies florestais, conhecido como sistema agroflorestal, apresenta significativa importância na capacidade de sequestro de carbono pela biomassa produzida, além de diminuir a erosão (CORRÊA et al., 2009).

2.2 Propagação da erva-mate

2.2.1 Propagação sexuada

A produção de mudas de erva-mate é feita predominantemente a partir de sementes, pela maior facilidade de produção, domínio desta tecnologia pelos produtores e utilização de estruturas de menor custo, se comparada à propagação vegetativa (WENDLING; BRONDANI, 2015, p. 11-12). Porém, as sementes utilizadas são provenientes de ervais nativos ou implantados, geralmente sem qualquer critério de seleção, o que resulta em alta taxa de mortalidade de mudas, ervais com desenvolvimento heterogêneo e baixa qualidade da massa foliar (STURION; RESENDE, 2010, p. 15-16). Além disso, a espécie é dioica, de polinização cruzada, o que resulta em grande variabilidade nas mudas (MAYER, 2018).

Outro fator limitante na propagação por sementes é a baixa e desuniforme germinação, inferior à 20%, exigindo longo período de estratificação das sementes para a quebra da dormência, que varia de quatro a seis meses (SÁ et al., 2018). A dormência está relacionada com a imaturidade do embrião na época de coleta dos frutos e ao endocarpo lenhoso. Para uma germinação mais uniforme, é empregada a estratificação com camadas alternadas de areia e sementes, mantendo-se umidade constante (STURION; RESENDE, 2010, p. 251). Esses problemas na produção de mudas via seminal, podem ser minimizados ou até solucionados pela propagação vegetativa de indivíduos geneticamente superiores (WENDLING, 2004).

2.2.2 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa é um dos mais importantes métodos de reprodução comercial de espécies florestais e hortícolas. A capacidade das plantas de se reproduzir vegetativamente está na capacidade das células vegetais para desdiferenciar (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014), e células diferenciadas iniciam divisões formando uma nova região de crescimento meristemático (HARTMANN et al., 2002, p. 278), para em seguida rediferenciar, formando novos órgãos que irão regenerar uma nova planta.

A erva-mate pode ser propagada vegetativamente por alporquia, enxertia, micropropagação, estaquia e miniestaquia (WENDLING et al., 2009). Dentre os métodos de propagação, a estaquia apresenta-se como uma técnica de baixo custo e de fácil execução; possibilita que se obtenha muitas mudas a partir de uma única planta matriz em um curto espaço de tempo; maior uniformidade dos plantios; e clones mais produtivos, com qualidades dirigidas às necessidades do mercado consumidor (FACHINELLO et al., 2005, p. 70, DANIEL, 2009, p. 121).

2.2.2.1 Estaquia

A propagação clonal por meio da estaquia é um dos métodos de propagação vegetativa mais relevantes, devido à simplicidade em relação às outras técnicas, largamente reconhecida como um método viável economicamente para o estabelecimento de plantios clonais (DIAS et al., 2015; PORFIRIO et al., 2016). O sucesso na estaquia depende, dentre outros fatores, da habilidade das estacas em formarem raízes adventícias (PORFIRIO et al., 2016), um processo determinado por fatores genéticos, fisiológicos, anatômicos e bioquímicos (ILCZUK; JACYGRAD, 2016).

Para que um segmento de planta, geralmente de caule ou folha, poder viver de forma independente, após separado da planta mãe, a regeneração e desenvolvimento de novas raízes é indispensável. Estas raízes, que iniciam pós-embriologicamente a partir de órgãos que não sejam raízes, são chamados de raízes adventícias (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). A viabilidade de uso da propagação por estaquia depende da capacidade de cada espécie e/ou cultivar formar raízes adventícias, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento posterior da planta propagada (PEÑA et al., 2012).

As raízes adventícias são formadas a partir de células com potencial meristemático, e podem ter origem em condições de estresse ambiental (DA COSTA, 2015; LI et al., 2009), enquanto que as raízes laterais são tipicamente formadas a partir do periciclo de raízes pré-existentes (DA COSTA, 2015). Duas vias podem originar raízes adventícias: organogênese direta, quando ocorre diretamente a partir de tecidos, para estabelecimento de alguns tipos de células como o câmbio, córtex, periciclo ou feixes vasculares; e organogênese indireta, quando o processo é precedido pela formação de calo, formado em consequência de danos mecânicos induzidos pela preparação do explante (LI et al., 2009; PORFIRIO et al., 2016).

Nas estacas caulinares, a iniciação de primórdios radiciais é observada principalmente próximo à superfície de corte ou em um ponto onde os feixes vasculares

se cruzam com o câmbio (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). Uma vez que o corte é feito, as raízes adventícias emergem de um grupo de células capazes de se desdiferenciar e se tornarem meristemáticas. Este grupo de células, localizado em diferentes tecidos do caule, dependendo da espécie, se rediferenciarão em primórdio de raiz e, posteriormente, formarão as raízes adventícias. Depois de emergir, as raízes adventícias se comportam como uma raiz embrionária, dando origem a novas raízes laterais (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009).

Isso ocorre pois, em resposta a estresses, como ferimentos ou a infecção por patógenos, as plantas formam massas celulares desorganizadas, como calos ou tumores (IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE; 2013). As raízes formadas nas estacas também podem ser uma resposta à lesão causada no preparo das mesmas. Sempre que as células vivas são feridas e expostas no momento do corte, uma resposta a esse ferimento inicia. A cicatrização consiste na formação de uma capa de suberina que reduz a desidratação e protege de patógenos. As células vivas começam a se dividir, e uma massa de células do parênquima forma um tecido pouco diferenciado, desorganizado e em diferentes etapas de lignificação, denominado calo, o que representa o início do processo de regeneração. Certas células próximas ao câmbio vascular e ao floema se dividem e iniciam a formação de raízes adventícias (FACHINELLO et al., 2005, p. 72; HARTMANN et al., 2002, p. 281-282). A formação de calo indica condições favoráveis à formação de raízes, uma vez que as condições internas e ambientais requeridas para que estes processos ocorram são similares (HARTMANN et al., 2002, p. 286).

O processo de indução de raízes é composto de muitas fases, onde ocorrem mudanças fisiológicas e anatômicas (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). Este processo consiste em três fases: indução, iniciação e expressão (HUSEN et al., 2015; ZHANG et al., 2017). A fase de indução compreende eventos moleculares e bioquímicos, sem mudanças visíveis; a fase de iniciação é caracterizada por divisões celulares e organização dos primórdios radiciais; e a fase de expressão representa o crescimento intra-caulinar do primórdio radicial e a emergência de raízes (HUSEN et al., 2015).

A duração de cada fase do processo de formação de raízes depende da espécie, podendo ser variável entre cultivares da mesma espécie, e está relacionado, entre outros fatores, com o nível de reguladores de crescimento endógenos e exógenos (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). Em microestacas de *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. foram verificadas quatro fases em observações histológicas: indução (1-2 dias), iniciação (2-3 dias), organização do primórdio radicular (3-4 dias) e alongação e emergência de raízes (4-5 dias) (GOEL; KAUR; KUMAR, 2018).

Observando características morfológicas, Zhang et al. (2017) identificaram quatro fases na formação de raízes adventícias em estacas de *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehder: pré-emergência (até 18 dias após o estaqueamento), fase inicial à formação de raízes (27-36 dias), formação massiva de raízes (45-54 dias) e fase posterior à formação de raízes (63-72 dias), cada fase com distintas características morfológicas. As características da fase de pré-emergência foram a formação e aumento de calos; da fase inicial à formação de raízes a emergência de raízes adventícias jovens através da epiderme na base da estaca, ao invés de calo; da fase de formação massiva de raízes o aumento do número de raízes adventícias e a emergência de raízes laterais; e a mais importante característica da fase posterior à formação de raízes foi a formação da estrutura principal do sistema de raízes laterais.

Diversos fatores influenciam o sucesso da estaquia, classificados em endógenos, como o balanço hormonal, a condição fisiológica e a idade da planta matriz, a época realização da estaquia, o tipo de estaca e as características genéticas; e exógenos, como a umidade, a temperatura, a luz, o tipo de substrato, o tratamento com fitorreguladores e respostas associadas ao estresse, entre outros (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009; FACHINELLO et al., 2005, p. 78; PAIVA; GOMES, 2005).

De modo geral, estacas com folhas enraízam mais rapidamente que as sem folhas. A presença de folhas é importante devido à produção de carboidratos necessários para o desenvolvimento de raízes (HARTMANN et al., 2002, p. 294). Além disso, compostos promotores do enraizamento, como auxinas e cofatores sintetizados nas folhas são transportados através do floema para a base das estacas, e tem um efeito estimulante ao

enraizamento (HARTMANN et al., 2002, p. 294; ROBERT; FRIML, 2009). Para a erva-mate, a relação positiva da presença e retenção das folhas com a sobrevivência e, conseqüentemente, com a porcentagem de estacas enraizadas tem sido verificada em trabalhos de pesquisa (SANTOS, 2011; HETTWER, 2013; TRES, 2016; MAYER, 2018).

A época do ano pode afetar o enraizamento de estacas, pois as variações sazonais influenciam nas condições fisiológicas da planta matriz (PEÑA; ZANETTE; BIASI, 2015), como conteúdo de água e teor de reservas e nutrientes (FACHINELLO et al., 2005, p. 81). Maiores reservas de carboidratos correlacionam-se com maiores porcentagens de sobrevivência e enraizamento de estacas (FACHINELLO et al., 2005, p. 78; STENVALL et al., 2009), pelo fato de que a auxina necessita uma fonte de carbono para a biossíntese dos ácidos nucléicos e proteínas para a formação de raízes (FACHINELLO et al., 2005, p. 78).

Além disso, a época de coleta está relacionada com a consistência das estacas, pois estacas coletadas no período de crescimento (primavera/verão) apresentam-se mais herbáceas e, de forma geral, mostram melhor capacidade de enraizamento. Estacas coletadas no período de repouso vegetativo (inverno) apresentam-se mais lignificadas e tendem a enraizar menos. Por outro lado, estacas menos lignificadas, herbáceas e semilenhosas são mais propícias à desidratação e à morte, requerendo um manejo mais adequado em relação ao ambiente, principalmente de temperatura e umidade (FACHINELLO et al., 2005, p. 81).

2.3 Hormônios envolvidos na propagação por estaquia

Os hormônios vegetais são moléculas sinalizadoras, responsáveis por efeitos marcantes no desenvolvimento das plantas em concentrações muito pequenas (TAIZ; ZEIGER, 2004, p. 449). Os fitohormônios desempenham um papel complexo no processo de enraizamento adventício, exercendo efeitos diretos, atuando na divisão celular ou crescimento celular, ou indiretos, interagindo com outras moléculas ou fitohormônios (LI et al., 2009).

A aplicação de reguladores de crescimento, principalmente auxinas, tem sido utilizada para favorecer o processo de enraizamento adventício em muitas espécies (FERREIRA et al., 2010). Um grande número de evidências indica que outros hormônios interagem com a sinalização da auxina para regular o desenvolvimento de raízes adventícias (GUAN et al., 2015). A auxina e o etileno são mais frequentemente descritos como ativadores, enquanto que as citocininas e giberelinas geralmente atuam como inibidores da formação de raízes adventícias (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009). De um modo geral, uma concentração equilibrada de auxina e citocinina promove a indução de calo, enquanto uma alta proporção de auxina em relação à citocinina promove raízes, e de citocinina em relação à auxinas induz brotos (IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013).

2.3.1 Auxinas

As auxinas são hormônios vegetais produzidos principalmente nas regiões apicais que, transportadas através das células do parênquima para outros locais da planta, participam do crescimento e diferenciação (TAIZ; ZEIGER, 2013, p. 544-549). As auxinas são os únicos fitormônios transportados polarmente, unidirecionalmente do ápice para a base das plantas. O movimento polar da auxina ocorre célula a célula, e não pelo simplasto celular. O ácido indolacético (AIA) deixa a célula pela membrana plasmática, difundindo-se para as paredes primárias próximas, passando para a célula imediatamente abaixo. Assim, o enraizamento acontece devido ao acúmulo de AIA na porção imediatamente superior ao corte, já que o transporte é interrompido nessa região (KERBAUY, 2008, p. 203).

A auxina desempenha um papel central na formação de raízes adventícias (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009; GUTIERREZ et al. 2012), sendo o mais eficaz estimulador exógeno usado no enraizamento de estacas de diferentes espécies (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). Auxinas induzem as células do periciclo e parênquima a se desdiferenciarem e iniciar as divisões celulares iniciais (LI et al., 2009). No entanto, a concentração hormonal necessária é variável para cada espécie, e, portanto,

diferentes espécies, e até mesmo genótipos da mesma espécie, podem responder diferentemente à aplicação de concentrações e tipos de auxinas. Respostas diferenciadas se dão pelo fato das raízes serem muito sensíveis a essas substâncias, e qualquer acréscimo além do necessário pode tornar-se inibitório à formação de raízes adventícias (FACHINELLO et al., 2005, p. 75).

Sendo assim, concentrações mais altas de auxina não necessariamente produzem melhor resultado de enraizamento (YAN et al., 2017). A resposta da planta à auxina endógena também pode variar com a concentração do hormônio de crescimento presente no tecido (FACHINELLO et al., 2005, p. 75). Em geral, altas concentrações de AIA endógeno tem um papel importante na iniciação de raízes (YAN et al., 2017).

Há uma diferença importante entre espécies consideradas de fácil e de difícil enraizamento, relacionada aos teores internos de compostos fenólicos, considerados inibidores químicos endógenos (HARTMANN et al., 2002, p. 299). Ao entrarem em contato com o oxigênio, no momento do preparo da estaca, os compostos fenólicos iniciam reações de oxidação, resultando em produtos tóxicos ao tecido vegetal (FACHINELLO et al., 2005, p. 82). Menores teores de compostos fenólicos foram relacionados com a maior capacidade de enraizamento em uma cultivar de *Paeonia suffruticosa* Andr., considerada de fácil enraizamento, enquanto cultivares de difícil enraizamento apresentaram maiores teores, demonstrando o papel ativo dos compostos fenólicos na promoção ou inibição do enraizamento (FU et al., 2011).

O AIA é a principal auxina endógena (NEGISHI et al., 2014; PORFIRIO et al., 2016), mas é relativamente instável (NEGISHI et al. 2014). O AIA está relacionado estruturalmente ao aminoácido triptofano. É sintetizado em um processo de duas etapas, primeiramente usando o indol-3-piruvato (IPyA) como intermediário, e na segunda etapa da rota executada pelo produto gênico YUCCA, uma triptofano aminotransferase (TAIZ; ZEIGER, 2017, p. 421). Existem outras auxinas naturais [ácido indol-3-butírico natural (AIB), ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético] e compostos sintéticos [ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico (Dicamba) e 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico ácido

(Picloram)] com atividade de auxina (PORFIRIO et al., 2016). Depois do AIA, o AIB é a mais abundante auxina natural (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014).

As auxinas aplicadas exogenamente têm um efeito consistente na indução do enraizamento adventício em diferentes espécies de plantas. De forma geral, estacas tratadas com auxinas exógenas enraizam mais rapidamente, produzem um sistema radicial mais consistente e resultam em maior porcentagem de enraizamento (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014).

O AIB é geralmente o fitorregulador de enraizamento mais comumente usado entre as auxinas, e o mais eficaz na indução de raízes, em comparação com o AIA (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). O melhor desempenho do AIB em relação ao AIA pode ser explicado por várias possibilidades, como maior estabilidade à luz, por diferenças no metabolismo e no transporte, e pelo fato de apresentar liberação mais lenta (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009).

A aplicação exógena de AIB sintético pode simplesmente elevar a sua condição interna, convertendo-se parcialmente em AIA no tecido vegetal, ou apresentar efeito sinérgico, modificando a ação ou a síntese do AIA, ou a sensibilidade dos tecidos ao AIA (HARTMANN et al., 2002, p. 294-295). A aplicação de AIB pode induzir mudanças na atividade de enzimas e no conteúdo de cofatores, permitindo o estabelecimento de um balanço hormonal favorável à iniciação e o desenvolvimento dos primórdios radiciais (HUSEN, 2008). Porém, em concentração celular elevada, sem controles homeostáticos, a auxina é tóxica (TAIZ; ZEIGER, 2017, p. 422).

A auxina penetra na estaca predominantemente pelo corte e, uma vez absorvida pelas células, pode sofrer conversões (KERBAUY, 2008, p. 203). O AIA e o AIB podem ser inativados irreversivelmente por oxidação, já o ANA é menos suscetível a esse processo. A regulação dos níveis de auxina também pode ser feita por conjugação do excesso para formas inativas, evitando o acúmulo de fitohormônios no tecido (DA COSTA et al., 2013). Assim, somente uma pequena parte (menos de 1%) da auxina absorvida pelo tecido permanecerá na forma livre ativa (KERBAUY, 2008, p. 203). O

sequestro de auxina em compartimentos de endomembranas, principalmente o retículo endoplasmático, também parece regular os níveis desse hormônio disponíveis para sinalização (TAIZ; ZEIGER, 2017, p. 422). A degradação de auxina por peroxidases é outro meio de controlar a atividade desses reguladores (DA COSTA et al., 2013).

Diferenças entre genótipos de fácil e difícil enraizamento pode ser atribuído a diferenças na habilidade de conjugar auxinas (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014), e/ou converter AIB e AIA (PORFIRIO et al., 2016). A aplicação exógena de AIB sintético pode elevar os teores internos do hormônio, podendo resultar na conversão para forma de AIA livre (HARTMANN et al., 2002, p. 294-295).

Tão importante quanto a concentração de auxinas é a sensibilidade das células aos hormônios para as respostas desencadeadas. Quando ocorre a percepção da auxina na célula, a expressão gênica é modificada, regulando as divisões celulares e o desenvolvimento radicial (DA COSTA, 2015). Neste processo, duas proteínas foram descritas como receptoras de auxina: a ABP1 (do inglês *auxin binding protein 1*) e a proteína TIR1 (do inglês *transport inhibition response*) (DA COSTA et al., 2013; KERBAUY, 2008, p. 207).

A proteína ABP1 não possui regiões hidrofóbicas, que é característica de proteínas de membrana. Assim, possivelmente a ABP1 se associa com uma outra proteína de membrana plasmática, transmitindo o sinal hormonal para o interior da célula. Ao ligar-se à ABP1, a auxina produz uma mudança conformacional nesta, proporcionando uma interação entre o conjunto formado (auxina + ABP1) e a proteína de membrana, que transmite o sinal da auxina para o interior da célula (KERBAUY, 2008, p. 207). ABP1 está localizada no retículo endoplasmático e no apoplasto próximo à membrana plasmática (DA COSTA, 2015), aparecendo também no complexo de Golgi (KERBAUY, 2008, p. 207).

A proteína TIR1 tem localização nuclear. Portanto, inicia respostas à auxina intracelular, fazendo a conexão direta entre a auxina e o controle da expressão de genes responsivos a esse hormônio. A auxina se acopla ao receptor TIR1, ativando uma via de

degradação proteica mediada pela proteína ubiquitina, em que a proteína a ser destruída é marcada através da conjugação com ubiquitina. A proteína marcada será destruída no proteossomo nuclear (KERBAUY, 2008, p. 208). Os fatores de transcrição Aux/AIA, que atuam como repressores transcricionais, são degradados no proteossomo via ubiquitinação (DA COSTA, 2015; KERBAUY, 2008, p. 208), liberando os fatores responsivos à auxina (*Auxin Response Factors* – ARFs) da ação repressiva dos Aux/AIAs, e promovendo assim a transcrição dos genes responsivos à auxina (SANTNER; ESTELLE, 2009).

