

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

QUALIDADE DE SEMENTES E ASPECTOS DA PROPAGAÇÃO SEXUADA DE  
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.)

Mara Cíntia Winhelmann  
Engenheira Agrônoma/UFPEL  
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutora em Fitotecnia  
Área de Concentração Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Setembro de 2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Winhelmann, Mara Cíntia  
Qualidade de sementes e aspectos da propagação  
sexuada (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) / Mara Cíntia  
Winhelmann. -- 2021.  
179 f.  
Orientador: Claudimar Sidnei Fior.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2021.

1. Espécie nativa. 2. Beneficiamento de sementes.  
3. Viabilidade de sementes. 4. Anatomia de sementes.  
5. Adubação de mudas. I. Fior, Claudimar Sidnei,  
orient. II. Título.

MARA CÍNTIA WINHELMANN  
Engenheira Agrônoma - FAEM  
Mestra em Fitotecnia - UFRGS

## **TESE**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **DOCTORA EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 22.09.2021  
Pela Banca Examinadora  
(via videoconferência)

Homologado em: 24.01.2022  
Por

CLAUDIMAR SIDNEI FIOR  
Orientador - PPG em Fitotecnia  
UFRGS

CARLA ANDRÉA DELATORRE  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

LUCIANA MAGDA DE OLIVEIRA  
UDESC

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA  
EMBRAPA Florestas

EDUARDA DEMARI AVRELLA  
Autônoma

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente.” (Maurício Francisco Ceolin)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter saúde, força e determinação para vencer mais esta etapa da minha vida.

Ao meu marido, Maico Estevam Pletsch, pelo companheirismo, carinho, amor, atenção, compreensão, parceria e auxílio durante os campos e execução dos experimentos.

Aos meus pais Glaci Lang Winhelmann e Romeu Pedro Winhelmann, pela vida, pelos ensinamentos, por todo carinho. À minhas irmãs Marisa e Marina, afilhada Anna e demais familiares por todo carinho e auxílio.

Ao meu orientador, professor Claudimar Sidnei Fior, por aceitar me orientar, pelo incentivo à pesquisa, leituras críticas, questionamentos e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À minha coorientadora, professora Elisete Maria de Freitas, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Botânica da Univates, não medindo esforços para que os experimentos fossem executados. Sempre disponível tentando auxiliar da melhor forma possível.

À amiga Rosani Klein Reinke que conheci durante o doutorado e formamos uma equipe para trabalhar com as sementes de erva-mate e trocamos muitas ideias. À professora Shirley Martins da Unioeste que contribuiu com a parte da anatomia.

Aos bolsistas do Laboratório de Botânica da Univates: Ana Paula Jaeger, Carla Roberta Orlandi, Jader Vivian Ceni, Julia Gastmann, Leo Jaime de Vargas, Leonardo Neves, Lucas Massena de Oliveira, Marcos Vinícius Vizioli Klaus, Rodrigo Gastmann, Tasio Azeredo, por toda a ajuda nos campos, contagem e cortes de sementes. Sem a ajuda de vocês não teria sido possível realizar um trabalho desta magnitude. E por toda amizade, conversas e parcerias durante este período. Aos demais bolsistas do laboratório de Botânica da Univates que auxiliaram de alguma forma, muito obrigada.

Às alunas de pós-graduação do Laboratório de Botânica da Univates Aline Viana, Carolina Ely Schneider, Fernanda Bruxel, Kétlin Rodrigues, Lilian Ferreira, pelas conversas e trocas de experiência. E também aos professores, alunos de graduação e pós-graduação do Laboratório de Acarologia da Univates pelo auxílio, empréstimo de equipamento e por toda a ajuda concedida.

Aos amigos do PPG Fitotecnia da UFRGS: Aquélis Armiliato Emer, Bibiana Antonello Marodin, Edgar Rodriguez Rivero, Eduarda Demari Avrella, Kassia Cauana Trapp, Luciana Pinto Paim, Luciano Alves da Silva, Marília Tedesco, Márcio Hilger, Monique Caumo, Priscila Paris e Samanta Siqueira de Campos, pelas conversas, trocas de ideias e amizade. Em especial à Kassia Cauana Trapp e Priscila Paris por me acolheram em seus apartamentos quando necessitei de estadia em Porto Alegre.

A todos os professores, funcionários e colegas do PPG Fitotecnia, do Departamento de Horticultura e Silvicultura e da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Ao professor André Pich Brunes pelas sugestões na banca de qualificação e também auxílio na execução de trabalhos no Laboratório de Forrageiras. E aos seus alunos Júlio Antonioli e Rodrigo Sampaio pelo auxílio.

À professora Marília Lazarotto e pesquisador Rodrigo Fraveto pelas contribuições na banca de qualificação.

A Univates por disponibilizar a estrutura laboratorial para execução dos trabalhos, especialmente ao Laboratório de Botânica. Também aos professores desta instituição que auxiliaram de alguma forma e em especial aos funcionários do Tecnovates que não mediram esforços para auxiliar na utilização de equipamentos e reagentes nos demais laboratórios.

Aos viveiristas Eloir Nunes, Fábio Baiocco, João Citron e Josimar Zatt pela cedência das sementes e por toda a experiência prática que compartilharam e que contribuiu muito para minha formação. E à Prefeitura Municipal de Ilópolis, representada pelo secretário da agricultura Jurandir Marques e Paulo Roberto Dall'Acqua por todo o apoio e disponibilidade durante a execução dos trabalhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na concessão da bolsa e a Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT) do Governo do Estado do Rio Grande do Sul pelo financiamento do projeto.

Agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes nessa caminhada e contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada a todos!

# QUALIDADE DE SEMENTES E ASPECTOS DA PROPAGAÇÃO SEXUADA DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.)<sup>1</sup>

Autora: Mara Cíntia Winhelmann  
Orientador: Claudimar Sidnei Fior

## RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) é uma espécie nativa no Brasil e tem grande importância econômica, social, ambiental e cultural. A propagação é realizada principalmente por sementes, as quais carecem de estudos referentes ao beneficiamento e qualidade fisiológica, pois apresentam, baixo poder germinativo, germinação desuniforme devido, provavelmente, à dormência morfofisiológica. Assim, este trabalho teve como objetivos: 1) avaliar o potencial do uso do soprador contínuo com fluxo de ar vertical no beneficiamento de sementes de erva-mate; 2) investigar a qualidade física e fisiológica das sementes de erva-mate de quatro matrizes e relacionar variáveis morfofisiológicas com a posição da copa em que os frutos foram coletados de uma planta-mãe; 3) investigar a qualidade física e fisiológica de sementes de erva-mate após pré-limpeza por flutuação de diferentes plantas matrizes, por meio da obtenção de dados biométricos, teor de água, peso de mil sementes, avaliação da integridade e viabilidade por meio do teste de tetrazólio; 4) avaliar o efeito de pré-tratamentos, associando ambiente ácido na estratificação, sobre a emergência de sementes; 5) testar métodos de estratificação com diferentes substratos e/ou a adição de fertilizante na superação da dormência e acompanhar o desenvolvimento embrionário e a germinação; e 6) avaliar o crescimento e a qualidade das mudas submetidas a doses de fertilizante de liberação controlada. Como principais resultados destaca-se: 1) o uso do soprador aumenta a qualidade do lote de sementes de erva-mate, por meio da remoção de impurezas e sementes não íntegras (vazias e/ou degradadas), principalmente por elevar a porcentagem de sementes viáveis; 2) sementes de diferentes plantas matrizes apresentam diferenças no tamanho, teor de água, peso de mil sementes e alta porcentagem de sementes não íntegras. Sementes de diferentes quadrantes não apresentam diferenças para o teor de água, peso de mil sementes, porcentagem de sementes vazias e embrião visível, já no quadrante sudeste apresentaram maior viabilidade; 3) mesmo após a pré-limpeza por flutuação, sementes de diferentes matrizes apresentam diferenças na biometria, teor de água, peso de mil sementes, porcentagem de sementes vazias e deterioradas e alta porcentagem de sementes não viáveis; 4) o pré-tratamento com solução aquosa neutra, seguido de soluções aquosas acidificadas aliado à estratificação favorece a emergência de sementes de erva-mate; 5) o tratamento com incorporação de adubo mineral na areia de estratificação teve a maior porcentagem de germinação (15,4%) na estratificação e nos testes de germinação (15,2 e 20,1%). Somente nesse tratamento foram observados embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento (torpedo e maduro) a partir de 150 dias de estratificação. O desenvolvimento embrionário e a germinação de sementes de erva-mate foram favorecidos pela estratificação em areia com adição de fertilizante químico; 6) doses de 6 g L<sup>-1</sup> de fertilizante Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4) podem ser utilizadas na adubação de base de mudas de erva-mate.