O processo de enraizamento requer quantidades diferenciadas de auxina, dependendo de cada fase. Inicialmente, a fase de indução requer a presença de uma concentração de auxina relativamente elevada. Na fase de indução, a auxina age como o sinal para a inicialização da divisão celular e formação do novo meristema. Após a formação do primórdio radicular, a concentração de auxina, inicialmente favorável à sua indução, torna-se inibitória ao alongamento da raiz (KERBAUY, 2008, p. 203), possivelmente porque altas concentrações de auxina inibem a elongação de raízes e promovem a diferenciação celular (LI et al., 2009).

A aplicação de auxinas pode ser feita na forma de pó ou líquida, em diferentes tipos de soluções. As formulações em pó são geralmente menos eficazes do que o AIB em solução, quando comparadas as mesmas concentrações. Na forma de pó pode ser mais difícil obter um enraizamento mais uniforme, devido à variabilidade na quantidade de umidade e de pó aderida na base da estaca, a textura da estaca (áspero ou liso) e a perda do pó durante a inserção da estaca no substrato. Somente em alguns casos o AIB na forma de pó supera a utilização de soluções, por exemplo, em certas espécies do gênero *Ilex* (HARTMANN et al., 2002, p. 371). Pesquisas realizadas com erva-mate têm utilizado o tratamento com fitorreguladores na forma de solução hidroalcoólica, principalmente com AIB, com resultados positivos (GRAÇA et al., 1988; HORBACH, 2008; QUADROS, 2009; HETTWER, 2013; TEIXEIRA et al., 2017), variando as respostas de acordo com o genótipo (SANTOS, 2011; HETTWER, 2013; TRES, 2016), a época de estaquia (SANTOS, 2011; STUEPP et al., 2017; MAYER, 2018) e a dose, mas com indicação de

efeitos de fitotoxidez em determinadas doses e genótipos (SANTOS, 2011; HETTWER, 2016; HETTWER; NIENOW; SCHONS; 2017).

2.3.2 Hormônios vegetais envolvidos no enraizamento adventício em interação com auxina

O hormônio vegetal etileno tem sido descrito por participar em diversos processos de desenvolvimento das plantas, como a germinação, amadurecimento de frutos, formação de pêlos radiculares e senescência, e pode funcionar em conjunto com a auxina em alguns destes processos (IVANCHENKO; MUDAY; DUBROVSKY, 2008). O etileno promove a formação de raízes adventícias pelo aumento dos níveis de auxina (IVANCHENKO; MUDAY; DUBROVSKY, 2008; STEFFENS; WANG; SAUTER, 2006; VIDOZ et al., 2010). O etileno é sintetizado em resposta à lesão feita pelo corte e promove o desenvolvimento de raízes adventícias nos tecidos lesionados (DA COSTA et al., 2013; GUAN et al., 2015; KUROHA; SATOH, 2007).

Já de acordo com Geiss, Gutierrez e Bellini (2009), dependendo da espécie, o etileno pode promover, inibir ou não ter efeito sobre a formação de raízes. De Klerk e Hanecakova (2008) observaram que o etileno promove ou inibe o enraizamento de estacas de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, dependendo do estágio do processo de enraizamento. Um estudo em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. demonstrou que o etileno inibe a formação de raízes laterais, afetando os estágios iniciais de iniciação da raiz lateral (IVANCHENKO; MUDAY; DUBROVSKY, 2008). Também em *Arabidopsis thaliana*, Massoumi et al. (2017) observaram, após uma situação de inundação, que um incremento no enraizamento pode ocorrer devido à acumulação de etileno na estaca, por este estar relacionado com um aumento na sensibilidade à auxina.

As giberelinas geralmente são consideradas inibidoras do enraizamento adventício (DA COSTA et al., 2013). Na estaquia do híbrido *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx., a giberelina mostrou efeito inibitório no enraizamento por alterar o transporte polar de auxina (MAURIAT et al., 2014). Pacurar, Perrone e Bellini (2014) ressaltam que os efeitos das giberelinas, promovendo ou inibindo o enraizamento,

podem ser devido à variação das funções das giberelinas durante as distintas fases do processo de enraizamento.

As citocininas regulam negativamente a formação de raízes laterais e adventícias (KUROHA; SATOH, 2007). Kuroha e Satoh (2007) observaram que um tipo de citocinina (Trans-zeatina riboside) atuou como inibidor da formação de raízes adventícias em *Arabidopsis thaliana*. Diferentemente, em genótipos de *Eucalyptus globulus* Labill., os níveis de várias citocininas foram mais elevadas em genótipos com maior capacidade de enraizamento, na propagação por estaquia (NEGISHI et al., 2014).

O ácido abscísico atua como um inibidor da formação de raízes laterais (DA COSTA et al., 2013; DE SMET et al. 2003). Em *Arabidopsis thaliana*, Luo et al. (2014) observaram que o ácido abscísico inibe o crescimento radicular, promovendo a biossíntese do etileno. Na estaquia de *Eucalyptus globulus*, os níveis de ácido abscísico foram maiores em estacas do genótipo de difícil enraizamento, em relação ao genótipo de fácil enraizamento, provavelmente contribuindo negativamente para a formação de raízes adventícias naquele genótipo (NEGISHI et al., 2014). Na estaquia do híbrido *Populus tremula* x *Populus tremuloides*, estacas tratadas com ANA apresentaram menores concentrações de ácido abscísico que estacas não tratadas, e melhores resultados de enraizamento. Em geral, baixas concentrações de ácido abscísico afetam positivamente o crescimento de calos e a organogênese, porém altas concentrações têm efeito negativo (YAN et al., 2017).

Outros hormônios, como as estrigolactonas e jasmonatos, recentemente foram relacionados com a formação de raízes adventícias (GUTIERREZ et al., 2012; RASMUSSEN et al., 2012). O ácido jasmônico interage com a auxina no enraizamento adventício (DA COSTA et al., 2013), afetando negativamente o enraizamento adventício em hipocótilos de *Arabidopsis thaliana* (GUTIERREZ et al. 2012).

Zhang et al. (2017) observaram, na estaquia de *Malus hupehensis*, que o tratamento com hormônios exógenos acelerou o catabolismo de um hormônio inibidor, o ácido abscísico. Por outro lado, o tratamento com hormônios exógenos aumentou

significativamente a acumulação de hormônios promotores do enraizamento, como o AIA, ácido giberélico e zeatina ribosídeo, e acelerou o metabolismo de carboidratos e proteínas solúveis, com consequente resposta positiva no processo de formação das raízes.

Os fitohormônios, especialmente as auxinas, e as enzimas oxidativas, são algumas das substâncias e compostos que parecem influenciar e regular o processo de formação de raízes adventícias (LI et al., 2009).

2.4 Alterações na atividade de enzimas na formação de raízes adventícias

Mudanças consideráveis ocorrem na atividade de algumas enzimas na zona de enraizamento de estacas, tais como a peroxidase, a polifenoloxidase e a AIA oxidase (KOSE et al., 2011), existindo uma estreita relação entre a atividade dessas e a ocorrência de raízes adventícias (FU et al., 2011). As alterações são reguladas pela auxina e contribuem para a indução ou inibição do enraizamento adventício (KOSE et al., 2011).

2.4.1 Peroxidase

A atividade da peroxidase está relacionada ao nível de estresse da planta, sendo um dos seus principais papéis promover a proteção da célula (SOARES et al., 2009). Quando as plantas são expostas a fatores como processos de crescimento e diferenciação celular, mudanças morfogênicas, estresse químico, físico ou biológico, o aumento da atividade da peroxidase pode ser fator determinante na capacidade de adaptação das plantas, podendo ser utilizada como um marcador bioquímico de estresse (PISA et al., 2003).

O termo “peroxidase” representa uma enzima que catalisa oxidorredução entre peróxido de hidrogênio e vários redutores. Peroxidases de plantas Classe III (POX), uma oxidorredutase específica de plantas, é um dos muitos tipos de peroxidases que são amplamente distribuídos em animais, plantas e microorganismos. Peroxidases existem como isoenzimas em espécies de plantas, e cada isoenzima tem sequências de

aminoácidos variáveis, com diversos perfis de expressão, sugerindo o envolvimento em vários processos fisiológicos. De fato, estudos comprovam que as peroxidases participam na lignificação, suberização, cicatrização de lesões, defesa contra infecção por patógenos e no catabolismo das auxinas (HIRAGA et al., 2001).

Peroxidases de plantas são conhecidas por estarem envolvidas no metabolismo da auxina, bem como nos processos de lignificação das células, na presença de fenol (ROUT, 2006). A lignina é um polímero fenólico complexo da parede celular e a segunda substância orgânica mais abundante nas plantas, importante para o suporte mecânico, transporte de água e defesa em plantas vasculares. Acredita-se que isoenzimas específicas de peroxidases são responsáveis pelo papel enzimático final na lignificação (CHEN et al., 2002).

Na estaquia de *Cinnamomum kanehirae* Hay. (cânfora de flor pequena ou cânfora robusta) a atividade da peroxidase diminuiu significativamente nas estacas tratadas com 2.000 mg L⁻¹ de AIB por 10 min, comparadas ao controle. Menores quantidades de lignina em estacas tratadas foram correlacionadas com o declínio da atividade da peroxidase. A inibição da atividade da peroxidase pode levar a processos de rediferenciação induzidos pelo AIB, que produz novos primórdios radiculares durante a formação de raízes adventícias (CHO et al., 2011).

A atividade da peroxidase regula o catabolismo do AIA (KOSE et al., 2011; LI et al., 2009), e alterações no padrão da atividade da peroxidase e isoformas da peroxidase têm sido propostas como marcadores bioquímicos das sucessivas fases de enraizamento adventício (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009; LI et al., 2009), como em *Arbutus unedo* L. (medronheiro) e *Taxus baccata* L. (teixo) (METAXAS et al., 2004). Husen e Pal (2007) sugerem que a regulação da atividade da peroxidase na zona de enraizamento de estacas pode fornecer um meio fácil, rápido e confiável de avaliar a diferenciação celular em raízes.

A atividade da peroxidase é regulada durante a iniciação, crescimento e desenvolvimento de raízes adventícias, e geralmente é mínima na fase de indução e

máxima na fase de iniciação (HUSEN; PAL, 2007; LI et al., 2009). Também está relacionada com o conteúdo de auxina, que diminui quando a atividade da peroxidase é maior (DE KLERK; KRIEKEN; DE JONG, 1999), pois acredita-se que a descarboxilação oxidativa pela peroxidase possa ser um processo de inativação do AIA endógeno (HIRAGA et al., 2001).

Em estacas de três cultivares de porta-enxertos de videira, a atividade da peroxidase aumentou principalmente durante o período entre 4 e 8 dias antes do início do enraizamento adventício, e diminuiu consideravelmente até quase o final do período avaliado (65 dias após a estaquia), sugerindo um papel importante desta enzima na ativação do enraizamento adventício (KOSE et al., 2011). De forma similar, a atividade da peroxidase foi maior na fase de formação de raízes adventícias em microestacas de *Bacopa monnieri* (brahmi), declinando nas fases subsequentes, o que sugere um importante papel desta enzima durante as fases de indução, iniciação e organização de raízes (GOEL; KAUR; KUMAR, 2018).

Na estaquia de erva-mate, o pico de maior atividade da peroxidase ocorreu aos 12 dias, sendo relacionado à um período de elevado estresse (HETTWER, NIENOW, SCHONS, 2017). O aumento na atividade da peroxidase nos primeiros estágios do enraizamento aumenta a resistência da parede celular e, conseqüentemente, a resistência ao estresse. Nas fases posteriores, a atividade da peroxidase diminui, o que facilita a expansão e o crescimento celular (ZHANG et al., 2017).

2.4.2 Polifenoloxidase

Polifenoloxidases são um grupo de enzimas localizadas nos tilacoides dos plastídeos, capazes de catalisar a oxidação de compostos aromáticos por oxigênio. Também são responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos (GOEL; KAUR; KUMAR, 2018), catalisam a oxidação de polifenóis a quinonas (ILCZUK; JACYGRAD, 2016), a hidroxilação de monofenóis e a lignificação de células vegetais durante o processo de enraizamento (YILMAZ et al., 2003; KHORSHEДУZZAMAN et al., 2010).

Além disso, participam de mecanismos de defesa de plantas contra estresses (ILCZUK; JACYGRAD, 2016).

Polifenoloxidasas podem regular indiretamente a síntese de fenois e desempenham um papel importante na divisão celular, diferenciação e desenvolvimento de primórdios radiculares (HAHLBROCK; GRISEBACH, 1979; HUYSTEE; CAIRNS, 1982 apud YILMAZ et al. 2003). De acordo com González et al. (1991) e Gaspar et al. (1997), citados por Ilczuk; Jacygrad (2016), as polifenoloxidasas desempenham um papel fundamental na rizogênese, por controlar a síntese de um precursor necessário para a biossíntese de lignina durante a diferenciação de raízes.

Kose et al. (2011) citam que a atividade da polifenoloxidase, na estaquia de cultivares de porta-enxertos de videira, aumentou antes do enraizamento, e em seguida diminuiu, quando o enraizamento adventício iniciou. Comportamento similar foi observado em estacas de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (cha-da-índia), quando a atividade da polifenoloxidase aumentou durante as fases de indução e iniciação de raízes, tanto em estacas tratadas com auxina exógena como em não tratadas, e diminuiu na fase de expressão (ROUT, 2006). Contudo, Zhang et al. (2017), em estacas de *Malus hupehensis*, observaram que o aumento contínuo na atividade da polifenoloxidase promoveu a formação de raízes adventícias ao longo de todo o processo, da indução ao desenvolvimento das raízes.

2.4.3 AIA Oxidase

O ácido indolacético (AIA) é o principal hormônio do grupo das auxinas que ocorre nas plantas, e sua inativação ocorre pela atividade da AIA oxidase (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). A AIA oxidase afeta a formação de raízes pela oxidação do AIA e mudanças no seu conteúdo endógeno (FU et al., 2011). Há uma relação inversa entre a atividade da AIA oxidase e os níveis de AIA endógeno (PORFIRIO et al., 2016).

A atividade da AIA oxidase no enraizamento de estacas de *Camellia sinensis* diminuiu durante as fases de indução (0-12 dias) e iniciação (12-14 dias), e aumentou

durante a fase de expressão (14-18 dias). Em estacas tratadas com AIB a atividade da enzima foi maior, parecendo ser a causa do melhor enraizamento adventício com o uso do AIB, possivelmente servindo como uma fonte de auxina livre (ROUT, 2006).

Na estaquia do híbrido *Populus tremula* x *Populus tremuloides*, estacas tratadas com ANA apresentaram melhores resultados de enraizamento, aumento no nível de AIA endógeno e redução na atividade da AIA oxidase. Esta redução na atividade da AIA oxidase pode estar relacionada ao aumento do nível de AIA endógeno, e sugere que a redução da atividade pode ser necessária para a formação de raízes adventícias (YAN et al., 2017).

Observações semelhantes foram feitas por Yan et al. (2014), no enraizamento de estacas de *Hemarthria compressa* (L. f.) R. Br., onde o tratamento com 200 mg L⁻¹ de ANA por 20 min resultou na melhor capacidade de enraizamento e menor atividade da AIA oxidase, indicando que a menor atividade da AIA oxidase, aparentemente, pode ser responsável pelo melhor desenvolvimento de raízes adventícias, possivelmente por estar relacionada à um maior conteúdo de AIA endógeno.

Na estaquia de *Morus alba* L. (amoreira branca), Husen et al. (2015) observaram que a atividade da AIA oxidase foi maior na zona de enraizamento de estacas tratadas com AIB do que em estacas não tratadas, sendo o pico da atividade aos 30 dias após a estaquia, diminuindo novamente. Sugerem que a enzima AIA oxidase auxilia no catabolismo das auxinas e no desencadeamento dos processos da iniciação radicular, basicamente tendo um papel em desencadear e iniciar o primórdio radicular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu em dois estudos: 1) Forma de aplicação e doses de AIB na estaquia de erva-mate em diferentes épocas; e 2) Atividades enzimáticas em estacas de erva-mate associadas à doses e forma de aplicação de AIB.

3.1 Material vegetal

A estaquia foi realizada utilizando genótipos de erva-mate localizados em um erval comercial (-28°16'43"S -52°10'20"O) no município de Mato Castelhano, Rio Grande do Sul, com 15 anos de idade, implantado com mudas propagadas a partir de sementes. Com base nos resultados obtidos por Tres (2016), estudando 30 genótipos, foram selecionados quatro genótipos, três que apresentaram satisfatório enraizamento, entre 75% e 85% (G4, G26 e G28), e um com baixo enraizamento, de 12,5% (G15), utilizando 8.000 mg L⁻¹ de AIB em solução hidroalcoólica.

3.2 Local e período de execução da pesquisa

O estudo foi desenvolvido no Setor de Horticultura da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF), em Passo Fundo, RS, -28°41'S -52°45'O, a 709 m de altitude. Segundo a classificação climática de Koppen, o clima da região é do tipo subtropical úmido (Cfa), úmido em todas as estações do ano, com chuvas bem distribuídas e verão quente (KUINCHTNER; BURIOL, 2001). Durante o período de 90 dias da estaquia de verão/outono, conduzida de 17 de janeiro a 17 de abril de 2018, a temperatura média mensal na área externa da estufa foi em torno de 21 °C, e a temperatura média das máximas acima dos 26 °C. Na estaquia de primavera, conduzida de 13 de setembro a 12 de dezembro de 2018, a temperatura média mensal variou de 16,5 a 21,8 °C e as médias das máximas de 22 °C a 28 °C (Anexo 1).

A estaquia foi conduzida em uma estufa agrícola medindo 10 x 21 m, pé direito de 2,5 m, com cobertura de polietileno de baixa densidade (PEBD) e tela tipo sombrite de 70 % de sombreamento horizontalmente a 2,5 m de altura na parte interna da estufa, e nas laterais, com o objetivo de minimizar a insolação e a temperatura. O sistema de irrigação por nebulização intermitente era acionado automaticamente a cada 8 minutos, com duração do molhamento de 10 segundos.

3.3 Estudo 1: Forma de aplicação e doses de AIB na estaquia de erva-mate em diferentes épocas

3.3.1 Tratamentos e delineamento experimental

Na estaquia de verão/outono e de primavera foram avaliados quatro genótipos (G4, G15, G26 e G28), tratadas as estacas com AIB aplicado na forma de pó, nas doses de 2.000 e 4.000 mg kg⁻¹, e em solução hidroalcoólica nas mesmas doses (2.000 e 4.000 mg L⁻¹), comparando com estacas não tratadas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, arranjos os tratamentos no esquema fatorial 4 x 5, com três repetições na estaquia de verão/outono e quatro na de primavera, e dez estacas por parcela. Cada época de estaquia foi considerada um experimento. O menor número de repetições na estaquia de verão/outono se justifica pela condução, em paralelo, da pesquisa para avaliar as atividades enzimáticas, com os mesmos tratamentos, não sendo possível obter dos genótipos estacas suficientes para implantar quatro repetições.

3.3.2 Procedimentos

Estacas apicais semilenhosas foram coletadas, umedecidas e acondicionadas em sacos de polietileno, para o rápido transporte até o Laboratório de Virologia Vegetal da FAMV-UPF, onde as estacas foram padronizadas com 6 cm de comprimento, eliminando o ápice e cortadas em bisel na base, mantendo um par de folhas cortadas longitudinalmente pela metade (Figura 1).

No preparo das soluções hidroalcoólicas, o AIB da marca Sigma[®], na dose correspondente a cada tratamento, foi diluído em 50% de álcool etílico 70 °GL, completando o volume com água destilada. No preparo em pó, o AIB foi dissolvido em 30 mL de álcool puro, adicionado 150 mL de acetona e 200 g de talco inerte, até formar uma pasta homogênea. A pasta foi distribuída em uma bandeja plástica e mantida na temperatura ambiente para a evaporação da acetona. Uma vez seca, a pasta foi moída com um pistilo e peneirada, voltando à forma de pó.

Nos tratamentos com AIB em solução hidroalcoólica foi realizada a imersão da base das estacas (3-4 cm) por 10 segundos na solução. No tratamento com pó a base das estacas foram previamente umedecidas em água destilada, para melhor fixação, e após feito o contato com o pó. O plantio foi realizado em tubetes plásticos de 46,5 x 46,5 x 140 mm (140 cm³), acondicionados em bandejas plásticas de 96 tubetes, contendo como substrato casca de arroz carbonizada + substrato comercial MecPlant[®] (1:1, v:v).

Figura 1 - Estaca padronizada com 6 cm de comprimento e duas folhas reduzidas pela metade (A); e vista geral do experimento, utilizando tubetes plásticos e substrato composto de casca de arroz carbonizada + substrato comercial MecPlant[®] (1:1, v:v) (B).



Fonte: Imagens da autora.

3.3.3 Avaliações

Semanalmente foi avaliada a porcentagem de retenção foliar e de sobrevivência das estacas. Aos 90 dias foi avaliada, além da retenção foliar e da sobrevivência, a porcentagem de estacas brotadas, enraizadas (calculada em relação ao total de 10 estacas), vivas enraizadas e não enraizadas com calo. Após, as raízes foram destacadas e determinada a massa fresca de raízes por estaca, em balança eletrônica de precisão. Posteriormente, as raízes foram digitalizadas por um scanner e as imagens analisadas pelo software WinRHIZO[®], para determinação do volume radicial, diâmetro médio de raízes, comprimento total de raízes o comprimento de raízes com diâmetro menor e maior que 0,5 mm.

3.3.4 Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. As porcentagens de sobrevivência e retenção foliar avaliadas semanalmente foram analisadas separadamente para cada genótipo, considerando o delineamento em blocos casualizados com medidas repetidas no tempo. Exceto os dados de porcentagem de retenção foliar e de sobrevivência coletados semanalmente, os demais dados em porcentagem foram previamente transformados, para efeito de análise estatística, em $\arcsin [raiz (x/100)]$, e os demais, de massa, volume, comprimento e diâmetro, em raiz (x). As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa Sisvar.

3.4 Estudo 2: Atividades enzimáticas em estacas de erva-mate associadas à doses e forma de aplicação de AIB

Para este estudo foi instalado um experimento em paralelo, idêntico ao descrito para a estaquia de verão/outono, no Estudo I, com o objetivo de determinar a atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e AIA oxidase na porção basal das estacas, na zona de enraizamento.

3.4.1 Procedimentos

Imediatamente após a coleta das estacas nas plantas (tempo 0), e aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a estaquia, duas estacas por parcela, nas três repetições, foram retiradas de cada parcela dos tratamentos, acondicionadas em caixas de isopor com gelo e transportadas para o Laboratório de Virologia Vegetal da FAMV-UPF. No laboratório foi pesado 0,4 g de tecido fresco da porção basal das estacas (zona de enraizamento), macerado em nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana, e armazenado à -80 °C.

3.4.1.1 Determinação da atividade da peroxidase

Para a determinação da peroxidase foi utilizado o método de Campos; Silveira (2003). Para a extração foi pesado 0,2 g do tecido vegetal e, em tubos falcon, adicionados 2 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), contendo 1 mg de polivinilpirrolidona-10. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm, por 20 minutos a 4 °C, e o precipitado sedimentado descartado. O extrato bruto foi acondicionado em freezer e, posteriormente, usado para quantificar a atividade enzimática.

Em tubos de ensaio foram colocados 1,85 mL de tampão fosfato-citrato contendo solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0; 0,15 mL de extrato bruto; e 0,125 mL de guaiacol a 0,5%, e misturados em vortex. Em seguida foi adicionado a esta mistura 0,125 mL de H₂O₂ a 3% e, novamente, misturados em vortex. A mistura foi incubada em banho maria a 30 °C, por 15 minutos. Após a incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo e adicionado 0,125 mL da solução de meta bissulfito de sódio a 2%. Após agitação em vortex, os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos. A leitura de absorbância foi feita à 450 nm, em espectrofotômetro. Como controle para a reação enzimática foi utilizado água destilada.

Para o cálculo da atividade enzimática foi empregada a seguinte equação:

$$U \text{ mL}^{-1} = \frac{A}{\epsilon} \times \frac{1}{Ve} \times FD \times \frac{1}{t} \times 1000$$

Sendo: $U \text{ mL}^{-1}$ = unidade de atividade da peroxidase por mL; A = absorbância; ϵ = absortividade molar do tetraguaiacol ($26.600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); Ve = volume da solução de enzima utilizada no ensaio (mL); t = tempo de reação em min e FD = fator de diluição (diluição do extrato bruto enzimático).

3.4.1.2 Determinação da atividade da polifenoloxidase

Para a determinação da polifenoloxidase foi utilizado o método de Campos; Silveira (2003). O extrato bruto foi o mesmo descrito para a peroxidase no item 3.4.1.1.

Para a reação, em tubos de ensaio foram colocados 1,8 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; 0,50 mL do extrato bruto; 0,05 mL de catecol 0,1 M e, em seguida, misturados em vortex por 15 segundos. Esta mistura foi incubada em banho maria a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Após, os tubos contendo a mistura foram transferidos para um banho de gelo e adicionado 0,1 mL de ácido perclórico a 1,4%. Após agitação em vortex, os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos. A leitura de absorbância foi realizada à 395 nm, em espectrofotômetro. Como controle para a reação enzimática, o extrato bruto foi substituído por água destilada.

Para cálculo da atividade enzimática foi empregada a seguinte equação:

$$PPO = \frac{\frac{\textit{leitura}}{t} \times 1000}{\textit{peso do volume da amostra}}$$

Sendo: PPO em $\mu\text{mol catecol transformado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{massa fresca}$; $\textit{leitura}$ = leitura amostra – leitura do branco da solução; t = tempo de atividade (min); $\textit{peso do volume da amostra}$ = 0,05 g.

3.4.1.3 Determinação da atividade da AIA oxidase

Para a determinação da AIA oxidase foi utilizado o método de Yan et al. (2014). Para a extração foi pesado 0,1 g de tecido vegetal e, em tubos falcon, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 6,0) contendo 1% de ditioneitol. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C, e o precipitado descartado. O extrato bruto foi acondicionado em freezer e, posteriormente, usado para quantificar a atividade enzimática.

A mistura de reação continha 1,0 mL do extrato bruto; 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,0); 1,0 mL de MnCl₂ 1 mM; 1,0 mL de 2-4 D 1 mM; e 1,0 mL de AIA 1 mM, misturados em vortex por 10 seg. Esta mistura foi incubada em banho maria a 30 °C por 30 min. Após foram adicionados 0,08 mL de FeCl₃ 0,5 M e 3,92 mL de ácido perclórico a 35%. Esta mistura foi mantida à 35 °C por 30 min no escuro. A leitura da absorbância foi realizada à 530 nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão da produção de AIA foi obtida com o hormônio nas seguintes concentrações: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹ e os resultados expressos em µg AIA/g de massa fresca.

3.4.2 Análise dos dados

Para efeito estatístico, a atividade da peroxidase, polifenoloxidase e AIA oxidase para cada genótipo foram comparadas considerando o delineamento em blocos casualizados com medidas repetidas no tempo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo 1 - Forma de aplicação e doses de AIB na estaquia de erva-mate em diferentes épocas

4.1.1 Estaquia de verão/outono

Na estaquia de verão/outono, a análise de variância revelou interação significativa entre genótipos x formas de aplicação/doses de AIB para as variáveis porcentagem de retenção foliar e de sobrevivência.

A retenção foliar apresentou, para todos os genótipos, resposta positiva à ausência do tratamento com AIB, e variável entre genótipos quando tratadas com o fitorregulador, conforme a forma e dose da aplicação (Tabela 1). Para o genótipo G4 os tratamentos não diferiram, enquanto no G15, que de modo geral apresentou a menor retenção foliar, inferior a 25%, os melhores resultados foram obtidos sem AIB e nos tratamentos com solução hidroalcoólica. Por sua vez, o G26 se destacou com a melhor retenção foliar quando não utilizado AIB ou aplicado na forma de pó, independente da dose. Ao tratar com solução hidroalcoólica, ainda assim as estacas do G26 apresentaram maior retenção em relação aos demais genótipos, não diferindo apenas de G4 com H 4.000 e de G28 com H 2.000. No genótipo G28 a queda de folhas diferiu apenas no tratamento H 4.000.

A porcentagem de sobrevivência das estacas, de modo geral, foi maior nos tratamentos que apresentaram maior retenção foliar, também com respostas variáveis entre genótipos conforme a forma e dose da aplicação de AIB (Tabela 2). Para todos os genótipos foram obtidas mais estacas vivas sem AIB, como constatado para a retenção foliar (Tabela 1). Não diferiram da testemunha os tratamentos com solução hidroalcoólica (H 2.000 e H 4.000) em G15, com pó (P 4.000) em G26 e com solução hidroalcoólica (H 2.000) em G28. No genótipo G4 os tratamentos com AIB não diferiram entre si, mas a

sobrevivência foi menor que na testemunha. A sobrevivência foi superior nos genótipos G4 e G26, independente da dose e forma de aplicação.

Tabela 1 – Retenção foliar de quatro genótipos de erva-mate na estaquia de verão/outono, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Genótipos	Retenção foliar (%)				
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
G4	45,0 Ab	28,3 Ab	18,3 Ab	38,3 Aa	38,3 Aa
G15	25,0 Ab	1,7 Bc	16,7 Ab	6,7 Bb	11,7 Ab
G26	70,0 Aa	53,3 Aa	45,0 Ba	53,3 Aa	30,0 Ba
G28	38,3 Ab	26,7 Ab	43,3 Aa	30,0 Aa	15,0 Bb
C.V. (%)	22,68				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 2 - Sobrevivência de quatro genótipos de erva-mate na estaquia de verão/outono, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Genótipos	Sobrevivência (%)				
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
G4	90,0 Aa	66,7 Ba	60,0 Ba	66,7 Bb	60,0 Ba
G15	43,3 Ac	10,0 Bb	33,3 Ab	13,3 Bc	26,7 Ab
G26	93,3 Aa	70,0 Ba	60,0 Ba	83,3 Aa	53,3 Ba
G28	73,3 Ab	46,7 Bb	70,0 Aa	50,0 Bb	36,7 Bb
C.V. (%)	16,57				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Em trabalho realizado no mesmo período por Tres (2016), porém utilizando solução hidroalcoólica mais concentrada, na dose de 8.000 mg L⁻¹, foi verificado, após 120 dias de estaquia, que os genótipos G4, G26 e G28 se destacaram entre aqueles que apresentaram maior retenção de folhas, com 79,2% a 88,5%, e de sobrevivência, entre 89,6% e 95,8%. O genótipo G15, que apresentou menor retenção foliar e sobrevivência, também havia demonstrado desempenho inferior, porém as porcentagens foram mais

elevadas, de 52,1% e 68,8%, respectivamente. Portanto, os dados obtidos para estas variáveis no presente estudo foram inferiores aos anteriormente alcançados.

Em outro trabalho, com os mesmos genótipos, testando doses de AIB, Hettwer (2016), de maneira similar, verificou que os genótipos G4 e G28 se destacaram dos demais, com 59,7% e 70,4% de retenção foliar, e 67,6% e 83,4 de sobrevivência, respectivamente. O genótipo G15 manteve-se entre os genótipos com menor retenção de folhas (23,1%) e sobrevivência (28,7%). Para todos os genótipos avaliados a sobrevivência e a retenção de folhas diminuíram quando aplicado AIB, principalmente nas doses mais elevadas, de 6.000 e 9.000 mg L⁻¹. Também Santos (2011) observou que a dose de 6.000 mg L⁻¹ de AIB não favoreceu a retenção de folhas em estacas de erva-mate, inclusive reduzindo significativamente em alguns genótipos.

A maior queda de folhas e mortalidade observadas neste trabalho podem apresentar relação com o menor tamanho da estaca, de 6 cm, enquanto em trabalhos citados anteriormente o tamanho das estacas foi de 10 a 12 cm. Horbarch (2008) testou estacas com 3 cm e 10 cm, coletadas de uma planta de erva-mate com aproximadamente 10 anos de idade, e doses de AIB (0, 4.000 e 8.000 mg L⁻¹). A aplicação de AIB reduziu a sobrevivência das estacas de 3 cm, enquanto com 10 cm não diferiu entre doses.

O grau de lignificação das estacas também pode estar relacionado, além da capacidade de enraizamento, com o potencial de retenção foliar e de sobrevivência. Conforme Rosa (2014), estacas retiradas da porção apical, utilizadas no presente trabalho, apesar de apresentarem maior conteúdo de auxinas, são menos lignificadas e mais suscetíveis à desidratação, portanto menos tolerantes às temperaturas elevadas que ocorrem no verão, época que foi realizada a estaquia. Mayer (2018) comparou estacas apicais e subapicais de clones de erva-mate ‘Cambona 4’, utilizando na forma de pó 2.000 mg kg⁻¹ de AIB. A retenção foliar influenciou positivamente a sobrevivência e estacas subapicais apresentaram melhor desempenho, possivelmente devido ao maior grau de lignificação e à condição de maior tolerância às elevadas temperaturas (verão) no interior da estufa e menor desidratação.

A progressão semanal da retenção foliar e da sobrevivência permitem o melhor entendimento dos períodos críticos na estaquia da erva-mate. Para a retenção foliar houve efeito significativo de dias após a estaquia para os genótipos G4, G15 e G28, e interação significativa de dias após a estaquia x formas de aplicação/doses de AIB para o G26.

A retenção foliar nos genótipos G4, G15 e G28 (Tabela 3), ao considerar o conjunto de dados acumulados durante os 90 dias de estaquia, não diferiu por efeito dos tratamentos de formas de aplicação/doses de AIB. O período de mais acentuada queda de folhas ocorreu até 21 dias, se estendendo até 35 dias para o G4 e 42 dias para o G28, estabilizando posteriormente. As estacas de G15 foram as que apresentaram maior queda de folhas nas primeiras duas semanas, restando apenas 54,3% aos 7 dias, e 27,3% aos 14 dias, queda que se estendeu significativamente até os 49 dias.

Tabela 3 – Progressão da retenção foliar dos genótipos G4, G15 e G28 de erva-mate na estaquia de verão/outono, durante 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Retenção foliar (%)		
	G4	G15	G28
7	91,7 a	54,3 a	83,3 a
14	63,7 b	27,3 b	50,0 b
21	48,0 c	21,7 c	39,7 c
28	41,3 d	18,0 d	36,3 d
35	38,3 e	16,3 d	35,3 d
42	38,0 e	15,7 d	34,3 e
49	37,0 e	14,7 e	33,7 e
56	35,3 e	14,0 e	32,7 e
63	34,7 e	13,3 e	32,0 e
70	34,7 e	13,0 e	32,0 e
77	34,0 e	13,0 e	31,3 e
84	33,7 e	12,3 e	30,7 e
90	33,7 e	12,3 e	30,7 e
C.V. (%)	16,39	17,70	8,73

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A queda de folhas do genótipo G26 (Tabela 4) foi menos intensa nos tratamentos sem AIB e com AIB em pó. Após uma queda inicial até os 14 dias, nos tratamentos sem AIB e com P 2.000, e até os 21 dias, com P 4.000, houve um período de estabilidade até os 42 dias, quando ocorreu nova queda de folhas, pequena, mas significativa, se mantendo estável até o final do processo. As doses em solução hidroalcoólica resultaram em maior queda de folhas, sendo mais intensa na dose mais elevada. No tratamento H 2.000 restavam 48,3% das folhas após 49 dias, e no H 4.000 apenas 36,7% das folhas aos 35 dias.

Tabela 4 – Progressão da retenção foliar do genótipo G26 de erva-mate na estaquia de verão/outono, durante 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Genótipo G26 - Retenção foliar (%)				
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
7	95,0 Aa	93,3 Aa	98,3 Aa	95,0 Aa	95,0 Aa
14	85,0 Ab	70,0 Bb	78,3 Ab	85,0 Ab	70,0 Bb
21	83,3 Ab	68,3 Bb	70,0 Bc	70,0 Bc	56,7 Cc
28	81,7 Ab	65,0 Bb	65,0 Bc	68,3 Bc	48,3 Cd
35	81,7 Ab	63,3 Bb	56,7 Bd	65,0 Bc	36,7 Ce
42	80,0 Ab	61,7 Bb	55,0 Bd	63,3 Bc	33,3 Ce
49	76,7 Ac	58,3 Bc	48,3 Ce	60,0 Bd	31,7 De
56	71,7 Ac	55,0 Bc	46,7 Ce	56,7 Bd	31,7 De
63	71,7 Ac	55,0 Bc	46,7 Ce	56,7 Bd	31,7 De
70	71,7 Ac	53,3 Bc	45,0 Ce	56,7 Bd	31,7 De
77	71,7 Ac	53,3 Bc	45,0 Ce	56,7 Bd	30,0 De
84	70,0 Ac	53,3 Bc	45,0 Ce	55,0 Bd	30,0 De
90	70,0 Ac	53,3 Bc	45,0 Ce	53,3 Bd	30,0 De
C.V. (%)	8,32				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados de sobrevivência demonstram repercutir um comportamento que tem sido observado com frequência na erva-mate, de que a queda total das folhas da estaca precede a morte da mesma, razão pela qual, no protocolo de preparação das estacas, tem sido mantida duas meias folhas. Houve para a porcentagem de sobrevivência, durante o período da estaquia, interação significativa entre dias após a estaquia x formas de

aplicação/doses de AIB para os genótipos G4, G26 e G28, e de dias após a estaquia, independentemente, para o genótipo G15.

No genótipo G4, a sobrevivência das estacas sem AIB foi elevada, não diferindo e se mantendo acima de 90% até o final do período da estaquia (Tabela 5). Durante 42 dias, os tratamentos com AIB não diferiram entre si e da testemunha, mantendo a sobrevivência acima de 90%, taxa esta que persistiu por período um pouco mais estendido para o tratamento H 2.000 (49 dias) e P 4.000 (56 dias). Gradativa mortalidade ocorreu após, chegando a taxas entre 60,0% e 66,7% nos tratamentos com AIB, não diferindo entre si (Tabela 2).