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (179f.) Setembro, 2021.

# QUALITY AND ASPECTS OF SEXUAL PROPAGATION OF YERBA MATE SEEDS (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.)<sup>1</sup>

Author: Mara Cíntia Winhelmann

Adviser: Claudimar Sidnei Fior

## ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) is a native species in Brazil and has great economic, social, environmental and cultural importance. The propagation is carried out mainly by seeds, which lack studies regarding conditioning and physiological quality, as they have low germination power, uneven germination, probably due to morphophysiological dormancy. Thus, this work had the following objectives: 1) to evaluate the potential of using a continuous blower with vertical air flow in the conditioning of yerba mate seeds; 2) investigate the physical and physiological quality of yerba mate seeds from four mother-plants and relate morphophysiological variables with the position of the crown in which the fruits were collected from a mother-plant; 3) investigate the physical and physiological quality of yerba mate seeds after pre-cleaning by flotation of different mother-plants, by obtaining biometric data, water content, weight of a thousand seeds, evaluation of integrity and viability through the tetrazolium test; 4) evaluate the effect of pre-treatments, associating acidic environment in the stratification, on seed emergence; 5) test stratification methods with different substrates and/or the addition of fertilizer to overcome dormancy and monitor embryonic development and germination; and 6) to evaluate the growth and quality of seedlings submitted to doses of controlled release fertilizer. The main results are: 1) the use of the blower increases the quality of the yerba mate seed lot, through the removal of impurities and non-integral seeds (empty + degraded), mainly by increasing the percentage of viable seeds; 2) seeds from different mother-plants show differences in size, water content, weight of a thousand seeds and a high percentage of non-integrity seeds. Seeds from different quadrants do not show differences for water content, weight of a thousand seeds, percentage of empty seeds and visible embryo, whereas in the southeast quadrant they showed greater viability; 3) even after floating pre-cleaning, seeds from different matrices present differences in biometry, water content, weight of a thousand seeds, percentage of empty and deteriorated seeds and a high rate of non-viable seeds; 4) pre-treatment with neutral aqueous solution, followed by acidified aqueous solutions combined with stratification favors the emergence of mate seeds; 5) the mineral fertilizer with incorporation treatment in the stratification sand had the highest germination percentage (15.4%) in the stratification and in the germination tests (15.2 and 20.1%). Only in this treatment were embryos in more advanced stages of development (torpedo and mature) observed after 150 days of stratification. The embryonic development and germination of yerba mate seeds were favored by sand stratification with addition of chemical fertilizer; 6) doses of 6 g L<sup>-1</sup> of Basacote® Mini 6M fertilizer (13-6-16 + 1.4) can be used in base fertilization of yerba mate seedlings.

---

<sup>1</sup> Doctotal thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (179p.) September, 2021.



## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1 A Família Aquifoliaceae e o gênero <i>Ilex</i> .....	5
2.1.1 A espécie <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. ....	5
2.2 Sementes .....	9
2.2.1 Coleta de sementes .....	9
2.2.2 Extração e beneficiamento de sementes .....	11
2.2.2.1 Soprador com fluxo de ar vertical .....	13
2.2.3 Análise de sementes .....	13
2.2.3.1 Testes e determinações .....	14
2.2.3.1.1 Análise de pureza .....	14
2.2.3.1.2 Determinação do teor de água .....	14
2.2.3.1.3 Peso de mil sementes e tamanho .....	15
2.2.3.1.4 Germinação .....	16
2.2.3.1.5 Teste de tetrazólio .....	17
2.2.4 Dormência em sementes .....	19
2.2.4.1 Superação da dormência .....	21
2.2.4.2 Anatomia de sementes .....	22
2.3 Adubação de mudas .....	23
2.3.1 Fertilizante de liberação controlada .....	24
2.3.2 Atributos morfológicos de qualidade de mudas .....	25
2.4 Referências .....	26
3 CAPÍTULO 1 – Uso de soprador contínuo com fluxo de ar em sementes de erva- mate .....	33

	Página
4	CAPÍTULO 2 - Qualidade de sementes de erva-mate..... 59
5	CAPÍTULO 3 - Avaliação da qualidade de sementes de erva-mate oriundas de diferentes plantas matrizes ..... 74
6	CAPÍTULO 4 - Pré-tratamentos, estratificação e emergência de sementes de erva-mate..... 85
7	CAPÍTULO 5 - O desenvolvimento embrionário e a viabilidade das sementes afetam a germinação de erva-mate ..... 94
8	CAPÍTULO 6 - Fertilizante de liberação controlada no crescimento de mudas de erva-mate ..... 129
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 148
10	APÊNDICES ..... 150

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. Teor de água (TA) (%), peso de mil sementes (PMS) (g), medida longitudinal (ML) (mm) e medida transversal (MT) (mm) e pureza (%) antes do beneficiamento de sementes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.), oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.....	41
2. Avaliação da integridade de sementes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.): não íntegras (%) e viabilidade pelo teste de tetrazólio - viáveis (%) e não viáveis (%) oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil. ..	42
3. Análise de variância de sementes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.) de diferentes plantas matrizes e aberturas de soprador de ar vertical. ....	43
I. Velocidade (km h <sup>-1</sup> ), porcentagem de sementes e impurezas retidas na base e aleta para as diferentes aberturas e matrizes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St-Hil), Rio Grande do Sul, Brasil.....	58
<b>CAPÍTULO 2</b>	
1. Teor de água (TA) (%), peso de mil sementes (PMS) (g), medida longitudinal (ML) (mm) e medida transversal (MT) (mm) de sementes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.), oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.....	66
2. Avaliação da integridade de sementes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.): não íntegras – vazias (%), predadas (%) e deterioradas (%); e íntegras – com embrião visível (%) e sem embrião visível (%); e viabilidade (%) por meio do teste de tetrazólio oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.....	66

3. Teor de água (TA) (%), peso de mil sementes (PMS) (g), medida longitudinal (ML) (mm) e medida transversal (MT) (mm) de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) oriundas de ramos localizados em diferentes quadrantes da planta matriz, Ilópolis, Rio Grande do Sul, Brasil..... 67
4. Porcentagem de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) oriundas de ramos localizados em diferentes quadrantes de planta matriz, Ilópolis, Rio Grande do Sul, Brasil, classificadas como: não íntegras (vazias, predadas, deterioradas) e íntegras (com embrião visível e sem embrião visível); e viáveis pelo teste de tetrazólio. .... 67

### CAPÍTULO 3

1. Locais de coleta de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), em municípios do Alto Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil. .... 77
2. Plantas matrizes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), com o respectivo código, município de coleta, ambiente em que a mesma está inserida, coordenadas e data de coleta..... 77
3. Medida longitudinal (mm), medida transversal (mm), teor de água (%) e peso de mil sementes (g) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) (média  $\pm$  erro padrão), oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil..... 80
4. Avaliação da integridade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): não íntegras – vazias (%) e deterioradas (%) e íntegras - com embrião visível (%) e sem embrião visível (%); e viabilidade pelo teste de tetrazólio - viáveis (%) e não viáveis (%) (média  $\pm$  erro padrão) oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil. .... 82

### CAPÍTULO 4

1. Descrição dos tratamentos de emergência de sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil..... 88
2. Porcentagem média de emergência de sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. aos 180 dias, para os diferentes tratamentos e tempos de estratificação. .... 89
3. Porcentagem de sementes viáveis e não viáveis de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. após 180 dias de emergência, considerando os tempos 90, 135 e 180 dias de estratificação. .... 90