Tabela 5 – Progressão da sobrevivência dos genótipos G4 e G15 de erva-mate na estaquia de verão/outono, durante 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Sobrevivência (%)					Genótipo G15
	Genótipo G4					
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)					
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000	
7	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
14	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	98,7 a
21	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	96,7 Aa	83,3 b
28	96,7 Aa	96,7 Aa	90,0 Ab	93,3 Aa	96,7 Aa	71,3 c
35	96,7 Aa	93,3 Aa	90,0 Ab	93,3 Aa	90,0 Ab	60,7 d
42	93,3 Aa	90,0 Aa	90,0 Ab	93,3 Aa	90,0 Ab	51,3 e
49	93,3 Aa	83,3 Bb	90,0 Ab	93,3 Aa	80,0 Bc	46,7 e
56	93,3 Aa	83,3 Bb	80,0 Bc	93,3 Aa	70,0 Cc	41,3 f
63	93,3 Aa	76,7 Bb	76,7 Bc	80,0 Bb	63,3 Cc	34,7 f
70	93,3 Aa	73,3 Bc	76,7 Bc	80,0 Bb	63,3 Cc	32,0 g
77	93,3 Aa	70,0 Bc	73,3 Bc	73,3 Bb	63,3 Bc	28,7 g
84	90,0 Aa	66,7 Bc	63,3 Bd	70,0 Bb	60,0 Bc	26,7 g
90	90,0 Aa	66,7 Bc	60,0 Bd	66,7 Bd	60,0 Bc	25,3 g
C.V. (%)			7,6			20,92

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O genótipo G15 apresentou progressiva diminuição da porcentagem de sobrevivência até os 70 dias, quando atingiu 32% (Tabela 5), possivelmente em resposta

à intensa queda de folhas, pois já ao final das duas primeiras semanas a retenção foliar era de apenas 23,3%.

Estacas do genótipo G26, sem AIB e no tratamento P 4.000, apresentaram alta sobrevivência, sem diferir significativamente, mantendo ao final do período 93,3% e 83,3% de estacas vivas, respectivamente (Tabela 6). Como ocorreu com o G4, os tratamentos com AIB não diferiram entre si e da testemunha até os 42 dias de estaquia. Posteriormente, houve uma mais acentuada queda de folhas nos tratamentos P 2.000, H 2.000 e H 4.000, de maneira gradativa, alcançando taxas entre 53,3% e 70,0% de sobrevivência.

Tabela 6 – Progressão da sobrevivência do genótipo G26 de erva-mate na estaquia de verão/outono, durante 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Genótipo G26 - Sobrevivência (%)				
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
7	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa
14	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa
21	100,0 Aa	96,7 Aa	96,7 Aa	100,0 Aa	93,3 Aa
28	100,0 Aa	96,7 Aa	96,7 Aa	96,7 Aa	90,0 Ab
35	100,0 Aa	96,7 Aa	90,0 Ab	93,3 Aa	86,7 Ab
42	100,0 Aa	93,3 Aa	86,7 Ab	93,3 Aa	86,7 Ab
49	100,0 Aa	83,3 Bb	86,7 Bb	90,0 Aa	83,3 Bb
56	100,0 Aa	83,3 Bb	80,0 Bc	90,0 Aa	76,7 Bc
63	96,7 Aa	73,3 Bb	70,0 Bd	90,0 Aa	70,0 Bc
70	96,7 Aa	73,3 Bb	66,7 Bd	90,0 Aa	66,7 Bc
77	96,7 Aa	73,3 Bb	63,3 Bd	90,0 Aa	63,3 Bd
84	96,7 Aa	73,3 Bb	63,3 Cd	86,7 Aa	56,7 Cd
90	93,3 Aa	70,0 Bb	60,0 Cd	83,3 Aa	53,3 Cd
C.V. (%)	8,16				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Com relação ao genótipo G28 (Tabela 7), a sobrevivência se manteve elevada e sem diferir entre os tratamentos até 28 dias. Após, diferentemente do verificado nos genótipos G4 e G26, houve aumento significativo da mortalidade sem o uso de AIB, a

partir dos 28 dias até os 56 dias, estabilizando com 73,3% de sobrevivência. Também após 28 dias, porém mais intensamente, ocorreu queda significativa com a dose mais elevada em solução hidroalcoólica (H 4.000). Mantiveram elevada taxa de sobrevivência os tratamentos H 2.000 e P 4.000 até os 56 dias, e P 2.000 até os 49 dias, superior a 90%, quando iniciou a queda de folhas, se destacando o tratamento H 2.000 com 70% de sobrevivência, não diferindo da testemunha.

Tabela 7 – Progressão da sobrevivência do genótipo G28 de erva-mate na estaquia de verão/outono, durante 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Genótipo G28 - Sobrevivência (%)				
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
7	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa
14	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa
21	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa
28	96,7 Aa	100,0 Aa	96,7 Aa	96,7 Aa	93,3 Aa
35	93,3 Ab	96,7 Aa	96,7 Aa	96,7 Aa	80,0 Bb
42	90,0 Ab	96,7 Aa	96,7 Aa	96,7 Aa	73,3 Bb
49	86,7 Ab	93,3 Aa	90,0 Aa	96,7 Aa	63,3 Bc
56	80,0 Bc	73,3 Bb	90,0 Aa	93,3 Aa	53,3 Cc
63	73,3 Ac	73,3 Ab	76,7 Ab	83,3 Ab	53,3 Bc
70	73,3 Ac	66,7 Ab	76,7 Ab	80,0 Ab	46,7 Bd
77	73,3 Ac	60,0 Bc	73,3 Ab	76,7 Ab	43,3 Cd
84	73,3 Ac	50,0 Bc	70,0 Ab	63,3 Ac	36,7 Cd
90	73,3 Ac	46,7 Bc	70,0 Ab	50,0 Bd	36,7 Cd
C.V. (%)	7,43				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados obtidos corroboram com o observado em alguns estudos, que têm demonstrado que o uso do AIB em solução hidroalcoólica pode resultar em maior queda de folhas e mortalidade de estacas de erva-mate, dependendo da planta matriz, da dose e da época de estaquia, e que as primeiras semanas após a estaquia é considerado um período crítico para a manutenção de folhas e a sobrevivência (SANTOS, 2011; HETTWER, 2013; HETTWER, 2016; TRES, 2016; MAYER, 2018).

Independentemente, houve efeito de genótipos para a porcentagem de estacas enraizadas, vivas enraizadas e brotadas, e de formas de aplicação/doses de AIB para porcentagem de estacas não enraizadas com calo (Tabela 8). A porcentagem de estacas enraizadas não diferiu entre os tratamentos com e sem AIB, com maior enraizamento dos genótipos G4, G26 e G28. De modo geral, as estacas enraizadas apresentaram formação de calo (Figura 2).

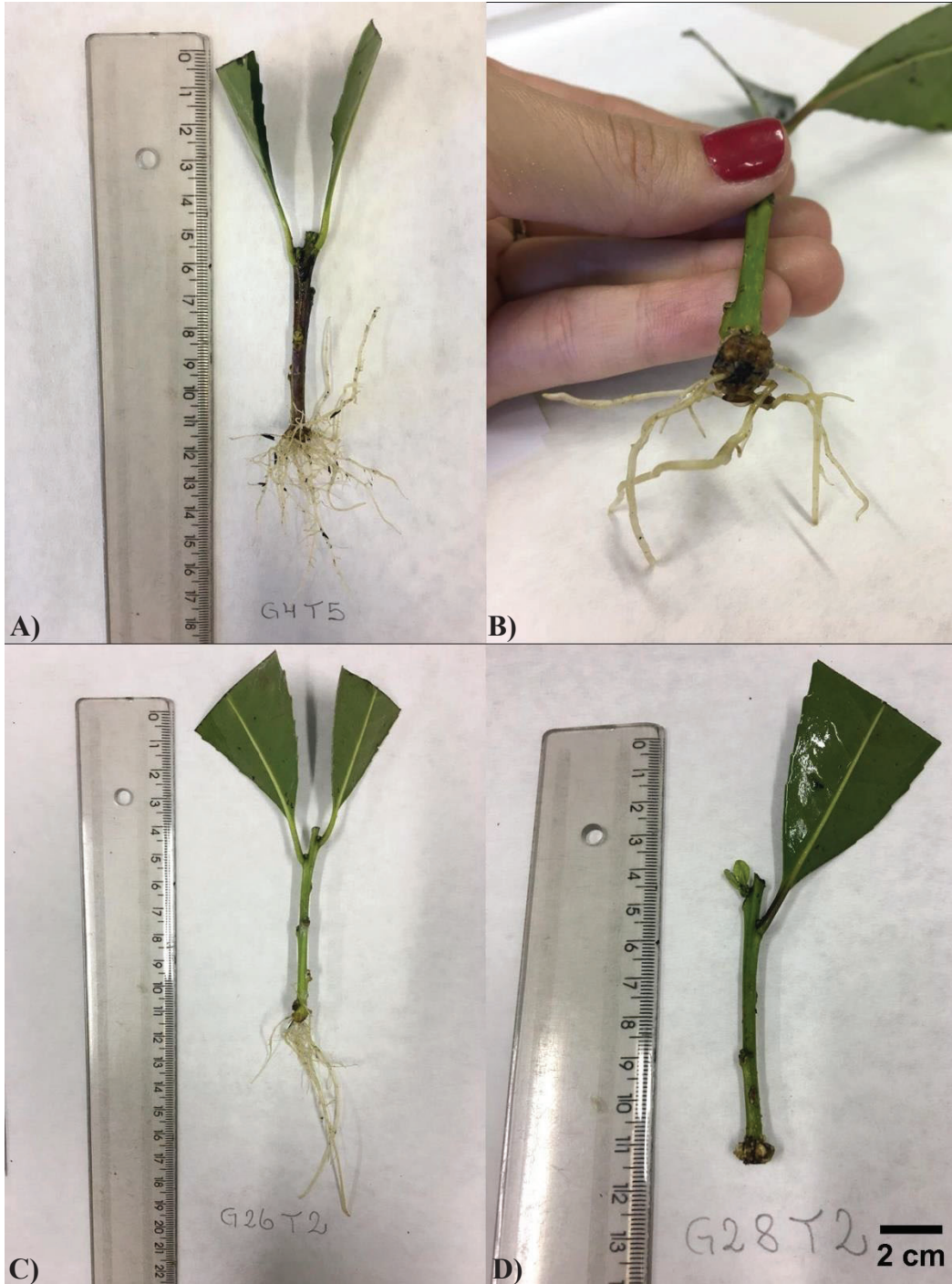
Tabela 8 – Porcentagem de estacas enraizadas, de estacas vivas enraizadas, com calo não enraizadas e brotadas de quatro genótipos de erva-mate na estaquia de verão/outono, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Genótipos	Estacas enraizadas (%)	Estacas vivas enraizadas (%)	Estacas não enraizadas com calo (%)	Estacas brotadas (%)
G4	44,7 a	65,4 a	6,7 ^{ns}	17,9 b
G15	8,0 b	22,8 b	14,7	21,1 b
G26	44,7 a	62,5 a	14,7	3,5 c
G28	34,0 a	63,8 a	16,0	41,1 a
Formas/doses AIB (P:mg kg ⁻¹ ;H:mg L ⁻¹)				
0	35,0 ^{ns}	43,6 ^{ns}	30,0 a	24,2 ^{ns}
P 2.000	31,7	50,2	9,2 b	27,1
H 2.000	30,0	48,2	3,3 b	13,2
P 4.000	38,3	63,9	7,5 b	18,8
H 4.000	29,2	61,6	5,0 b	21,2
Média	32,8	53,5	13,0	20,9
C.V. (%)	38,95	53,6	79,76	85,32

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} - não significativo pelo teste F.

Na estaquia realizada por Tres (2016), na mesma época, mas com 8.000 mg L⁻¹ de AIB, os genótipos G4, G26 e G28 apresentaram maior enraizamento, acima de 62,5%. O genótipo G15 havia apresentado baixa porcentagem, de 12,5%, similar ao observado. Os genótipos G4 e G28 também se destacaram com maior enraizamento no estudo de Hettwer (2016), e os tratamentos com AIB em solução hidroalcoólica em diferentes doses (3.000, 6.000 e 9.000 mg L⁻¹) não exerceu efeito de incremento no enraizamento.

Figura 2 - Estacas enraizadas com a presença de calo (A, B e C) e somente com calo (D) de genótipos de erva-mate na estaquia de verão/outono, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó e em solução hidroalcoólica. Passo Fundo, RS



Fonte: Imagens da autora.

Comparando os resultados obtidos de porcentagem de retenção foliar (Tabela 1) e sobrevivência (Tabela 2) com a de enraizamento (Tabela 8), é possível perceber que as porcentagens de estacas enraizadas obtidas foram limitadas principalmente pela taxa de sobrevivência. Verifica-se na Tabela 8 que, considerando a porcentagem de enraizamento apenas das estacas que permaneceram vivas, as taxas se elevam para, em média, 63,9% nos genótipos G4, G26 e G28, demonstrando que o maior desafio na estaquia da erva-mate é obter altas taxas de sobrevivência.

A retenção foliar possui importante papel para alcançar este objetivo, mas é interessante observar que, por exemplo, no G4, apesar de apresentar retenção foliar abaixo de 45% (Tabela 1), a sobrevivência foi de 60,0% a 66,7% nos tratamentos com AIB, e de 90% sem AIB (Tabela 2), com um dos melhores desempenhos no enraizamento, com exceção no tratamento H 2.000 (Tabelas 8 e 9). Já o G15 apresentou baixo potencial relacionado à todas as variáveis mencionadas.

A importância da presença de folhas se justifica por se tratarem de fontes de auxinas e cofatores, que transportados para a base das estacas atuam na promoção do enraizamento adventício, e pela continuidade da produção de fotoassimilados necessários para manter o metabolismo (HARTMANN et al., 2002, p. 294; PACHECO; FRANCO, 2008; FERREIRA et al., 2009; ROBERT; FRIML, 2009; BELNIAKI et al., 2018). Vignolo et al. (2014), contudo, afirmam que a sobrevivência de estacas não parece depender da fotossíntese realizada pelas folhas, mas sim das reservas que estas fornecem antes do período de enraizamento. Ressaltam que é provável que o enraizamento e a sobrevivência das estacas com folhas estejam relacionados à síntese de compostos fenólicos pela parte aérea, como os ácidos cafeico, catecol e clorogênico, que interagem com as auxinas, induzindo a iniciação das raízes.

O segmento do ramo e o grau de lignificação utilizado para a estaquia pode influenciar também a resposta quanto ao enraizamento. No presente trabalho foram utilizadas estacas apicais, porém Rosa (2014) relata que estacas retiradas da porção basal do ramo, embora mais lignificados e com tendência a menor conteúdo endógeno de auxina, pois enzimas como as peroxidases estão envolvidas na síntese de lignina e

degradação de auxinas, apresentam maiores reservas de nutrientes, o que pode favorecer o enraizamento, como observado na estaquia de hisbico (SOUZA et al., 2015) e de erva-mate com estacas subapicais (MAYER, 2018).

A porcentagem de estacas vivas não enraizadas com calo não diferiu entre os quatro genótipos (Tabela 8), mas foi maior naquelas não tratadas com AIB (30,0%), não diferindo entre os tratamentos com AIB (média de 8,8%). Na erva-mate, comumente é observado que estacas enraizadas também apresentam calo (HETTWER, 2016; MAYER, 2018; FONSECA, 2017), como ocorreu neste trabalho, o que leva a acreditar que a formação de calos é essencial para o enraizamento. Em algumas espécies, a formação de calos é um precursor da formação de raízes adventícias, enquanto em outras a calogênese em excesso pode prejudicar o enraizamento. Em espécies consideradas de fácil enraizamento a formação de calos e de raízes são independentes, embora ambos os processos envolvam divisão celular e exijam condições internas e ambientais similares (HARTMANN et al., 2002, p. 286).

A maior porcentagem de estacas brotadas (Tabela 8) foi observada no genótipo G28 (41,1%) e a menor no G26 (3,5%). Resultados semelhantes foram observados por Mayer (2018) na estaquia realizada no verão/outono, com as maiores porcentagens de brotação situadas entre 25,0% e 40,6%. A brotação durante o processo de estaquia e, principalmente antes do enraizamento, a princípio não é desejável, por se tratar de um dreno de fotoassimilados, concorrendo com a iniciação da formação de raízes. Quadros (2009) observou que a emissão de brotos foi um dos fatores prejudiciais à rizogênese de estacas de erva-mate, juntamente com a formação de calo.

Houve, de forma independente, efeito de genótipos e de formas de aplicação/doses de AIB para a porcentagem de massa fresca e volume de raízes, comprimento total de raízes, e com diâmetro menor e maior que 5 mm. Para a porcentagem de estacas não enraizadas com calo houve efeito apenas formas de aplicação/doses de AIB, e de genótipos sobre o diâmetro médio das raízes (Tabela 9).

O vigor do sistema radicial formado na estaca é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas após o plantio no campo (BRONDANI et al., 2007). Os genótipos G4 e G26 apresentaram os maiores valores de massa fresca de raízes (Tabela 9). O volume de raízes foi maior no G4, seguido de G26. Os tratamentos com as doses mais elevadas de AIB (P 4.000 e H 4.000) revelaram efeito estimulador no crescimento de raízes, fato não observado nas doses mais baixas, as quais não diferiram da testemunha. Husen (2008) afirma que a aplicação de auxinas sintéticas aumenta a iniciação de primórdios radiculares pelo estímulo da síntese de enzimas específicas, açúcares disponíveis através da hidrólise e translocação, quantidade e redistribuição de amido, e promoção da extensibilidade da parede celular.

Tabela 9 – Massa fresca, volume, comprimento total, com diâmetro maior e menor que 0,5 mm, e diâmetro médio de raízes de quatro genótipos de erva-mate na estaquia de verão/outono, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Genótipos	Raízes					
	Massa fresca/ estaca (g)	Volume/ estaca (cm ³)	Comprimento (cm)			Diâmetro médio (mm)
			Total	Diâmetro ≤ 0,5 mm	Diâmetro > 0,5 mm	
G4	0,190 a	0,095 a	51,9 a	34,5 a	17,4 a	0,49 a
G15	0,037 b	0,007 c	8,4 c	5,4 c	1,3 c	0,13 b
G26	0,151 a	0,065 b	39,9 a	27,0 a	12,9 a	0,44 a
G28	0,064 b	0,020 c	14,4 b	10,8 b	3,6 b	0,41 a
Formas/doses de AIB (P:mg kg ⁻¹ ; H:mg L ⁻¹)						
0	0,062 b	0,031 b	15,8 b	10,3 b	5,5 b	0,37 ^{ns}
P 2.000	0,082 b	0,033 b	19,2 b	12,7 b	6,5 b	0,35
H 2.000	0,105 b	0,041 b	27,6 b	20,6 a	7,0 b	0,37
P 4.000	0,136 a	0,060 a	35,7 a	24,1 a	11,6 a	0,38
H 4.000	0,159 a	0,071 a	42,9 a	29,5 a	13,4 a	0,37
Média	0,109	0,047	28,2	77,7	8,8	0,37
C.V. (%)	2,71	1,40	32,65	36,69	38,21	5,99

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} - não significativo pelo teste F.

O comprimento total de raízes e, conseqüentemente, das raízes com diâmetro menor e maior que 5 mm, foi superior nos genótipos G4 e G26 e na dose mais elevada de AIB, nas duas formas de aplicação (Tabela 9). As raízes com menos de 0,5 mm de diâmetro representam entre 65% e 73% do comprimento total nos genótipos G4, G26 e G28. Nestes genótipos, o diâmetro médio de raízes não diferiu, com média de 0,45 mm, superior ao apresentado pelo G15 (0,13 mm), fato justificado pelo baixo comprimento de raízes apresentado por este genótipo. O tratamento com AIB não revelou efeito significativo para esta variável (Tabela 9).

Neste experimento, de estaquia no verão/outono, os resultados sugerem que a aplicação de AIB na forma de pó pode ser uma alternativa para a obtenção de melhores taxas de retenção de folhas e de sobrevivência de estacas de erva-mate, inclusive em doses mais elevadas de AIB, oportunizando melhores resultados de enraizamento, até mesmo qualitativos.

4.1.2 Estaquia de primavera

Realizada a estaquia de setembro a dezembro, na estação primaveril, os resultados obtidos demonstraram que houve efeito significativo de genótipos sobre a porcentagem de retenção foliar, de sobrevivência e de estacas brotadas, e de formas de aplicação/doses de AIB apenas para a sobrevivência, sem interações significativas (Tabela 10).

A porcentagem de retenção foliar nas estacas foi muito baixa em todos os genótipos, com média de 4,7% (Tabela 10), não diferindo em função dos tratamentos com AIB, diferentemente do ocorrido na estaquia de verão/outono (Tabela 1). Contudo, mesmo com baixa retenção foliar, os genótipos G4 e G26 se destacaram pela maior sobrevivência, como ocorreu na estaquia de verão/outono, superior aos demais genótipos, que evidenciaram responder mais negativamente à queda das folhas. Os tratamentos sem AIB e P 4.000 proporcionaram as maiores taxas de sobrevivência, não diferindo os demais tratamentos entre si.

Tabela 10 – Retenção foliar, sobrevivência e estacas brotadas de quatro genótipos de erva-mate na estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Genótipo	Retenção foliar (%)	Sobrevivência (%)	Brotação (%)
G4	9,5 a	63,0 a	50,7 b
G15	1,2 c	22,0 b	68,3 a
G26	5,0 b	56,0 a	40,6 b
G28	3,0 c	25,0 b	54,4 b
Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)			
0	6,6 ^{ns}	50,6 a	61,2 ^{ns}
P 2.000	4,4	34,4 b	49,6
H 2.000	3,1	36,2 b	52,4
P 4.000	4,7	46,9 a	46,7
H 4.000	5,0	39,4 b	57,7
Média	4,7	41,5	53,5
CV (%)	90,82	29,36	50,69

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} - não significativo pelo teste F.

Portanto, a elevada queda de folhas nesta época de estaquia, com os genótipos G4 e G26 mantendo considerável porcentagem de estacas vivas, demonstra que o comportamento frequentemente observado em erva-mate, de que a capacidade de retenção de folhas é fundamental para a sobrevivência das estacas, não pode ser aplicada como regra genericamente, podendo variar com o genótipo, a época de estaquia e a aplicação ou não de AIB. Santos (2011) observou que há variabilidade genética em erva-mate também em relação à necessidade da presença de folhas para a estaca se manter viva, quando aplicado AIB, pois dois genótipos estudados que apresentavam a mesma retenção foliar tiveram comportamentos distintos quanto à sobrevivência.

Considerando que as estacas por ocasião da coleta apresentavam-se mais lignificadas que as de verão/outono, e não haviam iniciado a brotação, é possível que a maior reserva acumulada nas plantas matrizes e, portanto, nas estacas, tenham contribuído para manterem-se vivas, mesmo com a queda das folhas. Penso et al. (2016) observaram na estaquia da oliveira 'Koroneiki', que mesmo com a ausência de folhas, uma maior sobrevivência ocorreu quando realizada em junho, o que poderia ser explicado pelo fato

de as plantas matrizes encontrarem-se com crescimento vegetativo paralisado e, possivelmente, com alta concentração de reservas nos tecidos mais lenhosos.

A porcentagem de estacas brotadas foi, em média, de 53,5%, mais elevada no genótipo G15, não diferindo nos demais genótipos e também em razão dos tratamentos com AIB (Tabela 10). A brotação foi, portanto, superior à verificada na estaquia de verão/outono (Tabela 8), quando a média foi de 20,9% de estacas brotadas, com a maior taxa ocorrendo no G28 (41,9%). Esse comportamento se justifica pela realização da estaquia poucos dias antes do início da primavera, período em que ocorre naturalmente a brotação nos ervais, e também em resposta à elevada queda de folhas, estimulando a brotação das gemas, e à temperatura mais elevada no interior da estufa.

As variáveis sobrevivência e retenção foliar apresentaram, no decorrer do período da estaquia, interação significativa de dias após a estaquia x formas de aplicação/doses de AIB para a retenção foliar dos genótipos G15, G26 e G28, e para a sobrevivência dos genótipos G4 e G26. O efeito de dias após a estaquia, independentemente, foi significativo para a retenção foliar do genótipo G4, e para a sobrevivência dos genótipos G15 e G28.

A retenção de folhas do genótipo G15 (Tabela 11) apresentou queda significativa já na segunda semana de estaquia, principalmente nos tratamentos com AIB, onde atingiu porcentagens abaixo de 16,2%, e ausência de folhas aos 35 dias, nos tratamentos P 2.000, P 4.000 e H 4.000. O tratamento sem AIB apresentou progressiva queda de folhas, mantendo porcentagem superior aos demais tratamentos até os 56 dias. Ao final, o genótipo apresentou a retenção média de apenas 1,2% das folhas.

Tabela 11 – Progressão da retenção foliar do genótipo G15 de erva-mate durante o período de estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Genótipo G15 - Retenção foliar (%)				
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
7	97,5 Aa	77,5 Ba	70,0 Ca	77,5 Ba	66,2 Ca
14	51,2 Ab	8,8 Cb	16,2 Bb	7,5 Cb	6,2 Cb
21	36,2 Ac	5,0 Cb	13,8 Bb	5,0 Cb	1,2 Cb
28	25,0 Ad	2,5 Bb	8,8 Bc	2,5 Bb	0,0 Bb
35	20,0 Ad	0,0 Bb	6,2 Bc	1,2 Bb	0,0 Bb
42	17,5 Ae	0,0 Bb	6,2 Bc	1,2 Bb	0,0 Bb
49	15,0 Ae	0,0 Bb	6,2 Bc	1,2 Bb	0,0 Bb
56	12,5 Ae	0,0 Bb	5,0 Bc	1,2 Bb	0,0 Bb
63	10,0 Af	0,0 Ab	3,8 Ac	1,2 Ab	0,0 Ab
70	7,5 Af	0,0 Ab	3,8 Ac	1,2 Ab	0,0 Ab
77	6,5 Af	0,0 Ab	1,2 Ac	1,2 Ab	0,0 Ab
84	5,0 Af	0,0 Ab	1,2 Ac	1,2 Ab	0,0 Ab
90	5,0 Af	0,0 Ab	0,0 Ac	1,2 Ab	0,0 Ab
C.V. (%)	51,98				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Nos genótipos G4 e G26 (Tabela 12) e G28 (Tabela 13), a queda de folhas foi elevada e gradativa até os 28 a 35 dias. Neste período a queda foi com menor intensidade sem AIB nos genótipos G26 e G28, mas aos 35 dias as estacas sem AIB passaram a apresentar porcentagens similares aos demais tratamentos. As médias finais foram inferiores a 10% de retenção foliar.

Tabela 12 - Progressão da retenção foliar dos genótipos G26 e G4 de erva-mate durante o período de estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Retenção foliar (%)					Genótipo G4
	Genótipo 26					
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)					
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000	
7	100,0 Aa	90,0 Ba	97,5 Aa	83,8 Ba	92,5 Ba	98,5 a
14	70,0 Ab	31,2 Bb	32,5 Bb	30,0 Bb	25,0 Bb	77,0 b
21	41,2 Ac	15,0 Bc	21,2 Bc	13,8 Bc	12,5 Bc	45,0 c
28	22,5 Ad	11,2 Bc	13,8 Bd	10,0 Bc	6,2 Bc	28,2 d
35	11,2 Ae	5,0 Ad	8,8 Ad	7,5 Ac	5,0 Ac	16,0 e
42	8,8 Ae	3,8 Ad	7,5 Ad	7,5 Ac	3,8 Ac	13,8 e
49	8,8 Ae	3,8 Ad	6,2 Ad	6,2 Ac	2,5 Ac	12,2 e
56	8,8 Ae	2,5 Ad	6,2 Ad	5,0 Ac	2,5 Ac	10,5 e
63	8,8 Ae	2,5 Ad	6,2 Ad	5,0 Ac	2,5 Ac	10,2 e
70	8,8 Ae	2,5 Ad	6,2 Ad	5,0 Ac	2,5 Ac	10,2 e
77	8,8 Ae	2,5 Ad	6,2 Ad	5,0 Ac	2,5 Ac	9,8 e
84	8,8 Ae	2,5 Ad	6,2 Ad	5,0 Ac	2,5 Ac	9,8 e
90	8,8 Ae	2,5 Ad	6,2 Ad	5,0 Ac	2,5 Ac	9,5 e
C.V. (%)	32,26					24,9

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 13 - Progressão da retenção foliar do genótipo G28 de erva-mate durante o período de estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Genótipo G28 - Retenção foliar (%)				
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
7	98,8 Aa	97,5 Aa	98,8 Aa	98,8 Aa	100,0 Aa
14	68,8 Cb	83,8 Ab	62,5 Db	80,0 Ab	73,8 Bb
21	48,8 Ac	40,0 Bc	25,0 Dc	52,5 Ac	33,8 Cc
28	32,5 Ad	21,2 Bd	11,2 Cd	21,2 Bd	17,5 Bd
35	20,0 Ae	11,2 Be	6,2 Cd	3,8 Ce	11,2 Be
42	13,8 Af	10,0 Ae	5,0 Bd	2,5 Be	11,2 Ae
49	10,0 Af	7,5 Ae	5,0 Ad	2,5 Ae	8,8 Ae
56	5,0 Ag	6,2 Ae	5,0 Ad	2,5 Ae	8,8 Ae
63	5,0 Ag	5,0 Ae	5,0 Ad	2,5 Ae	8,8 Ae
70	3,8 Ag	5,0 Ae	5,0 Ad	2,5 Ae	7,5 Ae
77	3,8 Ag	5,0 Ae	2,5 Ad	1,2 Ae	7,5 Ae
84	3,8 Ag	3,8 Ae	2,5 Ad	1,2 Ae	7,5 Ae
90	2,5 Ag	3,8 Ae	2,5 Ad	0,0 Ae	6,2 Ae
C.V. (%)	19,25				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Estacas do genótipo G4 não tratadas com AIB mantiveram-se 100% vivas até os 63 dias, quando a sobrevivência foi reduzida para 80%, taxa muito satisfatória (Tabela 14). Nos tratamentos com AIB a sobrevivência manteve-se estável até 49 dias, sem diferir da testemunha, quando ocorreu um significativo decréscimo. Entre os tratamentos com AIB a taxa de sobrevivência não diferiu até a penúltima semana, quando houve maior mortalidade nas menores doses (P 2.000 e H 2.000).

Tabela 14 - Progressão da sobrevivência dos genótipos G4 e G15 de erva-mate durante o período de estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Sobrevivência (%)					Genótipo G15
	Genótipo G4					
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)					
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000	
7	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
14	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
21	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
28	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	98,5 a
35	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	94,5 a
42	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	97,5 Aa	100,0 Aa	85,5 b
49	100,0 Aa	97,5 Aa	95,0 Aa	97,5 Aa	95,0 Aa	70,0 c
56	100,0 Aa	80,0 Bb	82,5 Bb	85,0 Bb	90,0 Ba	54,5 d
63	100,0 Aa	80,0 Bb	77,5 Bc	82,5 Bb	82,5 Bb	45,0 e
70	92,5 Ab	67,5 Bc	75,0 Bc	80,0 Bb	77,5 Bb	34,0 f
77	92,5 Ab	65,0 Bc	65,0 Bc	77,5 Bb	72,5 Bc	31,5 f
84	90,0 Ab	65,0 Bc	60,0 Bd	75,0 Bb	67,5 Bc	26,0 g
90	80,0 Ab	55,0 Cc	45,0 Ce	70,0 Bb	65,0 Bc	22,0 g
C.V. (%)	9,5					16,47

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

No genótipo G15 (Tabela 14) não houve efeito significativo de formas de aplicação/doses de AIB, se mantendo até os 35 dias elevada a sobrevivência, acima de 94,5%, quando iniciou um decréscimo gradual, até atingir apenas 22% de estacas vivas.

No genótipo G26 (Tabela 15) a sobrevivência se manteve elevada até os 49 dias, superior a 95%, sem os tratamentos diferirem entre si, quando iniciou a redução gradual e significativa nos tratamentos com a menor dose (P 2.000 e H 2.000) e, após os 63 dias, com a maior dose (P 4.000 e H 4.000). Sem AIB, a mortalidade iniciou após os 63 dias, porém manteve-se ao final do período com taxas superiores aos tratamentos com AIB, exceto em relação a P 4.000. A menor sobrevivência foi apresentada pelo P 2.000. No genótipo G28 (Tabela 15) não houve efeito significativo de formas de aplicação/doses de AIB, se mantendo a sobrevivência elevada, acima de 96,0%, até os 42 dias, quando houve um decréscimo gradual, até atingir apenas 25,0% de estacas vivas.

Tabela 15 - Progressão da sobrevivência dos genótipos G26 e G28 de erva-mate durante o período de estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Sobrevivência (%)					Genótipo G28
	Genótipo G26					
	Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)					
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000	
7	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
14	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
21	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
28	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
35	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 a
42	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	97,5 Aa	96,0 a
49	100,0 Aa	95,0 Aa	97,5 Aa	97,5 Aa	97,5 Aa	81,5 b
56	95,0 Aa	87,5 Bb	85,0 Bb	97,5 Aa	95,0 Aa	59,5 c
63	90,0 Aa	72,5 Bc	85,0 Ab	92,5 Aa	87,5 Aa	42,5 d
70	87,5 Ab	65,0 Cc	75,0 Bc	75,0 Bb	75,0 Bb	35,0 e
77	80,0 Ab	65,0 Bc	67,5 Bc	72,5 Ab	75,0 Ab	32,0 e
84	80,0 Ab	50,0 Cd	57,5 Cd	70,0 Bb	65,0 Bc	25,5 f
90	72,5 Ac	35,0 Ce	50,0 Bd	67,5 Ab	55,0 Bd	25,0 f
C.V. (%)	7,56					12,54

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados evidenciam uma resposta temporal de redução da sobrevivência das estacas, em decorrência da elevada queda de folhas ocorrida em todos os genótipos nas três a quatro primeiras semanas (21 a 28 dias). Neste período as estacas se mantiveram vivas, porém, após 7 a 8 semanas (49 a 56 dias), se deu início a mortalidade de parte considerável das estacas, possivelmente em decorrência da redução do processo de fotossíntese ou, como sustenta Vignolo et al. (2014), da indisponibilidade de reservas contidas nas folhas, independente do processo fotossintético. Nesta difícil condição, merece destaque as taxas de sobrevivência apresentadas pelos genótipos G4 e G26, superiores a 50%, comportamento verificado também na estaquia de verão/outono.

O efeito de genótipos foi significativo para as variáveis porcentagem de estacas enraizadas, estacas vivas enraizadas e não enraizadas com calo, sem influência da forma

e dose de tratamento com AIB, exceto para a porcentagem de estacas não enraizadas com calo (Tabela 16).

As formas e doses de tratamento com AIB, como na estaquia de verão/outono, não alteraram a porcentagem de enraizamento das estacas (Tabela 16), com o genótipo G4 apresentando maior enraizamento (40,5%), similar ao obtido na estaquia de verão/outono (44,7%) (Tabela 8), seguido pelo genótipo G26, com 18,5%, inferior ao anteriormente obtido. Os genótipos G15 e G28 apresentaram enraizamento praticamente nulo. Considerando apenas as estacas vivas, observa-se que, no genótipo G4, com média de 71,5% de sobrevivência (Tabela 10), 63,5% das estacas enraizaram (Tabela 16), similar ao verificado na estaquia de verão/outono (Tabela 8), porém, nos demais, o enraizamento se manteve baixo, principalmente no G26, que com 65% de estacas vivas apenas 29,2% enraizaram.

Tabela 16 – Porcentagem de estacas enraizadas, vivas enraizadas e não enraizadas com calo de quatro genótipos de erva-mate na estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Genótipo	Estacas enraizadas (%)	Estacas vivas enraizadas (%)	Estacas não enraizadas com calo (%)
G4	40,5 a	65,3 a	7,5 b
G15	0,0 c	0,0 c	13,5 a
G26	18,5 b	29,2 b	21,5 a
G28	3,0 c	6,0 c	16,0 a
Formas/doses AIB (P: mg kg ⁻¹ ; H: mg L ⁻¹)			
0	16,2 ^{ns}	20,7 ^{ns}	23,1 a
P 2.000	13,8	28,4	8,8 b
H 2.000	11,2	24,1	15,6 a
P 4.000	18,8	25,6	11,2 b
H 4.000	17,5	26,9	14,4 a
Média	15,5	25,1	14,6
C.V. (%)	84,12	89,07	65,00

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} - não significativo pelo teste F.

Figura 3 - Estacas brotadas (A), enraizadas com folha (B) e sem folha (C), e apenas com calo (D) de genótipos de erva-mate na estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó e em solução hidroalcoólica. Passo Fundo, RS



Fonte: Imagens da autora.

As porcentagens de enraizamento na primavera foram, portanto, exceto no genótipo G4, inferiores às obtidas na estaquia de verão/outono, assim como a retenção de folhas, que foi destacadamente menor. Mayer (2018) também observou variação no comportamento de clones de erva-mate quanto à capacidade de enraizamento, em função da época de estaquia. A maior ocorrência de brotação nesta época (Tabela 10) pode ter representado um dreno de fotoassimilados que seriam utilizados na formação de raízes, resultando em menores taxas de enraizamento. Lima et al. (2011) ressaltam que a queda de folhas pode propiciar um déficit de carboidratos, devido à insuficiência de reservas armazenadas ou por não terem sido transportadas em tempo hábil para que ocorresse o enraizamento, hipótese também sustentada por Vignolo et al. (2014).

As estações mais quentes do ano podem favorecer a obtenção de boas taxas de enraizamento, pois o metabolismo das plantas aumenta, proporcionando condições fisiológicas favoráveis ao crescimento e desenvolvimento (NERY; ZUFFELLATO-RIBAS; KOEHLER, 2014). De fato, na maioria das espécies, a primavera pode ser considerada adequada para a coleta de estacas, em virtude dos meristemas de crescimento encontrarem-se ativos, com folhas jovens produzindo auxinas e cofatores para o enraizamento. Porém, no caso da erva-mate, a coleta no início da primavera, quando as plantas ainda não iniciaram a brotação, o que ocorrerá apenas no leito de enraizamento, talvez não seja recomendada, pelas razões relacionadas anteriormente. Possivelmente, a coleta das estacas a partir da segunda metade da primavera pudesse trazer resultados mais satisfatórios, como ocorreu com a estaquia de verão/outono.

Contudo, dependendo do genótipo, resultados satisfatórios podem ser obtidos mesmo em condições aparentemente adversas. Por exemplo, Sá et al. (2018) concluíram que a primavera foi a época mais favorável ao enraizamento de miniestacas de erva-mate, promovendo 68,9% de enraizamento, diferentemente do que era esperado para a espécie, pois as plantas estavam em floração, com fotoassimilados sendo drenados para a formação das flores e a frutificação, concorrendo com a formação de raízes adventícias. Os autores relatam que, possivelmente, as reservas acumuladas ao longo das estações mais frias (outono e inverno), durante o período de repouso vegetativo, foram disponibilizadas no início da fase reprodutiva, contribuindo para a iniciação radicial.