**CAPÍTULO 5**

1. Descrição dos tratamentos de estratificação de sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	121
2. Temperatura máxima (T máx), mínima (T mín) e média (T média) em °C e umidade relativa (UR) média (%) registrada na estação meteorológica da Univates em Lajeado – RS, entre março e setembro de 2018.....	121
3. Estágios embrionários das sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. submetidas a diferentes tratamentos de estratificação e da testemunha ao longo de 180 dias. ....	122
4. Porcentagem de germinação durante a estratificação, porcentagem de germinação a 25 °C, porcentagem de sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> não íntegras, viáveis e não viáveis aos 180 dias de germinação. ....	123
5. Porcentagem média de germinação de sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. durante a estratificação, nos diferentes tratamentos aos 120, 150 e 180 dias de estratificação. ....	123
6. Porcentagem de germinação de sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. no Teste 1 (150 dias de estratificação + 180 dias de germinação) e Teste 2 (180 dias de estratificação + 180 dias de germinação) nos diferentes tratamentos de estratificação. ....	124
7. Porcentagem de sementes não íntegras, viáveis e não viáveis de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.Hil. para o Teste 1 (150 dias de estratificação + 180 dias de germinação) e Teste 2 (180 dias de estratificação + 180 dias de germinação) sob diferentes métodos de estratificação. ....	124

**CAPÍTULO 6**

1. Características químicas do fertilizante de liberação controlada e características físicas e químicas do substrato comercial utilizado na produção de mudas de erva mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.). ....	133
2. Análise de variância do desenvolvimento de mudas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) sob diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4). ....	136

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
1. Inflorescência (A) e flores pistiladas (B) de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.). Ilópolis, RS, 2019. ....	7
2. Inflorescência (A) e flor estaminada (B) de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.). Ilópolis, RS, 2019. ....	7
3. Polinização de flores de erva-mate: (A) abelha <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera), (B) vespa da Família Vespidae (ordem Hymenoptera), (C) mosca-das-flores <i>Taxomerus</i> sp. (Diptera) e (D) formiga <i>Camponotus</i> sp. (Hymenoptera) ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.). Ilópolis, RS, 2019. ....	7
4. Fases do desenvolvimento dos frutos de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) até a maturação. Ilópolis, RS, 2019. ....	8
5. Pirênio de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) (A) e corte longitudinal indicando as estruturas internas (B). Porto Alegre, RS, 2019. ....	8
6. Planta matriz de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) localizada em uma área cultivada com soja em Arvorezinha, RS, 2018 (A); planta matriz em erval comercial em Ilópolis, RS, 2018 (B) e planta matriz em mata nativa, Putinga, RS, 2018 (C). ....	10
7. Coleta de frutos de erva-mate sobre lonas dispostas na projeção da copa da planta matriz de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.). Ilópolis, RS, 2018. ....	10
8. Frutos de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) coletados sobre lonas dispostas na projeção da copa da planta matriz contendo impurezas como folhas e pedaços de ramos (A) e frutos maduros coletados diretamente da planta matriz (B). Porto Alegre, RS, 2018. ....	11

9. Maceração dos frutos de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) em peneira (A), processamento em moedor de carne manual (B), massa constituída de polpa, pericarpo, pedúnculos e sementes sobre peneira para lavagem em água corrente (C) e soprador de sementes De Leo® (modelo South Dakota) (D). Porto Alegre, RS, 2020. ....	12
10. Embriões de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) em diferentes estágios de desenvolvimento: cotiledonar (A), cordiforme (B, C e D), cordiforme tardio (E), torpedo (F) e maduro (G). Porto Alegre, RS, 2020. ....	17
11. Estratificação de sementes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) em areia. Porto Alegre, RS, 2018. ....	21

### **CAPÍTULO 1**

1. Porcentagem total de sementes não íntegras de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.) retidas na base (A) e na aleta (B) para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil. ....	44
2. Porcentagem total de sementes viáveis de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.) retidas na base e na aleta para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil. ....	47
3. Porcentagem de sementes viáveis e não íntegras de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.) considerando à proporção retida na base para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil. ....	50
4. Porcentagem total de sementes não viáveis de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.) retidas na aleta para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil. ....	51
5. Peso de mil sementes (PMS) (g) de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.) retidas na base e na aleta para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil. ....	53

### **CAPÍTULO 3**

1. A) Frutos maduros; B) pirênios e C) identificação da medida longitudinal (ML) e transversal (MT) na biometria de sementes de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.). ....	78
--	----

2. Sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) classificadas como não íntegras: A) vazia somente com o endocarpo; B) vazia contendo menos de 50% dos tecidos; C) deteriorada com tecidos necrosados; D) deteriorada com tecido gelatinoso; e íntegras: E) endosperma de consistência firme com embrião visível; F) endosperma de consistência firme sem embrião visível e G) viável com endosperma firme e colorido, com embrião visível, sem danos e com consistência firme. Em que: Em = embrião; End = endocarpo; En = endosperma.

79

## CAPÍTULO 5

1. Eletromicroscopias (A-C, D, G-H) e fotomicrografias (E-F, I) de secções longitudinais de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação. A. Visão geral da semente (C - 150 dias). B-C. Endocarpo, visão geral e detalhe, respectivamente (C - 0 dia). D. Visão geral do endocarpo e tegumento (T4 - 120 dias). E. Visão geral do endocarpo (C - 0 dia). F. Detalhe do endocarpo (T3 - 180 dias). G-H. Detalhe do endocarpo com hifas de fungos. G. T3 - 60 dias. H. T4 - 180 dias. I. Detalhe do tegumento (T4 - 30 dias). (Cd = cavidade digestora, Cu = cutícula, Em = embrião, En = endosperma, End = endocarpo, H = hifas de fungo, T = tegumento).....
2. Fotomicrografias de secções longitudinais de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação, ilustrando embriões nos estágios cotiledonares. A. visão geral do embrião em estágio cotiledonar (T2- 150 dias). B. detalhe das células do endosperma (T2- 150 dias). C. visão geral do embrião em estágio cordiforme (T3- 120 dias). D-E. visão geral e detalhe de embrião, respectivamente, com destaque para o suspensor (T4 - 150 dias). F. visão geral do embrião com suspensor (T1- 90 dias). G. detalhe das células meristemáticas do procâmbio e meristema fundamental (T1- 90 dias). H. detalhe da cavidade digestora e células da protoderme (T3- 120 dias). I. detalhe das células do endosperma (T3- 120 dias). (Cd = cavidade digestora, Co = cotilédone, Em = embrião, En = endosperma, Mf = meristema fundamental, Pc = procâmbio, Pco = primórdio cotiledonar, Pd = protoderme, Pm = promeristema, Pt = proteína, S = suspensor, T = tegumento, \* = células em degradação).....

125

126



3. Fotomicrografias de secções longitudinais de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação, ilustrando embriões no estágio cordiforme tardio nos tratamentos de estratificação T3 e T4. A-C. Visão geral do embrião. A. T3 aos 180 dias. B. T4 aos 150 dias. C. T3 aos 30 dias. D. detalhe do suspensor (T4 aos 150 dias). E. detalhe da região basal do embrião (T3 aos 180 dias). F. detalhe da coifa e pró-meristema (T3 aos 180 dias). G. detalhe das células do procâmbio e do meristema fundamental (T3-180 dias). H. Detalhe da cavidade digestora e das células da protoderme (T3 aos 180 dias). I. detalhe das células do endosperma (T4 aos 150 dias). (Cd=cavidade digestora, Cf=coifa, Co=cotilédone, Em=embrião, Em = endosperma, Mf = meristema fundamental, Pc = procâmbio, Pm = promeristema, Pd = protoderme, Pt = proteína, S = suspensor, \* = células em degradação). ..... 127
4. Fotomicrografias de secções longitudinais das sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação, ilustrando embriões no estágio de torpedo aos 150 dias e maduros aos 180 dias de estratificação para o tratamento T4. A. visão geral do embrião em estágio de torpedo. B. detalhe da região do eixo radicular do embrião. C. detalhe dos cotilédones. D. visão geral do embrião em estágio maduro. E. detalhe da região do eixo radicular do embrião. F. detalhe da região procambial com elementos traqueais em diferenciação. G. detalhe dos cotilédones. H. detalhe das células da protoderme e do endosperma. I. detalhe das células do endosperma. Cd=cavidade digestora; Cf=coifa; Co=cotilédone; Em=embrião; En=endosperma; Et=elementos traqueais, Mf=meristema fundamental; Pc=procâmbio; Pd=protoderme; Pt=proteína; T=tegumento. .... 128
- CAPÍTULO 6**
1. Temperatura e umidade relativa (%) mínima, média e máxima durante o período do desenvolvimento das mudas de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). .. 134
2. Altura (H) (cm) (A), diâmetro do coleto (DC) (mm) (B) e relação altura e diâmetro do coleto (RHDC) de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) sob diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4). ..... 137