A porcentagem de estacas não enraizadas com calo foi menor no genótipo G4, não diferindo entre si os demais genótipos (Tabela 16). O tratamento sem AIB, e com AIB em solução hidroalcoólica, promoveram maior formação de calo (14,4 a 23,1% das estacas não enraizadas). Nas duas épocas houve maior porcentagem de estacas com calo sem AIB. De maneira similar, em miniestaquia de erva-mate, as maiores taxas de calogênese (15% e 26,4%) ocorreram quando não houve aplicação exógena do regulador vegetal, realizada a estaquia na primavera e verão, respectivamente (SÁ et al., 2018).

A maior porcentagem de estacas não enraizadas com calo, em relação à estaquia de verão/outono, pode ser atribuída à menor porcentagem de estacas vivas enraizadas. Embora Stuepp et al. (2017) afirmem que a formação de calo prejudica o enraizamento de estacas de erva-mate, indicando que a rizogênese é direta, sem a dependência da formação anterior de calo, é de se considerar que, quando enraizadas, as estacas apresentavam calo, o que permite supor que, se a estaquia se estendesse por um maior período o enraizamento pudesse ocorrer. Quadros (2009) afirma que a presença de calo é um dos fatores que pode afetar positiva ou negativamente o enraizamento da erva-mate.

O efeito de genótipos foi significativo para as variáveis massa fresca, volume de raízes por estaca, comprimento total de raízes, comprimento de raízes com diâmetro menor e maior que 0,5 mm de diâmetro e diâmetro médio de raízes, sem influência da presença do AIB nas diferentes formas e doses de aplicação (Tabela 17). O genótipo G4 se destacou em todas as variáveis analisadas, não diferindo de G26 apenas quanto à massa fresca e volume de raízes, e o comprimento de raízes com diâmetro maior que 0,5 mm. Considerando que o crescimento de raízes, mesmo nos melhores tratamentos, foi reduzido, o comprimento de raízes com mais de 0,5 mm foi praticamente insignificante.

Tabela 17 – Massa fresca, volume, comprimento total, com diâmetro maior e menor que 0,5 mm, e diâmetro médio de raízes de quatro genótipos de erva-mate na estaquia de primavera, 90 dias após a aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Genótipos	Raízes					
	Massa fresca/estaca (g)	Volume/estaca (cm ³)	Comprimento (cm)			Diâmetro médio (mm)
			Total	Diâmetro ≤ 0,5 mm	Diâmetro > 0,5 mm	
G4	0,066 a	0,043 a	18,2 a	10,8 a	0,066 a	0,470 a
G15	0,000 b	0,000 b	0,0 c	0,0 c	0,000 b	0,000 c
G26	0,039 a	0,024 a	11,3 b	7,1 b	0,039 a	0,282 b
G28	0,015 b	0,013 b	5,6 c	3,3 c	0,015 b	0,076 c
Formas/doses de AIB (P:mg kg ⁻¹ ; H:mg L ⁻¹)						
0	0,022 ^{ns}	0,011 ^{ns}	5,4 ^{ns}	3,2 ^{ns}	0,022 ^{ns}	0,183 ^{ns}
P 2.000	0,046	0,025	11,7	7,1	0,046	0,226
H 2.000	0,037	0,033	14,8	8,9	0,037	0,188
P 4.000	0,026	0,016	7,2	4,4	0,026	0,223
H 4.000	0,019	0,012	4,6	2,8	0,019	0,216
Média	0,030	0,020	8,9	5,3	0,030	0,207
C.V. (%)	2,32	1,76	72,47	64,17	2,32	7,41

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} - não significativo pelo teste F.

Portanto, não apenas a porcentagem de estacas enraizadas foi menor em relação à estaquia de verão/outono, como o desenvolvimento das raízes foi inferior. Também não houve efeito dos tratamentos com AIB, enquanto no verão/outono o crescimento de raízes foi estimulado pela maior dose de AIB (4.000 mg L⁻¹), em solução hidroalcoólica ou pó (Tabela 8). A concordância está em relação aos genótipos, pois nas duas épocas o G4 e o G26 se destacaram.

Verifica-se assim, que não é possível afirmar, para todos os genótipos de erva-mate, que o simples tratamento das estacas com AIB apresentará efeito fitotóxico, seja na forma de pó ou solução hidroalcoólica, em doses mais elevadas ou mais baixas. Percebe-se que a redução da retenção foliar e da sobrevivência pode ocorrer, com efeito sobre o potencial de enraizamento, talvez relacionado com a concentração de auxina

naturalmente existente, que somada à aplicação exógena pode alcançar níveis tóxicos (TAIZ; ZEIGER, 2017, p. 422). Portanto, possivelmente, dada a variabilidade genética da espécie, será necessário definir um protocolo de produção de mudas por estaquia para cada planta matriz selecionada agronomicamente.

4.2 Estudo 2: Atividades enzimáticas em estacas de erva-mate associadas à doses e forma de aplicação de AIB

Em geral, a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, no período de 35 dias avaliado, foi crescente, com redução ou estabilização após 21 ou 28 dias, enquanto a atividade da AIA oxidase apresentou um padrão inverso, com os maiores níveis nas primeiras semanas de estaquia, diminuindo posteriormente. O importante papel destas enzimas nas diferentes fases do processo de formação de raízes adventícias foi constatado em estudos com diversas espécies de plantas (ROUT, 2006; HUSEN, 2008; KOSE et al., 2011; YAN et al., 2014; HUSEN et al., 2015; ILCZUK; JACYGRAD, 2016; PORFIRIO et al., 2016; ZHANG et al., 2017; GOEL; KAUR; KUMAR, 2018).

4.2.1 Peroxidase

Analisados os genótipos individualmente, os resultados obtidos demonstraram que a atividade da peroxidase apresentou interação significativa entre dias após a estaquia x formas/doses de aplicação do AIB. As estacas, após coletadas nas plantas, foram imediatamente analisadas. Em todos os genótipos, era menor a atividade da peroxidase por ocasião da coleta, elevando já a partir da primeira semana, sem ou com AIB aplicado nas diferentes formas e doses (Tabela 18).

Sem o tratamento com AIB, o aumento da atividade persistiu elevado até os 35 dias, tempo de realização das determinações. Os tratamentos com AIB também elevaram a atividade da peroxidase e não diferiram da testemunha até 21 dias, nos genótipos G4 e G15; até os 28 dias no G26; e até os 14 dias no G28. Para a maioria dos tratamentos houve estabilidade da atividade após os 21 dias. Os tratamentos com AIB, quando diferiram após os 21 dias da testemunha, foram por apresentar decréscimo na atividade da enzima,

como em G4, no tratamento com P 2.000; G15 com H 2.000 e H 4.000; e em G26 com P 2.000 e H 2.000. Este período de elevação da atividade da peroxidase, principalmente até 21 a 28 dias, coincidiu com o de maior queda de folhas nas duas épocas de estaquia.

Tabela 18 – Atividade da peroxidase em quatro genótipos de erva-mate durante 35 dias após a estaquia de verão, submetidas as estacas à aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Atividade da peroxidase ($\mu\text{l ml}^{-1}$)				
	Genótipo G4				
	Formas/doses AIB (P: mg kg^{-1} ; H: mg L^{-1})				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
0	0,018 Ac	0,018 Ad	0,018 Ab	0,018 Ae	0,018 Ae
7	0,179 Ab	0,163 Ac	0,162 Aa	0,135 Ad	0,106 Ad
14	0,202 Ab	0,196 Ac	0,256 Aa	0,196 Ac	0,202 Ac
21	0,349 Aa	0,296 Aa	0,201 Ba	0,267 Ab	0,310 Ab
28	0,330 Aa	0,196 Bc	0,215 Ba	0,196 Bc	0,257 Bc
35	0,325 Ba	0,236 Cb	0,214 Ca	0,410 Aa	0,375 Aa
C.V. (%)	17,75				
Genótipo G15					
0	0,067 Ac	0,067 Ac	0,067 Ad	0,067 Ac	0,067 Ae
7	0,210 Ab	0,124 Ab	0,169 Ac	0,166 Ab	0,136 Ad
14	0,213 Ab	0,146 Ab	0,151 Ac	0,185 Ab	0,202 Ac
21	0,193 Bb	0,165 Bb	0,331 Aa	0,278 Aa	0,149 Bd
28	0,279 Ca	0,362 Ba	0,247 Cb	0,193 Db	0,461 Aa
35	0,329 Aa	0,321 Aa	0,262 Ab	0,329 Aa	0,272 Ab
C.V. (%)	19,69				
Genótipo G26					
0	0,026 Ad	0,026 Ad	0,026 Ad	0,026 Ad	0,026 Ad
7	0,094 Ac	0,093 Ac	0,098 Ac	0,074 Ac	0,080 Ac
14	0,113 Ac	0,108 Ac	0,138 Ab	0,083 Ac	0,091 Ac
21	0,167 Ab	0,197 Ab	0,174 Ab	0,210 Ab	0,194 Ab
28	0,150 Cb	0,291 Aa	0,269 Aa	0,166 Cb	0,228 Bb
35	0,253 Aa	0,212 Bb	0,181 Bb	0,245 Aa	0,280 Aa
C.V. (%)	18,52				
Genótipo G28					
0	0,042 Ad	0,042 Ac	0,042 Ac	0,042 Ad	0,042 Ad
7	0,127 Ac	0,097 Ab	0,128 Ab	0,115 Ac	0,097 Ac
14	0,175 Ab	0,101 Bb	0,141 Bb	0,181 Ab	0,112 Bc
21	0,237 Aa	0,245 Aa	0,246 Aa	0,219 Ab	0,262 Ab
28	0,156 Cb	0,284 Aa	0,225 Ba	0,319 Aa	0,230 Bb
35	0,246 Aa	0,264 Aa	0,247 Aa	0,286 Aa	0,316 Aa
C.V. (%)	18,75				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Aos 35 dias, a atividade da peroxidase nos genótipos G15 e G28 não apresentava diferenças entre os tratamentos, enquanto nas estacas de G4 e G26 era superior nos tratamentos com a dose mais elevada de AIB (P 4.000 e H 4.000), comparada com os tratamentos com a menor dose e, no caso do G26, também em relação à testemunha.

Entre os genótipos, observa-se que, até os 21 dias, a atividade da peroxidase se manteve, em geral, menor no G26 que no G4, principalmente nas doses mais elevadas de AIB e na testemunha. Também o G15 e G28 mantiveram, na maioria das avaliações, maior atividade da peroxidase em relação ao G26 (Tabela 18). Por sua vez, a porcentagem de sobrevivência não diferiu entre G4 e G26 (Tabela 2), tão pouco as taxas de enraizamento entre G4, G26 e G28 (Tabela 8), apenas em relação ao G15. Portanto, até os 35 dias avaliados, quando ainda não havia presença visual de emissão de raízes adventícias, embora os primórdios radiciais pudessem estar em desenvolvimento, não há resultados evidentes que demonstrem o efeito diferenciado da atividade da peroxidase sobre o enraizamento. Porém, pode ser constatada na retenção de folhas, pois as estacas de G26 foram as que apresentaram menor intensidade de queda no decorrer do período de estaquia (Tabela 4) e ao final.

A atividade da peroxidase está relacionada ao nível de estresse da planta, se constituindo em uma de suas funções promover a proteção da célula (SOARES et al., 2009). Expostas as plantas ou seus órgãos à processos de crescimento e diferenciação celular, mudanças morfogênicas, estresse químico, físico ou biológico, o acréscimo na atividade de peroxidase é determinante na capacidade de adaptação, podendo ser utilizada como um marcador bioquímico de estresse (PISA et al., 2003). Estudos comprovam que as peroxidases participam na lignificação, suberização, cicatrização de lesões e no catabolismo das auxinas (HIRAGA et al., 2001). O aumento na atividade da peroxidase promove a biossíntese de lignina, aumentando a força da parede celular, o que conseqüentemente aumenta a resistência ao estresse (ZHANG et al., 2017). O menor conteúdo de lignina observado nas estacas de *Cinnamomum kanehirae* tratadas com AIB foi atribuído à menor atividade da peroxidase (CHO et al., 2011).

Na propagação por estaquia, dentre as razões de estresse que podem justificar o acréscimo na atividade da peroxidase, pode-se apontar: a separação das estacas da planta matriz, alterando o padrão metabólico; as lesões realizadas nas estacas, com o corte na base e no ápice, a retirada do excesso de folhas e a redução do limbo foliar em 50% das folhas mantidas; a queda das folhas durante o processo, em especial nas primeiras semanas; a alteração das condições ambientais, de maior temperatura e umidade no interior da estufa, conforme a época de estaquia; além dos tratamentos com fitorregulador.

O genótipo G15, quando comparado aos demais genótipos, apresentou atividade maior da peroxidase imediatamente após a coleta, corroborando que há de fato uma característica intrínseca ao genótipo de sofrer maior estresse ocasionado pela excisão da estaca da planta matriz. Isso justifica a menor habilidade de enraizamento, resultando na baixa porcentagem de estacas enraizadas.

Comportamento similar ao do presente estudo foi relatado por Hettwer, Nienow e Schons (2017), na estaquia de verão de genótipos de erva-mate, dentre eles o G4, G15 e G28, que constam na presente pesquisa, tratando com doses crescentes de AIB (0, 3.000, 6.000 e 9.000 mg L⁻¹). A atividade da peroxidase foi determinada nas folhas e hastes por ocasião da coleta das estacas e aos 6, 12 e 18 dias após a estaquia. A atividade da peroxidase nas folhas foi maior que nas hastes, e o incremento se deu após 6 dias, com pico na determinação aos 12 dias, principalmente nas doses mais elevadas, evidenciando se tratar de um período de elevado estresse. Como possível consequência, foi verificada maior queda de folhas e mortalidade no período entre 21 e 35 dias após a estaquia, de modo menos intenso nos genótipos G4 e G28. Concluíram que, em doses mais elevadas, o uso do AIB pode propiciar estresse ou efeito fitotóxico, podendo a resposta variar com a capacidade de cada genótipo se adaptar ou reagir aos fatores determinantes de estresse. Megre, Dokane e Kondratovics (2011) corroboram afirmando que mudanças na atividade da peroxidase pode ser um indicativo de estresse causado quando aplicado AIB.

Resposta semelhante na atividade da peroxidase foi observado na estaquia de *Dalbergia sissoo* Roxb. (jacarandá do norte da Índia), quando a atividade foi mínima por ocasião da estaquia, aumentou até os 21 dias, e decresceu aos 35 dias de estaquia. O

incremento da atividade da peroxidase foi associado com a indução do primórdio radicular e crescimento de raízes adventícias (HUSEN, 2008).

Em estacas de *Camellia sinensis*, a atividade foi maior quando tratadas com AIB exógeno, comparadas com as não tratadas, e o tratamento com o AIB proporcionou maior porcentagem de enraizamento e máximo número de raízes por estaca. Nas estacas tratadas a atividade da peroxidase aumentou na fase de expressão (14-18 dias), enquanto que nas estacas controle a atividade teve uma estabilização ou um baixo incremento durante as fases de iniciação (12-14 dias) e expressão (ROUT, 2006). Os resultados concordam com os obtidos com erva-mate, quanto ao período de aumento da atividade da enzima, mas discorda ao afirmar que nas estacas sem AIB o incremento foi pouco percebido, uma vez que no presente estudo as estacas testemunha apresentaram resultados iguais ou superiores aos tratamentos com AIB. Os resultados obtidos também discordam de Zanol et al. (2012), estudando o enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.), ao verificar que na presença de AIB ocorreu um aumento da atividade da peroxidase em relação à testemunha sem AIB, e que não houve diferenças significativas entre as concentrações de AIB utilizadas.

Em estacas de cultivares de porta-enxertos de videira, a atividade da peroxidase aumentou até 14 a 22 dias e diminuiu consideravelmente até quase o final do período avaliado (65 dias após a estaquia) (KOSE et al., 2011). De forma similar, a atividade da peroxidase foi maior na fase de formação de raízes adventícias em microestacas de *Bacopa monnieri*, declinando nas fases subsequentes, o que sugere um importante papel desta enzima durante as fases de indução, iniciação e organização de raízes (GOEL; KAUR; KUMAR, 2018). O aumento na atividade da peroxidase nos primeiros estágios do enraizamento aumenta a resistência da parede celular e, conseqüentemente, a resistência ao estresse. Nas fases posteriores, a atividade da peroxidase diminui, o que facilita a expansão e o crescimento celular (ZHANG et al., 2017).

A atividade da peroxidase é regulada durante a iniciação, crescimento e desenvolvimento de raízes adventícias, e geralmente é mínima na fase de indução e máxima na fase de iniciação (HUSEN; PAL, 2007; LI et al., 2009). Também está

relacionada com o conteúdo de auxina, que diminui quando a atividade da peroxidase é maior (DE KLERK; KRIEKEN; DE JONG, 1999), pois a descarboxilação oxidativa pela peroxidase pode ser um processo de inativação do AIA endógeno (HIRAGA et al., 2001).

A aplicação de ácido naftaleno acético (ANA) aumentou a atividade da peroxidase em estacas de *Hemarthria compressa* (YAN et al., 2014) e do híbrido *Populus tremula* X *Populus tremuloides* (YAN et al., 2017), que também resultou nos melhores resultados de enraizamento, o que sugere que a peroxidase age como antioxidante, protegendo o AIA endógeno da oxidação e os tecidos vegetais do estresse oxidativo causado pela lesão no preparo da estaca (YAN et al., 2014). Importante correlação entre a atividade da peroxidase e a habilidade de enraizamento foi observada também por Kose et al. (2011), em porta-enxertos de videira, com a maior atividade da peroxidase constatada no genótipo de fácil enraizamento, enquanto o de difícil enraizamento apresentou a menor atividade, contrariando resultados encontrados no presente estudo, em que o genótipo G15, de menor enraizamento, apresentou maior atividade da peroxidase logo após a coleta. Por outro lado, alta atividade da peroxidase foi relacionada com menor capacidade de enraizamento em *Arbutus unedo* e *Taxus baccata* (METAXAS et al., 2004), e em *Ebenus cretica* L., revelada pela diminuição do nível de auxina nos tecidos, o que seria requisito para a formação das raízes (SYROS et al., 2004).

Os resultados obtidos, portanto, demonstram que, embora o acréscimo na atividade da enzima tenha ocorrido para todos os genótipos nas primeiras cinco semanas, as respostas podem diferir de acordo com o genótipo e tratamento com AIB efetuado, no que diz respeito à forma de aplicação, em pó ou solução hidroalcoólica, e principalmente a dose.

4.2.2 Polifenoloxidase

A atividade da polifenoloxidase apresentou, para todos os genótipos, interação significativa entre dias após a estaquia x formas/doses de aplicação do AIB (Tabela 19). Verificou-se que a atividade da polifenoloxidase se mostrou, de modo geral, menor na planta matriz, determinada imediatamente após a coleta das estacas, se mantendo sem

diferir até os 7 e, em alguns tratamentos, até 14 dias, quando apresentou um acréscimo significativo até os 28 dias, com posterior redução na maioria dos tratamentos.