3.	Número de folhas (NF) (A) e área foliar (AF) (cm <sup>2</sup> ) (B) de mudas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) sob diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4). .....	138
4.	Massa seca da parte aérea (MSPA), radicular (MSR) e total (MST) (g) (A) e relação entre massa seca da parte aérea e massa seca radicular (RMSPAR) (B) de mudas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) sob diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4). .....	138
5.	Relação altura e massa seca da parte aérea (RHMSPA) (A) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) sob diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4). .....	139
6.	Custo em dólar* por 1000 mudas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) produzidas com diferentes doses do fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4). *US\$1,00=R\$5,1564 cotação de julho/2021. ....	140
7.	Aspecto morfológico de mudas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.) produzidas com diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4). .....	144

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da erva-mate tem importância sociocultural, econômica e ecológica. Sociocultural pois é parte da identidade cultural da região sul do Brasil, uma vez que de suas folhas é produzido o chimarrão, uma bebida muito apreciada pela população dessa região (Backes & Irgang, 2002; Carvalho, 2003; Silva *et al.*, 2018); econômica por ser um dos principais produtos florestais não-madeireiros cultivados no Brasil (Chechi & Schultz, 2016); e ecológica por integrar os sistemas florestais mais equilibrados do País (Wendling & Santin, 2015). Além disso, suas flores são polinizadas por diversos insetos das ordens Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera (Ferreira *et al.*, 1983; Pires *et al.*, 2014) e seus frutos apresentam grande importância na alimentação da avifauna (Backes & Irgang, 2002; Carvalho, 2003; Colussi & Prestes, 2011).

Além do tradicional consumo da erva-mate na forma de chimarrão, tererê e chás (Backes & Irgang, 2002; Coelho *et al.*, 2002; Carvalho, 2003), é crescente outras formas de uso, como bebidas (cervejas, refrigerantes e energéticos), fabricação de cosméticos e utilização na forma de farinha e na ração animal (Croge *et al.*, 2021). É também utilizada como planta medicinal (Cardozo-Junior & Morand, 2016; Riachi & De Maria, 2017), tendo propriedades estimulantes, ansiolíticas e neuroprotetoras (Santos *et al.*, 2015). Estudos também indicam potencialidade de uso no controle do caramujo-maçã (*Pomaceae caniculata*), praga na cultura de arroz irrigado (Brito *et al.*, 2018), na redução da incidência da podridão parda [*Monilinia fructicola* (Winter) Honey] e na conservação pós-colheita de

pêssegos (cv. Della Nona) (Sapelli *et al.*, 2020), além de outros potenciais, principalmente farmacêuticos, que ainda precisam ser investigados (Croge *et al.*, 2021).

A região sul do Brasil é a principal produtora de erva-mate, cujos ervais são cultivados por agricultores familiares, geralmente em áreas inclinadas, onde a mecanização não é possível. Desde a década de 70, *commodities* como soja, milho e trigo começaram a ocupar o lugar da erva-mate (Chechi & Schultz, 2016), reduzindo sua área de cultivo. Por isso são necessárias pesquisas e investimentos em tecnologias em toda a cadeia produtiva, a fim de elevar seus rendimentos e incentivar o cultivo, evitando a sua substituição por outras culturas (Sousa *et al.*, 2015).

A área cultivada com a espécie foi de 71,9 mil ha em 2019 (IBGE, 2019). O Rio Grande do Sul, com uma produção de 233,4 mil ton, é o maior produtor, seguido pelo Paraná (192,8 mil ton) e Santa Catarina (89,9 mil ton). Já o estado do Mato Grosso do Sul tem a menor produção (1,5 mil ton). No Rio Grande do Sul o cultivo está distribuído em cinco polos de produção: Alto Taquari, Planalto e Missões, Vale do Taquari, Alto Uruguai e Nordeste Gaúcho. Neste Estado, aproximadamente 14 mil famílias, distribuídas em cerca de 258 municípios (Fundomate, 2017) cultivaram 28.022 hectares em 2019 (IBGE, 2019). Dentre estas regiões, a do Alto Taquari, composta por 48 municípios, detém a maior produção estadual (Fundomate, 2016). É nesta região que se localizam seis dos sete municípios com a maior área plantada registrada e a maior produtividade em 2019 (Sindimate'RS, 2019). Também neste polo estão localizadas 33 micro e pequenas empresas que processam a matéria-prima, gerando aproximadamente 400 empregos diretos (Greff *et al.*, 2020).

Para o sucesso dos ervais, no que se refere à produtividade, são necessárias mudas de qualidade genética e fisiológica, com altos índices de sobrevivência no plantio, bem como resistência a estresses ambientais. A produção das mudas é realizada por sementes

(Wendling & Santin, 2015). Estas são coletadas em ervais nativos ou implantados, sem qualquer critério de seleção, o que implica em ervais com alta taxa de mortalidade, desenvolvimento heterogêneo e baixa qualidade da massa foliar produzida (Sturion & Resende, 2010). Além disso, as sementes de erva-mate também apresentam baixo poder germinativo, germinação desuniforme e dormência morfofisiológica (Medeiros, 1998; Dolce *et al.*, 2010; Wendling & Santin, 2015; Galíndez *et al.*, 2018; Souza, 2018).

Assim, a investigação da qualidade das sementes é de fundamental importância, porque em muitos casos a baixa taxa germinativa está associada à baixa viabilidade inicial de um lote. Souza *et al.* (2020a) observaram que diferentes lotes de sementes apresentam alta variabilidade de viabilidade e concluíram que a baixa qualidade do lote está associada principalmente à alta taxa de sementes vazias e deterioradas. O beneficiamento das sementes pode ser uma alternativa para aumentar essa qualidade e contribuir com o aumento das taxas de germinação e, conseqüente estabelecimento das mudas, uma vez que neste processo podem ser excluídas sementes vazias e deterioradas.

Apesar da exploração da erva-mate existir há muitos anos, a germinação desuniforme é considerada um dos principais problemas na produção de mudas. Essa desuniformidade é consequência da existência de sementes com embrião imaturo e que necessita de um período de estratificação para completar seu desenvolvimento e germinação (Fowler & Sturion, 2000). Contudo, as técnicas de superação de dormência não evoluíram ao longo do tempo, sendo a estratificação em areia por seis meses a forma mais difundida entre os viveristas. Nesse sentido, a possibilidade de associar a estratificação com a utilização de pré-tratamentos das sementes, bem como incrementar o ambiente de estratificação com substâncias que acelerem o processo podem reduzir o período para a obtenção das mudas e viabilizar uma germinação homogênea e uniforme na produção comercial de mudas.

No que tange à produção de mudas, o entendimento dos principais fatores de produção é de suma importância para o cultivo de qualquer espécie. Atualmente, o setor produtivo da erva-mate demanda informações básicas relacionadas à produção de mudas, refletindo na oferta de mudas de qualidade duvidosa, limitando a produção e a disponibilidade de matéria-prima para os demais setores da cadeia produtiva da erva-mate (Wendling & Santin, 2015). Aliada à produção de mudas em menor tempo, de forma homogênea, a pesquisa com fertilizantes de liberação controlada de nutrientes pode favorecer a aceleração do crescimento e a melhoria na qualidade das mudas de erva-mate, além de facilitar o manejo.

Com base no exposto, o objetivo geral deste trabalho foi viabilizar o beneficiamento de sementes de erva-mate e investigar aspectos da propagação sexuada.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Família Aquifoliaceae e o gênero *Ilex*

A família Aquifoliaceae abrange apenas o gênero *Ilex*, com mais de 500 espécies. Compreende árvores, arbustos e subarbustos, que apresentam folhas alternas, simples e geralmente estipuladas. A inflorescência é axilar, em fascículos, dicásio, tirso ou racemo, com flores, em sua maioria, dióicas. O fruto é uma drupa com quatro a seis sementes, envolvidas pelo endocarpo lignificado, formando pirênios. As espécies têm registros de ocorrência em regiões tropicais e temperadas (Flora do Brasil, 2020).

Algumas espécies deste gênero são utilizadas na jardinagem, na medicina popular (Tezuka *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015) e no preparo de bebidas (Croge *et al.*, 2021). No Brasil, o gênero é encontrado nas cinco regiões geográficas, com registros confirmados em 20 estados (Flora do Brasil, 2020), com 58 espécies identificadas (Souza & Lorenzi, 2012).

#### 2.1.1 A espécie *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

A espécie mais conhecida da família Aquifoliaceae é *I. paraguariensis* A.St.-Hil., com nome popular de erva-mate, mate, caá entre outros. É utilizada como bebida estimulante em infusão quente (chimarrão) ou fria (tererê) (Backes & Irgang, 2002). A erva-mate é nativa na Floresta Ombrófila Mista em associações mais evoluídas com a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kunz (Carvalho, 2003), ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil, e neste país é registrada do Mato Grosso ao Rio Grande do Sul (Sobral *et al.*, 2013). No Brasil, apresenta distribuição geográfica associada principalmente ao Domínio Atlântico,

com caráter subtropical e temperado úmido. As áreas de maior altitude da região Sul e Sudeste do Brasil podem ser consideradas como estratégicas para a conservação e manejo sustentável da espécie (Silva *et al.*, 2018).

Visualmente, há grande variabilidade fenotípica entre as populações de *I. paraguariensis*, principalmente diferenças com relação à cor do pecíolo (roxo, branco ou amarelo), tamanho e presença de pilosidade nas folhas, e suscetibilidade à queda foliar. Por essa razão, técnicos e produtores envolvidos com a cultura, referem-se à essas variabilidades com o termo “variedades” de erva-mate. Através da análise de indivíduos nativos e também cultivados, foi verificado que existe uma grande segregação para as características de cor do pecíolo e tamanho foliar, sendo que essa variação faz parte da variabilidade genética intrapopulacional, natural da espécie (Sturion & Resende, 2010).

A erva-mate é uma árvore perenifólia com altura variável, podendo atingir 30 m (Carvalho, 2003). É uma espécie dioica, embora apresente estames e carpelo na mesma flor, no início da sua formação, sendo que apenas um deles evolui em cada espécime (Figura 1 e 2). A polinização é entomófila realizada por insetos das ordens Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera, sendo principalmente realizada por abelhas (Figura 3) (Ferreira *et al.*, 1983; Heuser *et al.*, 1993; Pires *et al.*, 2014). O florescimento ocorre de setembro a dezembro e frutos maduros são visualizados de dezembro a abril, os quais vão da coloração verde, para vermelha e por fim violeta-escuro, sendo observada elevada heterogeneidade na maturação (Figura 4) (Zanon, 1988; Pires *et al.*, 2014). O fruto é do tipo drupa, normalmente com quatro pirênios, com mesocarpo carnoso e endocarpo lenhoso. O pirênio é o órgão de dispersão da espécie, sendo formado pelo endocarpo lenhoso e semente, e esta é composta pelo tegumento, endosperma e embrião (Figura 5) (Heuser *et al.*, 1993).





FIGURA 1. Inflorescência (A) e flores pistiladas (B) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). Ilópolis, RS, 2019.



FIGURA 2. Inflorescência (A) e flor estaminada (B) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). Ilópolis, RS, 2019.

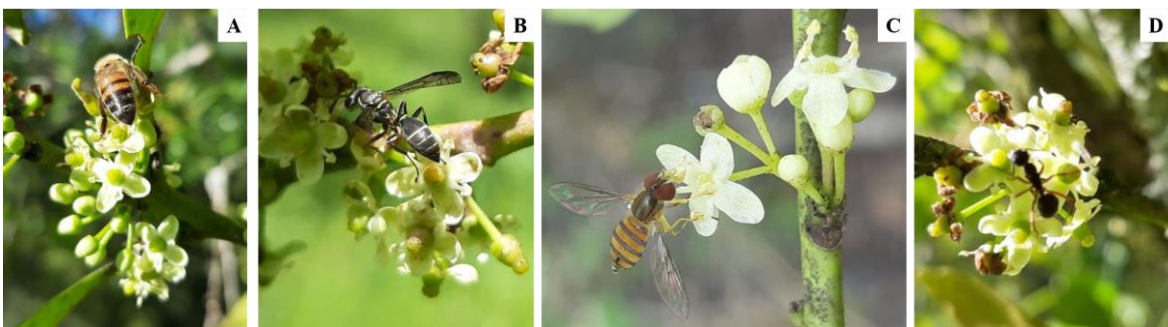


FIGURA 3. Polinização de flores de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera) (A), vespa da Família Vespidae (ordem Hymenoptera) (B), mosca-das-flores *Taxomerus* sp. (Diptera) (C) e formiga *Camponotus* sp. (Hymenoptera) (D). Ilópolis, RS, 2019.

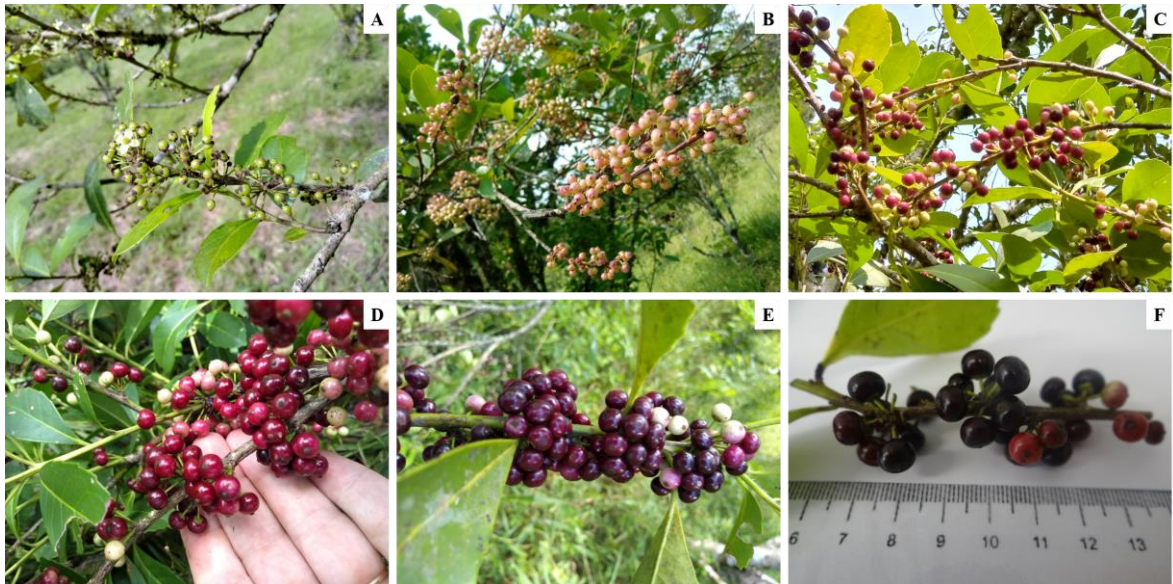


FIGURA 4. Fases do desenvolvimento dos frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) até a maturação. Ilópolis, RS, 2019.

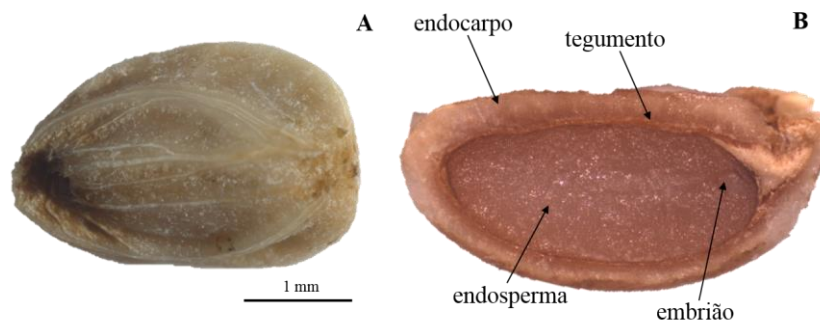


FIGURA 5. Pirênio de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) (A) e corte longitudinal indicando as estruturas internas (B). Porto Alegre, RS, 2019.

Sementes recém colhidas apresentam diversos estágios de desenvolvimento, onde o embrião pode ser visualizado desde uma massa de células meristemáticas não diferenciadas, em formato globoso, até em forma de coração, que definem o embrião da erva-mate como sendo do tipo rudimentar (Mello, 1980; Heuser *et al.*, 1993; Catapan, 1998; Souza, 2018; Mireski *et al.*, 2019).

## 2.2 Sementes

A maioria das espécies nativas é propagada por sementes (Barbedo & Santos-Junior, 2018), sendo um dos principais métodos de reprodução das plantas na natureza (Baskin & Baskin, 2014). Também é a principal forma de propagação da erva-mate (Cunha & Ferreira, 1987; Carvalho, 2003; Wendling & Santin, 2015).

A propagação sexuada apresenta como vantagens: facilidade de produção para maioria das espécies, maior taxa de propagação, manutenção da maior variabilidade genética entre as plantas, sistema radicular com melhor qualidade, facilidade de transporte e armazenamento dos propágulos (sementes) (Wendling & Santin, 2015; Araújo *et al.*, 2018). Contudo, também há desvantagens, como: dificuldade de obtenção de sementes para determinadas espécies e que sejam de qualidade; necessidade de conhecer a época de maturação para coleta de sementes; dificuldade de armazenamento e germinação de algumas espécies, sendo que este é um processo delicado e tecnicamente exigente, variando muito de espécie para espécie; segregação genética das mudas geradas; sementes inviáveis ou com mal formação; carência de informações sobre qualidade dos lotes a taxas de germinação, entre outros (Wendling & Santin, 2015; Barbedo & Santos-Junior, 2018).

### 2.2.1 Coleta de sementes

A colheita de frutos e sementes deve ser feita de plantas matrizes previamente selecionadas, com base em objetivos anteriormente estabelecidos para os quais serão produzidas as mudas, dentre os quais estão a recuperação de áreas degradadas, arborização urbana, produtos madeireiros ou não madeireiros, estudos genéticos, entre outros (Barbedo & Santos-Junior, 2018).

A coleta dos frutos de erva-mate ocorre de forma manual, geralmente os viveiristas estendem uma lona no solo sob a projeção da copa da planta matriz (Figura 6), e aguardam

a queda natural dos frutos (Figura 7), ou fazem a derraça, como no café, ou cortam os ramos e em seguida retiram os frutos (Zanon, 1988; Carvalho, 2003; Wendling & Santin, 2015).

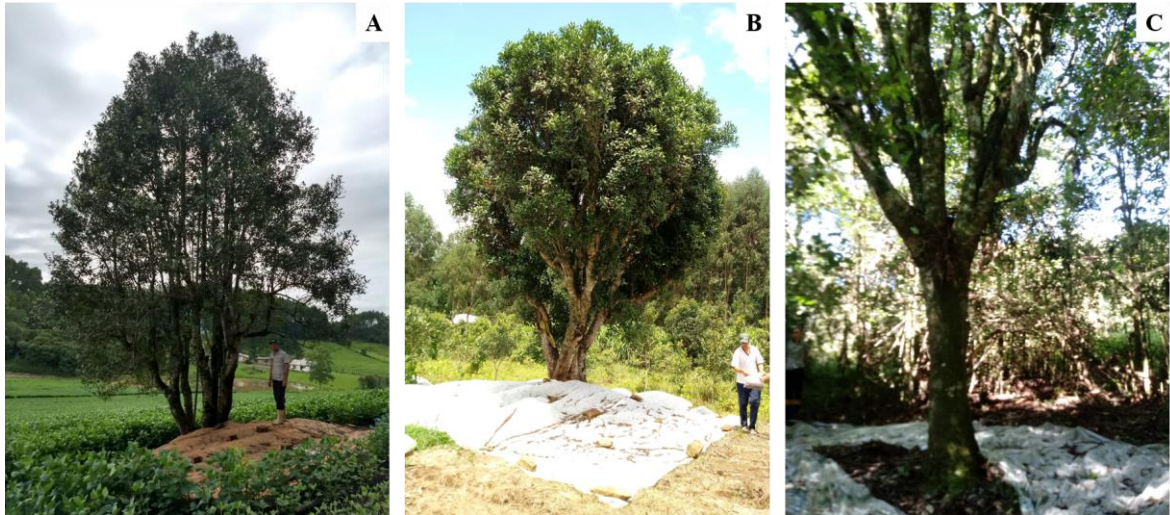


FIGURA 6. Planta matriz de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) localizada em uma área cultivada com soja em Arvorezinha, RS, 2018 (A); planta matriz em erval comercial em Ilópolis, RS, 2018 (B) e planta matriz em mata nativa, Putinga, RS, 2018 (C).



FIGURA 7. Coleta de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) sobre lonas dispostas na projeção da copa da planta matriz. Ilópolis, RS, 2018.

### 2.2.2 Extração e beneficiamento de sementes

Após a coleta, são selecionados os frutos maduros que apresentam coloração violeta-escuro e descartados os de coloração verde, também neste momento são retiradas impurezas maiores, como ramos e folhas (Figura 8). A extração das sementes ocorre por meio da maceração dos frutos em peneiras (Figura 9A) (Zanon, 1988; Carvalho, 2003; Wendling & Santin, 2015) ou superfícies ásperas (Medrado *et al.*, 2000; Sturion & Resende, 2010). Alguns viveiristas para agilizar esta etapa processam os frutos utilizando um moedor de carne manual (Figura 9B) ou elétrico.

Na sequência, a massa constituída de polpa, pericarpo, pedúnculos e sementes (Figura 9C) é colocada em um recipiente com água e as sementes sobrenadantes são eliminadas (Zanon, 1988; Carvalho, 2003; Wendling & Santin, 2015). Após este processo ainda ficam resquícios de polpa aderidos às sementes, por isso é indicado deixar as sementes secar sobre papel absorvente (Barbedo & Santos-Junior, 2018).

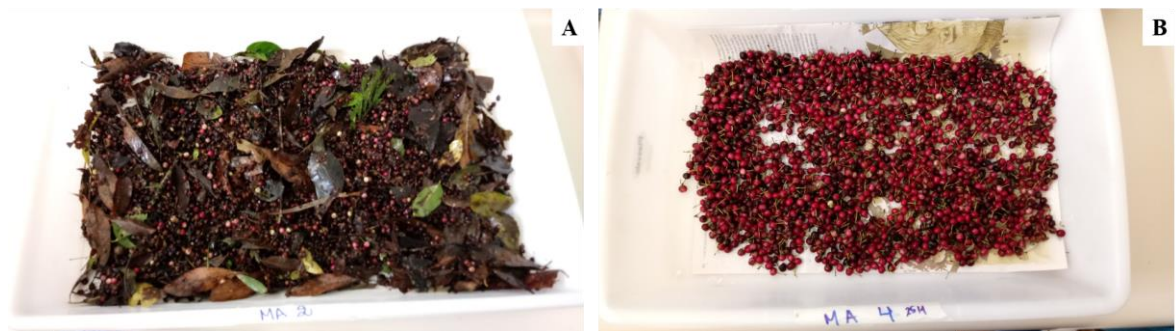


FIGURA 8. Frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) coletados sobre lonas dispostas na projeção da copa da planta matriz contendo impurezas como folhas e pedaços de ramos (A) e frutos maduros coletados diretamente da planta matriz (B). Porto Alegre, RS, 2018.



FIGURA 9. Maceração dos frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) em peneira (A), processamento em moedor de carne manual (B), massa constituída de polpa, pericarpo, pedúnculos e sementes sobre peneira para lavagem em água corrente (C) e soprador de sementes De Leo® (modelo South Dakota) (D). Porto Alegre, RS, 2020.

O beneficiamento de sementes, além da remoção dos resquícios dos frutos após o processo de maceração ou lavagem, compreende operações que visam retirar impurezas, como material inerte, sementes danificadas, vazias, deterioradas e de outras espécies, deixando o lote mais puro para a semeadura, armazenamento ou comercialização (Peske *et al.*, 2019). Para a maioria das espécies florestais, o processamento é mínimo e geralmente com o intuito de eliminar somente as impurezas (Grzybowski *et al.*, 2019). Na maioria dos casos, os lotes apresentam reduzida quantidade de sementes e o beneficiamento é realizado em peneiras manuais e/ou soprador (Ferreira & Borghetti, 2004).

### 2.2.2.1 Soprador com fluxo de ar vertical

Pelo fato de a maioria das impurezas apresentarem massa inferior às sementes íntegras, torna-se possível remover essa fração com uso de um fluxo de ar vertical (Garay *et al.*, 2009). Esta operação pode ser realizada com soprador (Figura 9D), que é um equipamento que separa as sementes com base no deslocamento das impurezas em função da velocidade de ar impressa sobre a amostra, separando as unidades que apresentam diferentes massas, e/ou área superficial específica. O soprador apresenta diferentes configurações de abertura de passagem do ar, imprimindo menor ou maior força de deslocamento, sem afetar a integridade das sementes (Faria *et al.*, 2019).