Tabela 19 – Atividade da polifenoloxidase em quatro genótipos de erva-mate durante 35 dias após a estaquia de verão, submetidas as estacas à aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Atividade da polifenoloxidase ($\mu\text{mol catecol transformado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ massa fresca)				
	Genótipo G4				
	Formas/doses AIB (P: mg kg^{-1} ; H: mg L^{-1})				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
0	205,5 Aa	205,5 Ab	205,5 Ab	205,5 Aa	205,5 Ab
7	259,8 Aa	266,2 Aa	240,0 Ab	226,9 Aa	204,2 Ab
14	284,2 Aa	323,1 Aa	351,1 Aa	357,9 Aa	316,7 Aa
21	281,8 Aa	296,0 Aa	336,2 Aa	323,6 Aa	354,4 Aa
28	309,1 Aa	332,9 Aa	288,9 Aa	291,1 Aa	300,9 Aa
35	315,5 Aa	158,0 Bb	380,7 Aa	197,5 Bb	210,9 Bb
C.V. (%)	18,90				
	Genótipo G15				
0	256,7 Ad	256,7 Ab	256,7 Ab	256,7 Ab	256,7 Ab
7	364,2 Ab	282,2 Ba	292,9 Bb	266,7 Bb	277,5 Bb
14	446,2 Aa	300,2 Ba	499,8 Aa	345,1 Ba	365,3 Ba
21	312,9 Ac	244,4 Bb	317,5 Ab	343,1 Aa	212,7 Bb
28	284,0 Bc	327,3 Ba	341,3 Bb	372,9 Aa	417,5 Aa
35	214,2 Bd	226,0 Bb	283,5 Ab	226,0 Bb	348,0 Aa
C.V. (%)	12,59				
	Genótipo G26				
0	144,2 Ab	144,2 Ab	144,2 Ab	144,2 Ab	144,2 Ab
7	172,9 Ab	171,3 Ab	180,9 Ab	156,4 Ab	190,9 Ab
14	207,8 Ab	217,1 Aa	202,7 Ab	178,9 Ab	186,9 Ab
21	243,8 Aa	239,3 Aa	314,2 Aa	263,3 Aa	276,9 Aa
28	276,4 Aa	257,3 Aa	341,8 Aa	168,9 Bb	316,2 Aa
35	250,0 Ba	196,7 Bb	208,2 Bb	211,8 Ba	329,1 Aa
C.V. (%)	19,54				
	Genótipo G28				
0	293,5 Aa	293,5 Ab	293,5 Ab	293,5 Ab	293,5 Ab
7	339,8 Aa	250,0 Ab	327,1 Ab	318,2 Ab	247,8 Ab
14	427,1 Aa	408,2 Aa	445,8 Aa	482,9 Aa	565,5 Aa
21	334,2 Aa	396,9 Aa	390,4 Aa	473,11 Aa	355,8 Ab
28	332,7 Ba	401,5 Ba	377,8 Ba	564,4 Aa	274,0 Bb
35	264,9 Aa	256,0 Ab	210,9 Ab	207,5 Ab	284,9 Ab
C.V. (%)	21,50				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Como observado para a peroxidase, a atividade da polifenoloxidase sem AIB manteve-se, de modo geral, sem diferir dos tratamentos com AIB, ou mais elevada, exceto aos 35 dias com solução hidroalcoólica no G15, nas duas doses, e no G26 com H 4.000. Sem AIB, a atividade não diferiu no decorrer dos 35 dias para os genótipos G4 e G28; elevou-se após 14 dias no G26, se mantendo posteriormente estável; e no G15 apresentou um pico aos 14 dias.

No genótipo G4, diferenças sem e com AIB foram constatadas apenas aos 35 dias. Nos tratamentos com AIB, houve aumento na atividade a partir da primeira semana (7 dias) no tratamento P 2.000, e a partir da segunda semana (14 dias) nos tratamentos H 2.000 e H 4.000, mantendo-se estável até os 28 dias, quando reduziu, exceto na testemunha e em H 2.000, que não diferiram.

No genótipo G15 a atividade da polifenoloxidase teve comportamento bastante variado entre os tratamentos sem e com AIB. Em todos os tratamentos, um pico na atividade na segunda semana, determinado aos 14 dias, com início mais cedo, na primeira semana, no tratamento T 2.000. A atividade manteve-se alta até os 28 dias no tratamento T 4.000 e até os 35 dias no H 4.000. Aos 35 dias, a atividade era similar à avaliação inicial nos tratamentos com e sem AIB, sem diferir entre si, exceto H 4.000.

A atividade da polifenoloxidase no genótipo G26 atingiu os maiores níveis na terceira semana de estadia, determinada aos 21 dias, com exceção do tratamento P 2.000, que se mostrou mais elevada aos 14 dias. A atividade se manteve elevada até os 35 dias, exceto nos tratamentos P 2.000 e H 2.000. No genótipo 28, um pico de atividade foi verificado no tratamento H 4.000 aos 14 dias, mas nos demais tratamentos com AIB os maiores níveis de atividade ocorreram dos 14 aos 28 dias. Aos 35 dias, os tratamentos não diferiram entre si.

Pode-se dizer que a atividade da polifenoloxidase apresentou um comportamento similar ao observado para a peroxidase, de acréscimo no período estudado, justificado pelo fato de tratar-se de enzimas envolvidas nos mecanismos de redução do estresse (ILCZUK; JACYGRAD, 2016), e desempenham um papel importante na biossíntese de

lignina, na divisão celular, diferenciação e desenvolvimento de primórdios radiculares (HAHLBROCK; GRISEBACH, 1979; HUSEN; PAL, 2007; HUYSTEE; CAIRNS, 1982 apud YILMAZ et al. 2003; LI et al., 2009). Como diferencial constatado entre as atividades das enzimas, pode-se apontar o fato de que a redução da atividade da peroxidase não chegou a ser detectada, na maioria dos tratamentos, aos 35 dias (Tabela 18), se mostrando mais prolongada que a da polifenoloxidase.

Resultados de outros autores corroboram com os obtidos na estaquia da erva-mate. No enraizamento de estacas de três cultivares de porta-enxertos de videira, os autores também concluíram que a atividade da polifenoloxidase seguiu um padrão similar à peroxidase, aumentando aos 14 dias e diminuindo rapidamente até 51 dias, ou seja, a atividade aumenta antes do enraizamento, diminuindo quando o enraizamento adventício inicia (KOSE et al., 2011). Comportamento similar foi observado em estacas de *Camellia sinensis*, quando a atividade da polifenoloxidase aumentou durante as fases de indução e iniciação de raízes, tanto em estacas tratadas com auxina exógena como em não tratadas, e diminuiu na fase de expressão (ROUT, 2006).

O período de elevação da atividade da polifenoloxidase, principalmente até 21 a 28 dias, como também constatado para a atividade da peroxidase, coincidiu com o de maior queda de folhas, nas duas épocas de estaquia. Portanto, é de se supor que a maior atividade se deu, para as duas enzimas, em decorrência das alterações provocadas a partir da coleta e preparo das estacas, bem como dos tratamentos com AIB, pois em dois genótipos (G4 e G28) as estacas sem AIB não diferiram no decorrer dos 35 dias. Merece destaque a menor atividade inicial e posterior da polifenoloxidase no G26, principalmente até os 21 dias, em relação aos demais genótipos (Tabela 19), também constatado para a peroxidase (Tabela 18). Ressalta-se que a queda de folhas nas estacas de G26 foi a mais baixa entre os genótipos, no decorrer de todo o período de estaquia (Tabela 4), e também se destacou pela maior sobrevivência e enraizamento, o que pode estar relacionado com uma resposta de menor estresse aos tratamentos.

Contudo, embora a ocorrência de interação significativa para todos os genótipos entre tratamentos com AIB nos 35 dias de avaliação, não foi possível constatar uma

relação direta com o comportamento de enraizamento, que foi maior e não diferiu entre si em G4, G26 e G28, em relação à G15 (Tabela 8). Por sua vez, a ausência de uma resposta mais contundente da atividade da polifenoloxidase, justifica o enraizamento não ter diferido em relação à presença ou não de AIB, e a forma de tratamento. Talvez avaliações por mais semanas pudessem trazer resultados para uma melhor interpretação.

Na estaquia de *Hemarthria compressa*, a atividade da polifenoloxidase foi maior em estacas tratadas com ANA 200 mg L⁻¹ por 20 min, indicando que o aumento na atividade durante a fase de indução pode estar associado com a maior capacidade de enraizamento de estacas tratadas com fitorregulador exógeno (YAN et al., 2014). De maneira similar, no híbrido *Populus tremula* X *Populus tremuloides*, estacas tratadas com ANA apresentaram maior atividade da polifenoloxidase aos 6 dias após a estaquia, diminuindo posteriormente, em relação à não tratadas, podendo representar melhor aptidão para o enraizamento (YAN et al., 2017).

Por sua vez, Zhang et al. (2017) afirmam que a peroxidase e a polifenoloxidase atuam no processo de formação de raízes adventícias usando distintos mecanismos, pois na estaquia de *Malus hupehensis* verificaram que o pico de maior atividade da peroxidase ocorreu aos 9 dias de estaquia, antes do ponto de formação massiva de raízes, enquanto que a atividade da polifenoloxidase aumentou continuamente antes da emergência até a formação massiva de raízes, quando atingiu o pico, aos 63 dias, indicando que o aumento contínuo na atividade da polifenoloxidase promove a formação de raízes adventícias ao longo de todo o processo, da indução ao desenvolvimento das raízes. Além disso, verificaram que a aplicação de hormônios exógenos não modificou o pico de maior atividade das enzimas, fato que concorda com o presente estudo, o que sugere que o enraizamento adventício requer uma certa quantidade de atividade enzimática endógena.

Na microestaquia de *Bacopa monnieri*, a atividade da polifenoloxidase foi menor no tratamento que apresentou maior eficiência de enraizamento, o que foi relacionado à exigência de quantidade maior de compostos monofenólicos durante o enraizamento, que interagem com auxinas na indução da formação de raízes adventícias (GOEL; KAUR; KUMAR, 2018).

4.2.3 AIA oxidase

A atividade da AIA oxidase apresentou, para todos os genótipos, interação significativa entre dias após a estaquia x formas/doses de aplicação do AIB (Tabela 20). Verificou-se que a atividade da AIA oxidase se mostrou, de modo geral, menor na planta matriz (Tempo 0), com um pico ocorrendo nos primeiros 7 dias, decrescendo posteriormente (Tabela 20). No genótipo G26, diferentemente do observado para as demais enzimas, com menor atividade neste genótipo, a AIA oxidase já era mais elevada nas estacas recém coletadas, com um pico apenas nos tratamentos P 2.000 e H 4.000.

Para alguns tratamentos o pico de atividade da AIA oxidase se deu mais tarde, como a determinada aos 28 dias em G15, nas estacas sem AIB e com H 2.000; e em G28 aos 14 dias, com H 2.000. A atividade nas estacas sem AIB, com exceção do G15, se manteve menor em relação aos tratamentos com AIB durante os 35 dias, ou não diferiu. Aos 35 dias, diferenças entre os tratamentos sem ou com AIB não mais ocorreram para todos os genótipos, com atividade da enzima menor que antes dos tratamentos (tempo 0).

Com outras espécies, resultados de pesquisa demonstram que diferenças no comportamento da atividade das enzimas podem ocorrer. Ilczuk e Jacygrad (2016) observaram, no enraizamento *in vitro* de *Cotinus coggygria* Scop. (fumeiro eurasiático, árvore fumegante) que a fase de indução de raízes correspondeu a um aumento na atividade da AIA oxidase e uma redução na atividade da peroxidase e da polifenoloxidase. O aumento da atividade da AIA oxidase, e dos conteúdos de AIA endógeno e peróxido de hidrogênio nos primeiros cinco dias, foi relacionado ao estímulo à indução e desenvolvimento dos primórdios radiculares quando utilizada auxina exógena. Nas fases de desenvolvimento e alongação de raízes o comportamento foi inverso, com aumento da atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, e baixa atividade da AIA oxidase. Fu et al. (2011) sugerem que, em cultivares de difícil enraizamento, é provável que exista uma alta atividade da AIA oxidase responsável pela degradação do AIA endógeno.

Tabela 20 – Atividade da AIA oxidase em quatro genótipos de erva-mate durante 35 dias após a estaquia de verão, submetidas as estacas à aplicação de doses de AIB em pó (P) e em solução hidroalcoólica (H). Passo Fundo, RS

Dias após a estaquia	Atividade da AIA oxidase ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
	Genótipo G4				
	Formas/doses AIB (P: mg kg^{-1} ; H: mg L^{-1})				
	0	P 2.000	H 2.000	P 4.000	H 4.000
0	245,1 Ab	245,1 Aa	245,1 Ab	245,1 Ab	245,1 Ab
7	379,4 Aa	203,2 Ca	369,9 Aa	362,3 Aa	298,5 Ba
14	93,2 Bc	157,5 Ab	73,7 Bc	150,9 Ac	206,1 Ab
21	121,3 Ac	79,4 Ac	95,6 Ac	145,1 Ac	67,0 Ac
28	108,9 Bc	86,6 Ac	82,8 Bc	108,9 Bc	81,3 Ac
35	69,9 Ac	74,0 Ac	71,3 Ac	49,9 Ad	99,4 Ac
C.V. (%)	20,24				
Genótipo G15					
0	299,4 Ab	299,4 Ab	299,4 Ab	299,4 Aa	299,4 Ab
7	287,0 Bb	525,1 Aa	165,1 Cc	191,8 Cb	543,2 Aa
14	168,0 Ac	170,9 Ac	124,2 Bd	111,8 Bc	191,8 Ac
21	72,2 Ad	53,2 Ad	94,7 Ad	113,7 Ac	89,4 Ae
28	381,3 Aa	55,6 Cd	408,9 Aa	118,5 Bc	136,6 Bd
35	65,1 Ad	62,3 Ad	85,1 Ad	78,0 Ac	48,0 Ae
C.V. (%)	12,98				
Genótipo G26					
0	307,0 Aa	307,0 Ab	307,0 Aa	307,0 Aa	307,0 Ab
7	245,1 Cb	345,1 Ba	319,4 Ba	210,8 Cb	478,5 Aa
14	35,6 Bd	48,9 Bd	42,3 Bb	67,0 Bc	163,2 Ac
21	105,6 Ac	30,8 Bd	72,8 Ab	61,3 Bc	45,1 Bd
28	48,9 Bd	102,3 Ac	41,8 Bb	89,9 Ac	72,3 Ad
35	62,3 Bd	17,0 Bd	55,1 Ab	51,3 Ac	84,7 Ad
C.V. (%)	13,90				
Genótipo G28					
0	253,7 Ab	253,7 Aa	253,7 Ab	253,7 Ac	253,7 Ac
7	468,9 Ba	203,2 Ca	131,8 Dc	566,1 Aa	526,1 Aa
14	226,9 Bb	149,9 Cb	395,6 Aa	429,9 Ab	442,3 Ab
21	138,5 Bc	113,2 Bb	128,5 Bc	96,6 Bd	252,8 Ac
28	125,6 Bc	142,3 Bb	96,6 Bc	133,2 Bd	194,7 Ad
35	36,6 Ad	101,8 Ab	28,9 Ad	100,8 Ad	63,2 Ae
C.V. (%)	16,87				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Na estaquia de *Morus alba*, a atividade da peroxidase aumentou até os 45 dias após a estaquia, quando atingiu o valor máximo, e da AIA oxidase, diferentemente do constatado com estacas de erva-mate, até os 30 dias. A aplicação de AIB aumentou a

atividade das duas enzimas. Os resultados sugerem que essas enzimas auxiliam no catabolismo da auxina, desencadeando o processo de formação de raízes adventícias, tendo a AIA oxidase um papel na fase de iniciação, enquanto a peroxidase atua na iniciação e também alongação das raízes (HUSEN et al., 2015).

Estacas de *Hemarthria compressa* apresentaram os menores níveis de atividade da AIA oxidase na fase de indução, e os melhores resultados de enraizamento quando tratadas com 200 mg L⁻¹ de ANA (YAN et al., 2014). Da mesma forma, maior enraizamento foi obtido quando estacas do híbrido *Populus tremula* X *Populus tremuloides* foram tratadas com 0,54 mM de ANA e menor atividade da AIA oxidase foi observada na fase inicial (YAN et al., 2017). Os autores sugerem que a menor atividade da AIA oxidase no período de indução de raízes adventícias possivelmente está relacionada com o maior conteúdo de AIA endógeno, responsável pelo desenvolvimento de raízes adventícias. Quando a atividade da AIA oxidase diminui, no final da fase de indução ou início da fase de iniciação de raízes, ocorre a degradação do AIA endógeno, gerando também ROS (espécies reativas de oxigênio), o que pode estimular a produção de compostos fenólicos antioxidantes (SCHOPFER et al., 2002; PORFIRIO et al., 2016).

Goel, Kaur e Kumar (2018), diferentemente, argumentam que a menor atividade da AIA oxidase durante a fase de indução e iniciação se dá devido à maior exigência de auxinas livres durante estas fases. O incremento nas fases subsequentes ocorre pela necessidade de menores níveis, ou até mesmo exigência nula de auxinas, estando a enzima, provavelmente, envolvida na oxidação e inativação da mesma. Conforme Li et al. (2009), em altas concentrações, a auxina inibe a alongação de raízes e estimula a diferenciação celular.

Portanto, a regulação das fases de enraizamento é influenciada por diversos fatores, cuja interação permanece ainda mal compreendida, e os mecanismos moleculares subjacentes ao processo continuam desconhecidos (LEGUE et al., 2014). Enquanto que o papel das enzimas oxidativas e das auxinas é amplamente descrito na literatura, os resultados tendem a ser dependentes de espécies ou genótipos (PORFIRIO et al., 2016), e os estudos referentes a esses assuntos ainda são escassos para a erva-mate. Não foi

possível assim, com os resultados obtidos neste trabalho, estabelecer uma relação consistente entre a atividade da peroxidase, da polifenoloxidase e da AIA oxidase com a capacidade de enraizamento de estacas para erva-mate, como descrito para outras espécies.