Este equipamento divide a amostra original em uma fração leve (depositada nas aletas) e uma fração pesada (que permanece na base do aparelho). Uma válvula metálica situada na parte superior, numerada de 0 a 25, ajusta a vazão final do ar, alterando a velocidade do fluxo, a qual aumenta com o número do ajuste (Faria *et al.*, 2019).

Para a cultura da erva-mate, Catapan (1998) descreve que classificou o lote em mesa densimétrica para obtenção de sementes com maior densidade e uniformidade, e Souza (2018) utilizou soprador para retirada de impurezas, no entanto, em ambos os trabalhos não relatam o que foi possível separar.

### 2.2.3 Análise de sementes

A qualidade das sementes é representada pelo conjunto de características genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias, sendo que esses atributos têm diversas finalidades, dentre elas, identificar problemas de qualidade das sementes e suas causas (Peske *et al.*, 2019).

A demanda de sementes nativas, e em particular as florestais, está aumentando devido à procura para restauração de áreas degradadas, seja de sementes ou mudas. Nesse sentido é de fundamental importância o controle da qualidade na produção e conservação de sementes nativas e a adequação dos métodos de análises (Barbedo & Santos-Junior, 2018).

### 2.2.3.1 Testes e determinações

São um conjunto de procedimentos e regras para normatizar a análise de sementes. Contudo, para muitas espécies nativas, ainda não há métodos padronizados descritos nas Regras de Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009), nas Instruções para análise de sementes de espécies florestais (Brasil, 2013) e nas Instruções Normativas (IN) específicas, como a IN n° 56 (Brasil, 2011) e a IN n° 17 (Brasil, 2017). Assim, resultados obtidos por meio da pesquisa podem servir de orientação para realizar este controle de qualidade (Barbedo & Santos-Junior, 2018).

#### 2.2.3.1.1 Análise de pureza

A análise de pureza tem o objetivo de determinar a composição percentual do peso da amostra, que é separada em três componentes: sementes puras, outras sementes e material inerte. São consideradas puras todas as sementes e/ou unidades de dispersão da espécie em análise. Em outras sementes são incluídas as unidades de dispersão de qualquer outra espécie que não aquela que se está analisando. Em material inerte estão incluídos fragmentos de unidades de dispersão, outros materiais e estruturas que não estão descritas nas duas categorias anteriormente citadas (Brasil, 2009).

A maioria dos trabalhos com sementes de erva-mate não avalia o teor de pureza dos lotes. Porém, Menegueti *et al.* (2004) realizaram esta análise e observaram 89,65% de sementes inteiras, 6,56% de sementes com partes de frutos, 0,47% de sementes infestadas, 2,43% de fragmentos, 0,19% de frutos, 0,01% de sementes de outras espécies e 0,72% de pó para o lote oriundo de Guarapuva – PR.

#### 2.2.3.1.2 Determinação do teor de água



Os métodos de determinação do teor de água recomendados pelas RAS são os métodos de estufa, adotados internacionalmente pelo fato de serem facilmente reproduzíveis e executados. O método da estufa à 105 °C por 24 horas é utilizado para todas as espécies (Brasil, 2009).

Este método também é o mais utilizado para determinação do teor de água (TA) de sementes de erva-mate. Mello (1980) obteve 7,4 e 8,2% para sementes de erva-mate oriundas do Rio Grande do Sul e Paraná, respectivamente. Souza *et al.* (2020b), analisando quatro lotes de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, verificaram teores de água entre 6,9 e 12,5%; Meneguetti *et al.* (2004) e Mireski *et al.* (2019) observaram 11,6% e 10,7% de TA para sementes oriundas do Paraná. Para sete lotes de sementes coletadas em Mato Grosso do Sul, o teor de água variou de 9 a 11,8% (Duboc & França, 2016) e para sementes coletadas na Argentina, foi verificado TA médio de 10,6±0,7% (Galíndez *et al.*, 2018).

#### 2.2.3.1.3 Peso de mil sementes e tamanho

O peso de mil sementes (PMS) é utilizado para calcular o número de sementes de um lote e é um indicativo do estado de maturidade e sanidade das sementes (Brasil, 2009). Além de ser sinônimo de qualidade, já que sementes vazias e malformadas, quando comparadas às bem formadas, apresentam menor peso (Barbedo & Santos-Junior, 2018).

O PMS é realizado através de contagem manual ou por meio de contadores mecânicos onde são contadas oito repetições de 100 sementes, que são pesadas em balança analítica (0,0001g), e calculado de acordo com a seguinte equação (Brasil, 2009):

$$\text{Peso de mil sementes (PMS)(g)} = \frac{\text{peso da amostra (g)} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes}}$$

Poucos trabalhos analisaram o peso de mil sementes. Kuniyoshi (1983) obteve 7,1 g para sementes oriundas do Paraná; Duboc & França (2016) e Meneguetti *et al.* (2004) obtiveram 6,69 g para sementes do Mato Grosso do Sul e Paraná, respectivamente.

Kuniyoshi (1983) verificou que em 1 kg de sementes de erva-mate têm cerca de 155.200 sementes; Zanon (1988) afirma que em 1 kg há em média 140.000 sementes, com variação de 110.000 a 190.000; Medrado *et al.* (2000) observou que há de 90.000 a 100.000 sementes por quilograma; Duboc & França contabilizaram em média 208.000 sementes em um quilograma.

A obtenção do tamanho das sementes pode ser realizada através da caracterização biométrica, com auxílio de paquímetro digital (0,01 mm), as sementes são medidas no sentido longitudinal (ML) e transversal (MT) (mm). O tamanho das sementes tem relação com a multiplicação celular do eixo embrionário e tecido de reserva, como, por exemplo, cotilédones e endosperma. Geralmente, sementes mais nutridas durante a formação apresentam maior tamanho, o que implica em maior quantidade de reservas e, conseqüentemente, em maior vigor (Carvalho & Nakagawa, 2012).

Com relação ao tamanho, Mello (1980) verificou que a sementes de erva-mate oriundas do Paraná e Rio Grande do Sul apresentam 3,5 a 4 mm de comprimento e 2 a 2,5 mm de largura. Kuniyoshi (1983) obteve 3,4; 4,6 e 6,4 mm de altura, 1,8; 1,9 e 3,1 mm de largura e 0,6; 1,4 e 2,2 mm de espessura para sementes coletadas no Paraná. E Duboc & França (2016) obtiveram 3,63 mm de comprimento médio e 1,88 mm de espessura média para sementes amostradas de sete matrizes em Mato Grosso do Sul.

#### 2.2.3.1.4 Germinação

O teste de germinação tem como objetivo determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, podendo ser utilizado para comparar a qualidade das sementes oriundas de diferentes lotes, bem como informar o percentual de germinação (Brasil, 2009).

Para a erva-mate, foram realizados diversos testes de germinação. Mello (1980) após 180 dias obteve 32,7% de germinação média; Cuquel *et al.* (1994) após 180 dias de

estratificação e mais 60 dias de germinação verificou 2,4% de germinação média; Catapan (1998) após 222 dias de estratificação e mais 150 dias de germinação observou germinação de zero à 52% dependendo do tratamento empregado; Schaparini & Viecelli (2011) após 110 dias de germinação tiveram germinação média de 0,65%; Galíndez *et al.* (2018) após 40 meses observaram germinação máxima de 25% e Souza (2018) após 10 meses observou 26% de germinação máxima. De modo geral a germinação é muito variável entre lotes e tratamentos.

De acordo com Niklas (1987), a baixa porcentagem de germinação inicial em sementes de erva-mate se deve ao fato de os embriões estarem em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 10): maduros (0,96%), torpedado (2,65%), pós-coração (23,62%), coração (70,24%) e globular (2,6%).

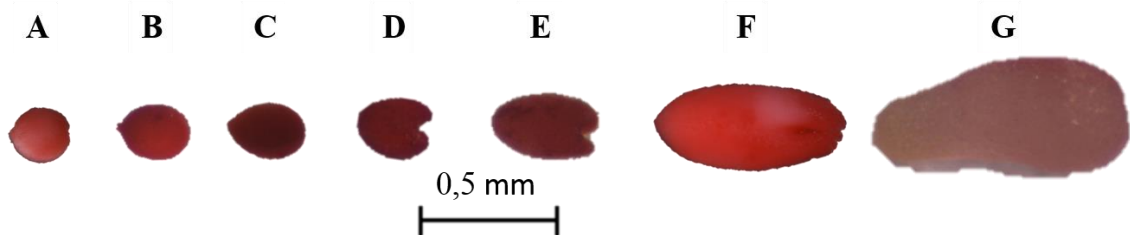


FIGURA 10. Embriões de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) em diferentes estágios de desenvolvimento: cotiledonar (A), cordiforme (B, C e D), cordiforme tardio (E), torpedado (F) e maduro (G). Porto Alegre, RS, 2020.

#### 2.2.3.1.5 Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio tem o objetivo de determinar rapidamente a viabilidade de sementes, em especial àquelas que apresentam dormência e que germinam lentamente em testes de rotina. Este teste consiste na embebição das sementes em uma solução incolor de 2, 3, 5 trifenil cloreto ou brometo de tetrazólio que reage com os tecidos vivos por meio da liberação de íons de  $H^+$  durante a respiração. Assim, há uma nítida separação dos tecidos coloridos (vivos que respiram) dos não coloridos (mortos) sendo considerada viável toda

semente que apresenta endosperma firme e colorido, com embrião visível, sem danos e com consistência firme (Brasil, 2009).

O teste de tetrazólio é de fundamental importância para determinar a viabilidade das sementes de erva-mate, já que os resultados são obtidos rapidamente, quando comparados ao teste de germinação (Mello, 1980; Catapan, 1998). Porém, na literatura há divergências com relação à classificação das sementes viáveis. Mello (1980), Mireski *et al.* (2019) e Souza (2018) definiram como viáveis todas as sementes que apresentaram embrião e endosperma coloridos. Já Catapan (1998) considerou viáveis sementes com endosperma e embrião colorido, e endosperma colorido sem embrião visível. Enquanto Sousa *et al.* (2015) consideraram viáveis sementes com endosperma colorido com embrião colorido e sementes com endosperma não colorido com embrião colorido, sendo que esta última contraria todas as classificações realizadas até o momento. As RAS consideram como viável a semente que apresenta endosperma e embrião coloridos (Brasil, 2009).

Ainda há uma carência de informações com relação a presença de sementes de erva-mate sem embrião, alguns autores citam e contabilizam a presença dessas sementes (Catapan, 1998; Souza *et al.*, 2018), já outros não verificaram (Cunha & Ferreira, 1987; Niklas, 1987; Fowler *et al.*, 2007; Galíndez *et al.*, 2018; Mireski *et al.*, 2019) ou não se sabe se esta informação foi omitida. Duboc & França (2016) classificaram sementes sem embrião como de viabilidade indefinida. E até o momento são desconhecidas as causas pelas quais ocorre a formação de sementes de erva-mate sem embrião visível.

O teste de tetrazólio pode ser utilizado para comparar diferentes lotes de sementes e, também durante a realização do teste são identificadas as sementes vazias, ou seja, sem endosperma e embrião, além de sementes deterioradas, que também são uma das causas da baixa viabilidade das sementes de erva-mate. Trabalhos utilizando esse teste, comprovaram a diferença na porcentagem de sementes viáveis e não viáveis procedentes de diferentes regiões (Mello, 1980; Souza *et al.*, 2020a).

#### 2.2.4 *Dormência em sementes*

Após a maturação e perda de água a semente entra em um estado de quiescência, com a posterior reidratação e germinação. Porém, algumas espécies podem apresentar dormência, que pode ser caracterizada pela ausência da germinação, mesmo quando as sementes estão sob condições de disponibilidade de água, temperatura adequada e condições atmosféricas normais para a espécie. Sob o ponto de vista ecofisiológico, a dormência pode ser caracterizada pelo bloqueio temporal da germinação, de modo que a semente possa ser dispersada a distâncias maiores, bem como impedir a germinação sob condições desfavoráveis (Baskin & Baskin, 2004; Bewley *et al.*, 2013; Baskin & Baskin, 2014; Marcos-Filho, 2015; Taiz *et al.*, 2017).

A classificação da dormência pode ser feita por meio da sua origem, localização e mecanismos envolvidos. A dormência é induzida em determinada fase do desenvolvimento das sementes e também por condições ambientais específicas. Inicialmente é classificada em: primária, que se instala durante o desenvolvimento da semente na planta-mãe; e secundária, que se estabelece na semente após sua dispersão (Cardoso, 2009; Baskin & Baskin, 2014; Marcos-Filho, 2015).

As sementes podem apresentar diferentes classes de dormência: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e combinada (física com fisiológica). A dormência fisiológica pode ser devido ao fitocromo que requer níveis específicos de luz (quantitativos e qualitativos) ou de origem hormonal, por meio do desbalanço de ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA), o que causa bloqueio na germinação. Este tipo de dormência apresenta três níveis (não profunda, intermediária e profunda) os quais apresentam diferentes graus de complexidade. Na dormência morfológica, as sementes apresentam embrião indiferenciado. A dormência morfofisiológica, além do embrião indiferenciado, apresenta restrição fisiológica para a germinação. Este tipo de dormência apresenta oito níveis (simples não

profunda, simples intermediária, simples profunda, simples de epicótilo profunda, simples dupla profunda, complexa não profunda, complexa intermediária e complexa profunda), os quais foram definidos com base na temperatura requerida durante a estratificação. A dormência física ocorre devido à presença de envoltório impermeável à água e a dormência combinada é devido à associação da dormência física e fisiológica não profunda, devendo ambas serem superadas para que ocorra a germinação (Baskin & Baskin, 2004; Baskin & Baskin, 2014).

De forma geral há um consenso de que as sementes de erva-mate apresentam embrião rudimentar, estando a maioria no estágio de coração, mesmo após a dispersão (Mello, 1980; Kuniyoshi, 1983; Cunha & Ferreira, 1987; Niklas, 1987; Heuser, 1990; Ferreira *et al.*, 1991; Heuser *et al.*, 1993; Catapan, 1998; Medeiros, 1998; Sansberro *et al.*, 1998; Heuser, 1999; Fowler & Sturion, 2000; Fowler *et al.*, 2007), o que é característico de dormência morfológica. Também é descrita a presença de inibidores no endosperma e/ou endocarpo (Ferreira *et al.*, 1991; Fowler & Sturion, 2000; Fowler *et al.*, 2007; Dolce *et al.*, 2010; Wendling & Santin, 2015), além da presença de compostos fenólicos no tegumento (Mireski *et al.*, 2019) caracterizando a dormência fisiológica. Contudo, alguns autores afirmam que o endocarpo lenhoso prejudica a protusão radicular (Medeiros, 1998; Dolce *et al.*, 2010), além das sementes apresentarem dormência tegumentar, o que as torna impermeáveis, dificultando a absorção de água, trocas gasosas e a germinação (Fowler & Sturion, 2000; Fowler *et al.*, 2007). Estudos mais recentes indicam que as sementes de erva-mate apresentam dormência morfofisiológica profunda simples (Galíndez *et al.*, 2018) e Souza (2018) afirma que as sementes de erva-mate apresentam dormência combinada (morfológica, fisiológica e física).

Ainda existem muitas controvérsias com relação à dormência das sementes de erva-mate e as causas das baixas taxas de germinação. Souza *et al.* (2020a) afirmam que a

presença de sementes vazias e deterioradas, associado à dormência, é uma das causas das baixas taxas de germinação.

#### 2.2.4.1 Superação da dormência

Para superar a dormência em sementes de erva-mate, a estratificação em areia é a técnica mais utilizada e difundida entre os viveiristas. Esta consiste em misturar as sementes em areia ou em camadas intercaladas com esta, distribuindo uma camada de até 2 cm de sementes, entre duas camadas de areia, com 8 a 10 cm cada (Zanon, 1988). Os recipientes utilizados são caixas, latas ou baldes (Zanon, 1988; Cuquel *et al.*, 1994; Medrado *et al.*, 2000; Wendling & Santin, 2015) ou em sacos (Figura 11) que são enterrados em locais bem drenados. As sementes ficam estratificando por um período de seis meses (Zanon, 1988; Cuquel *et al.*, 1994; Medrado *et al.*, 2000; Wendling & Santin, 2015), quando é retirado o excesso de areia e as sementes são semeadas em tubetes, por exemplo. A germinação de forma geral é desuniforme, iniciando em torno de 100 dias e se estendendo a até 360 dias (Cuquel *et al.*, 1994; Wendling & Santin, 2015).