5 CONCLUSÕES

a) A estaquia no verão/outono (janeiro) é mais indicada que na primavera (setembro), com destaque nas duas épocas para os genótipos G4 e G26, com maior porcentagem de estacas enraizadas e desenvolvimento do sistema radicial.

b) A morte de estacas é sempre precedida pela queda total das folhas, porém a consequência da menor retenção foliar sobre a sobrevivência e o enraizamento pode variar com a época de estaquia, o genótipo e a aplicação ou não de AIB.

c) A porcentagem de enraizamento é determinada principalmente pela taxa de sobrevivência, demonstrando ser este o maior desafio na estaquia da erva-mate.

d) O tratamento com AIB em solução hidroalcoólica pode resultar em maior queda de folhas e mortalidade de estacas de erva-mate, dependendo do genótipo, da dose de AIB e da época de estaquia.

e) As formas e doses de tratamento com AIB não alteram a porcentagem de enraizamento, mas a aplicação de AIB na forma de pó pode ser uma alternativa promissora para obter melhores taxas de retenção foliar e sobrevivência de estacas, inclusive em doses mais elevadas, oportunizando maior qualidade do sistema radicial.

f) A acentuada queda de folhas até a terceira ou quarta semana, considerado o período mais crítico, apresenta relação com a elevação da atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, mas o grau de respostas difere de acordo com o genótipo e tratamento com AIB, em pó ou solução hidroalcoólica, e principalmente a dose.

g) A atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, em relação às estacas não tratadas, não é maior ao submeter aos tratamentos com AIB.

h) A atividade da AIA oxidase apresenta um pico nos primeiros 7 dias de estaquia, decrescendo posteriormente, possivelmente elevando os níveis de AIA endógeno.

i) As enzimas avaliadas desempenham importante papel no processo de enraizamento, mas em erva-mate não é possível estabelecer, nos primeiros 35 dias de estaquia, a relação direta com os resultados obtidos de enraizamento.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. N.; BITTENCOURT, A. M.; SANTOS, A. J. dos; EISFELD, C. L.; SOUZA, V. S. Production and price evolution of the main extractive non timber forest products in Brazil. **Cerne**, v. 15, n. 3, p. 282-287, 2009.
- ALMEIDA, N. G. **Erva-mate: tendência de mercado – safra 2006**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/qas/uploads/105/erva_tendencia_mercado2006.pdf>. Acesso em: 01 mai. 2019.
- BELNIKI, A. C.; RABEL, L. A. das N.; GOMES, E. N.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Does the presence of leaves on coleus stem cuttings influence their rooting? **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 3, p. 206-210, 2018.
- BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F.; ORRUTÉA, A. G. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 3, p. 257-267, 2007.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.
- CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2003. (Comunicado Técnico, 87).
- CHEN, L. M.; CHENG, J. T.; CHEN, E. L.; YIU, T. J.; LIU, Z. H. Naphthaleneacetic acid suppresses peroxidase activity during the induction of adventitious roots in soybean hypocotyls. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 1349-1354, 2002.
- CHO, H. Y.; CHANG, C. Y.; HUANG, L. C.; TSAI, J. B.; LIU, Z. H. Indole-3-butyric acid suppresses the activity of peroxidase while inducing adventitious roots in *Cinnamomum kanehirae*. **Botanical Studies**, v. 52, p. 153-160, 2011.
- CORRÊA, G.; VILICAHUAMAN, L. J. M.; MELO, I. B. de; BAGGIO, A. J.; FELIZARI, S. R.; RUFFATO, A. **Sistema agroflorestal de erva-mate com a progênie bi-parental Cambona 4**. Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 20p. (Circular Técnica, 1).

DA COSTA, C. T.; ALMEIDA, M. R. de; RUEDELL, C. M.; SCHWAMBACH, J.; MARASCHIN, F. S.; FETT-NETO, A. G. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 01-19, 2013.

DA COSTA, C. T. **Genes relacionados a auxinas e rizogênese advérsica em *Arabidopsis***. 2015. 44f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Centro de Biotecnologia da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1999. (Boletim técnico, 100).

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados: UFGD, 2009.

DE KLERK, G-J.; HANECAKOVA, J. Ethylene and rooting of mung bean cuttings. The role of auxin induced ethylene synthesis and phase-dependent effects. **Plant Growth Regulation**, v. 56, p. 203–209, 2008.

DE KLERK, G.; KRIEKEN, W. V. D.; DE JONG, J. C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 35, n. 3, 189-199, 1999.

DE SMET, I.; SIGNORA, L.; BEECKMAN, T.; INZÉ, D.; FOYER, C.H.; ZHANG, H. An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 33, p. 543–555, 2003.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. de; FÉLIX, G. de A.; PIRES, I. E. Resgate vegetativo de árvores de *Anadenanthera macrocarpa*. **Cerne**, v. 21, n. 1, p. 83-89, 2015.

DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. da. **Estabelecimento In Vitro de erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 7 p. (Comunicado Técnico, 215).

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

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; CARPANEZI, A. A.; TAVARES, F. R.; KOEHLER, H. S. Metodologias de aplicação de AIB no enraizamento de estacas semilenhosas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 2, p. 196-201, 2009.

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H.S.; NOGUEIRA, A.C. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax com o uso de ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Florestal**, v. 20, p. 19-31, 2010.

FONSECA, D. **Propagação clonal de genótipos superiores de erva-mate cv. Cambona 4 em diferentes substratos**. 2017. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

FU, Z.; XU, P.; HE, S.; SILVA, J. A. T. da; TANAKA, M. Dynamic changes in enzyme activities and phenolic content during in vitro rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 252-265, 2011.

GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. **Annual Plant Reviews**, v. 37, p. 127-156, 2009.

GOEL, A.; KAUR, A.; KUMAR, A. Biochemical and histological changes during in vitro rooting of microcuttings of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 3, pp. 64, 2018.

GRAÇA, M. E. C.; COOPER, M. A.; TAVARES, F. R.; CARPANEZZI, A. A. **Estaquia de erva-mate**. Curitiba: Embrapa Florestas, 1988. (Circular Técnica, 18).

GROPPO, M.; PIRANI, J. R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Aquifoliaceae. **Boletim Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 23, n. 2, p. 257-265, 2005.

GUAN, L.; MURPHY, A. S.; PEER, W. A.; GAN, L.; CHENG, Y. L. Z. Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, p. 506-521, 2015.

GUTIERREZ, L.; MONGELARD, G.; FLOKOVÁ, K.; PACURAR, D. I.; NOVÁK, O.; STASWICK, P.; KOWALCZYK, M.; PACURAR, M.; DEMAILLY, H.; GEISS, G.; BELLINI, C. Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. **The Plant Cell**, v. 24, p.2515-2527, 2012.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; JUNIOR DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7 ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2002.

HELM, C. V.; RUIZ, H. Z.; MIRANDA, A. C. de; WENDLING, I.; LIZ, M. V. de. **Metilxantinas e compostos fenólicos em amostras de erva-mate**.Colombro: Embrapa Florestas, 2017. 5 p. (Separata).

HETTWER, V. F. J. M. **Variabilidade fenotípica e potencial de enraizamento por estaquia de genótipos de erva-mate *Cambona 4***. 2013. 99f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

HETTWER, V. F. J. M. **Propagação de erva-mate por estaquia: enraizamento, respostas metabólicas ao ácido indolbutírico (AIB) e desenvolvimento de mudas após o plantio**. 2016. 127f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

HETTWER, V. F. J. M.; NIENOW, A. A.; SCHONS, J. Atividade da peroxidase em resposta ao uso do ácido indolbutírico (aib) na propagação por estaquia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 19, n. 3, p. 388-396, 2017.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

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

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

HUSEN, A.; IQBAL, M., SIDDIQUI, S. N. SOHRAB, S. S.; MASRESHA, G. Effect of indole-3-butyric acid on clonal propagation of Mulberry (*Morus alba* L.) stem cuttings: rooting and associated biochemical changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**. v. 87, p. 161–166, 2015.

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

IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura** – ano de 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

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

ILCZUK, A.; JACYGRAD, E. The effect of IBA on anatomical changes and antioxidant enzyme activity during the *in vitro* rooting of smoke tree (*Cotinus coggygria* Scop.). **Scientia Horticulturae**, v. 210, p. 268–276, 2016.

IVANCHENKO, M. G.; MUDAY, G. K.; DUBROVSKY, J. G. Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 55, p. 335–347, 2008.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

KHORSHEDUZZAMAN, A. K. M.; ALAM, M. Z.; RAHMAN, M.M.; KHALEQUE, M.M.A.; ISMAIL, H. M. M. Biochemical basis of resistance in eggplant (*Solanum melongena* L.) to *Leucinodes orbonalis* Guenee and their correlation with shoot and fruit infestation. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v. 35, p. 149-155, 2010.

KOSE, C.; ERDAL, S.; KAYA, O.; ATICI, O. Comparative evaluation of oxidative enzyme activities during adventitious rooting in the cuttings of grapevine rootstocks. **Journal Science Food Agriculture**, v. 91, p. 738-741, 2011.

KUINCHTNER, A.; BURIAL, G. A. Clima do estado do Rio Grande do Sul segundo a classificação climática de Köppen e Thornthwaite. **Disciplinarum Scientia**, v. 2, n. 1, p. 171-182, 2001.

KUROHA, T.; SATOH, S. Involvement of cytokinins in adventitious and lateral root formation. **Plant Root**, v. 1, p. 27-33, 2007.

LEGUE, V.; RIGAL, A.; BHALERAO, R. P. Adventitious root formation in tree species: involvement of transcription factors. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 2, p. 192-198, 2014.

LI, S. W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed., Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LUO, X.; CHEN, Z.; GAO, J.; GONG, Z. Abscisic acid inhibits root growth in *Arabidopsis* through ethylene biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 79, p. 44-55, 2014.

MAYER, L. **Propagação por estaquia de clones de erva-mate ‘Cambona 4’**. 2018. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

MASSOUMI, M.; KRENS, F. A.; VISSER, R. G. F.; DE KLERK, G-J. M. Etiolation and flooding of donor plants enhance the capability of *Arabidopsis* explants to root. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 3, p. 531-541, 2017.

MAURIAT, M.; PETTERLE, A.; BELLINI, C.; MORITZ, T. Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and *Arabidopsis* by affecting auxin transport. **The Plant Journal**, v. 78, p. 372-384, 2014.

MEGRE, D.; DOKANE, K.; KONDRATOVICS, U. Can changes in starch content and peroxidase activity be used as rooting phase markers for rhododendron leaf bud cuttings? **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 53, n. 1, p. 74-79, 2011.

MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; RYBKA, A. C. P.; SOBRINHO, M. R.; CERRO-QUINTANA, R. S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. R. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2188-2193, 2010.

METAXAS, D. J.; SYROS, T. D.; YUPSANIS, T.; ECONOMOU, A. S. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 257-266, 2004.

NEGISHI, N.; NAKAHAMA, K.; URATA, N.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; KAWAOKA, A. Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. **New Forests**, v. 45, p. 577-587, 2014.

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

PACHECO, J. P.; FRANCO, E. T. H. Ácido indolbutírico em diferentes diâmetros na estaquia de *Luehea divaricata*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1624-1629, 2008.

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

PAIVA, H. N. de; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: UFV, 2005. 46p. (Caderno Didático, 83).

PEÑA, M. L. P.; GUBERT, C.; TAGLIANI, M. C.; BUENO, P. M. C.; BIASI, L. A. Concentrações e formas de aplicação do ácido indolbutírico na propagação por estaquia dos mirtilheiros cvs. Flórida e Clímax. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 57-64, 2012.

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

PENSO, G. A.; SACHET, M. R.; MARO, L. A. C.; PATTO, L. S.; CITADIN, I. Propagação de oliveira ‘Koroneiki’ pelo método de estaquia em diferentes épocas, concentrações de AIB e presença de folhas. **Revista Ceres**, v. 63, n. 3, p. 355-360, 2016.

PISA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 361-366, 2003.

PORFIRIO, S.; DA SILVA, M. D. R. G.; CABRITA, M. J.; AZADI, P.; PEIXE, A. Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 207–226, 2016.

QUADROS, K. M. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

RASMUSSEN, A.; MASON, M.G.; DE CUYPER, C.; BREWER, P.B.; HEROLD, S.; AGUSTI, J.; GELEN, D.; GREB, T.; GOORMACHTIG, S.; BEECKMAN, T.; BEVERIDGE, C. A. Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. **Plant Physiology**, v. 158, p. 1976-1987, 2012.

ROBERT, H. S.; FRIML, J. Auxin and other signals on the move in plants. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 325-332, 2009.

ROSA, G. G. da. **Propagação por estaquia de porta-enxerto de pessegueiro e ameixeira**. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

ROUT, G. R. Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. **Plant Growth Regulation**, v. 48, p. 111-117, 2006.

SÁ, F. P. de; 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.

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

SANTORO, P. H.; MIKAMI, A. Y.; SOUZA, S. G. H. de; ROBERTO, S. R. Influência de folhas e lesões na base de estacas herbáceas no enraizamento de goiabeira da seleção 8501-9. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 289-294, 2010.

SANTOS, S. R. F. dos. **Multiplicação de genótipos de erva-mate pelo processo de estaquia**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

SCHOPFER, P.; LISZKAY, A.; BECHTOLD, G. F.; WAGNER, A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. **Planta**, v. 214, p. 821-828, 2002.

SOARES, J. F.; ROSSI, D. C.; MARTINEZ, L. R.; FRASES, S.; FONSECA, F. L.; CAMPOS, C. B.; RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D.; DAFRE, S. Strescture and mode of action of microplusin a copper II - chelating antimicrobial peptide from the 120 cattle tick *Rhipicephalus (Bophilus) micropulus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 34735-34736, 2009.

SOUZA, R. R. de; CAVALCANTE, M. Z. B.; LIMA, M. P. D.; ALIXANDRE, T. F.; NASCIMENTO, R. T. Propagação vegetativa de hibisco com diferentes tipos de estacas e concentrações de ácido indolbutírico. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 3, p. 291-296, 2015.

STEFFENS, B.; WANG, J.; SAUTER, M. Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. **Planta**, v. 223, p. 604–612, 2006.

STENVALL, N.; PIISILÄ, M.; PULKKINEN, P. Seasonal fluctuation of root carbohydrates in hybrid aspen clones and its relationship to the sprouting efficiency of root cuttings. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 39, n. 8, p. 1531-1537, 2009.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J. de; 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, p. 1-7, 2017.

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. de. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**. v. 161, p. 69-77, 2004.

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEIXEIRA, M.; FILTER, M.; PÉRICO, E.; FREITAS, E. M. de.; SPEROTTO, R. A. Efficiency of indolebutyric acid and different substrates in yerba mate cuttings. **Iheringia, Série Botânica**, v. 72, n. 3, p. 388-393, 2017.

TRES, L. **Caracterização fenotípica e potencial de enraizamento por estaquia de um germoplasma de erva-mate de origem seminal**. 2016. 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Variabilidade genética em um ensaio de progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 583-587, 2002.

VIDOZ, M. L.; LORETI, E.; MENSUALI, A.; ALPI, A.; PERATA, P. Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. **The Plant Journal**, v. 63, p. 551-562, 2010.

VIGNOLO, G. K.; PICOLOTTO, L.; GONÇALVES, M. A.; PEREIRA, I. dos S.; ANTUNES, L. E. C. Presença de folhas no enraizamento de estacas de amoreira-preta. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 467-472, 2014.

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

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

WENDLING, I.; LAVORANTI, O. J.; RESENDE, M. D.; HORMANN, H. A. Seleção de matrizes e tipo de propágulo na enxertia de substituição de copa em *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 5, p. 811-819, 2009.

YAN, Y.; LI, J.; ZHANG, X.; YANG, W.; WAN, Y.; MA, Y.; ZHU, Y.; PENG, Y.; HUANG, L. Effect of naphthalene acetic acid on adventitious root development and associated physiological changes in stem cutting of *Hemarthria compressa*. **Plos One**, v. 9, n. 3, 2014.

YAN, S. P.; YANG, R. H.; WANG, F.; SUN, L. N.; SONG, X. S. Effect of auxins and associated metabolic changes on cuttings of hybrid aspen. **Forests**, v. 117, n.8, 2017.

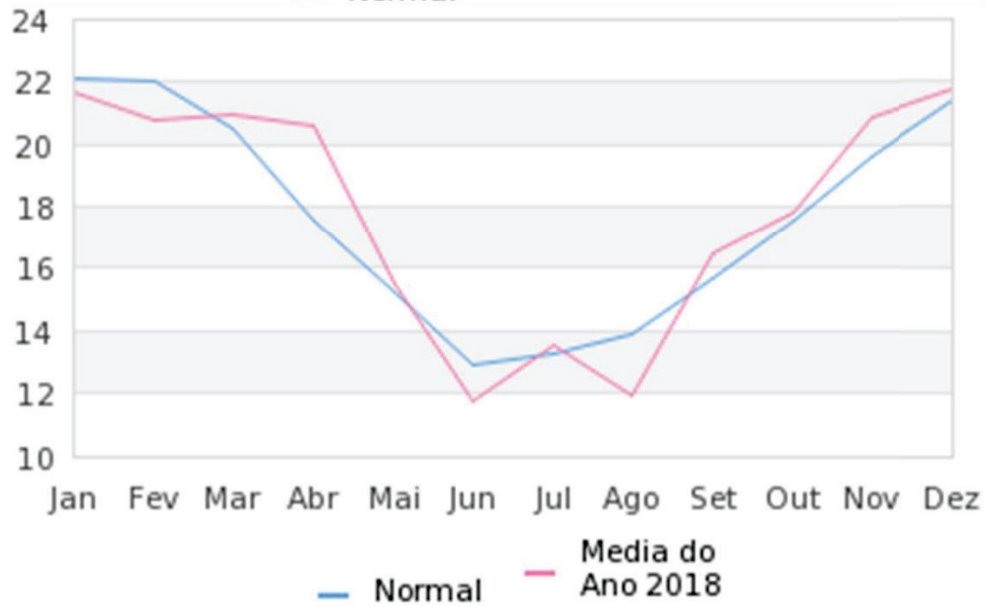
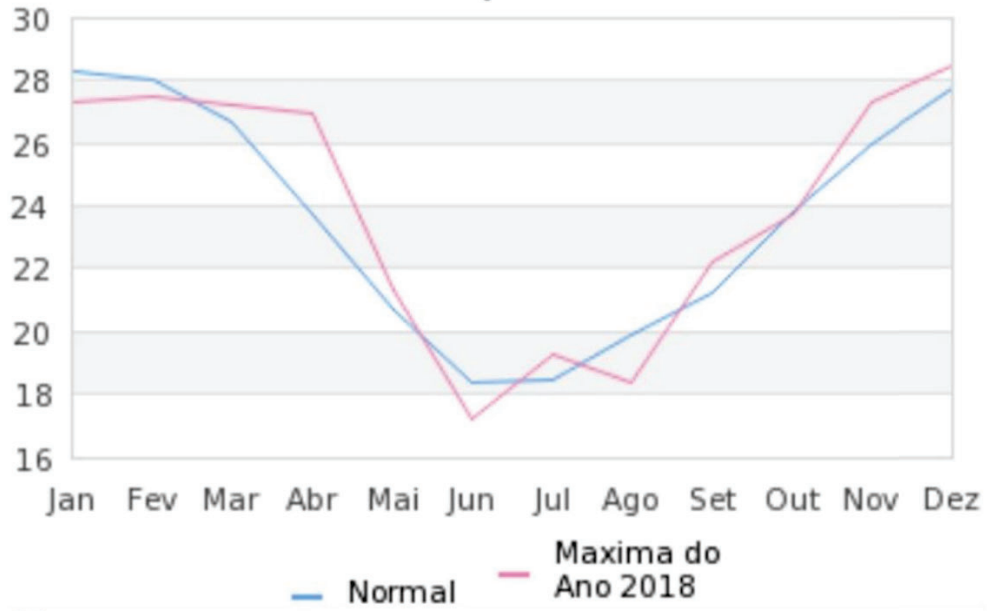
YILMAZ, H.; TASKIN, T.; OTLUDÜL, B. Polyphenol oxidase activity during rooting in cuttings of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. **Turkish Journal of Botany**, v. 27, n. 6, p. 495-498, 2003.

ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B. da; CAMPOS, Â. D.; CENTELLAS, A. Q.; MULLER, N. T.; GOTTINARI, R. A. Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento in vitro e atividade da peroxidase de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 3, n. 1, p. 23-30, 2012.

ZHANG, W.; FAN, J.; TAN, Q.; ZHAO, M.; ZHOU, T.; CAO, F. The effects of exogenous hormones on rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem cuttings. **Plos One**, v. 23, 2017.

ANEXOS

Anexo I - Temperaturas normais mensais de Passo Fundo, RS, médias e média das máximas no ano de 2018 (EMBRAPA TRIGO, 2019)



Fonte: Embrapa Trigo



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV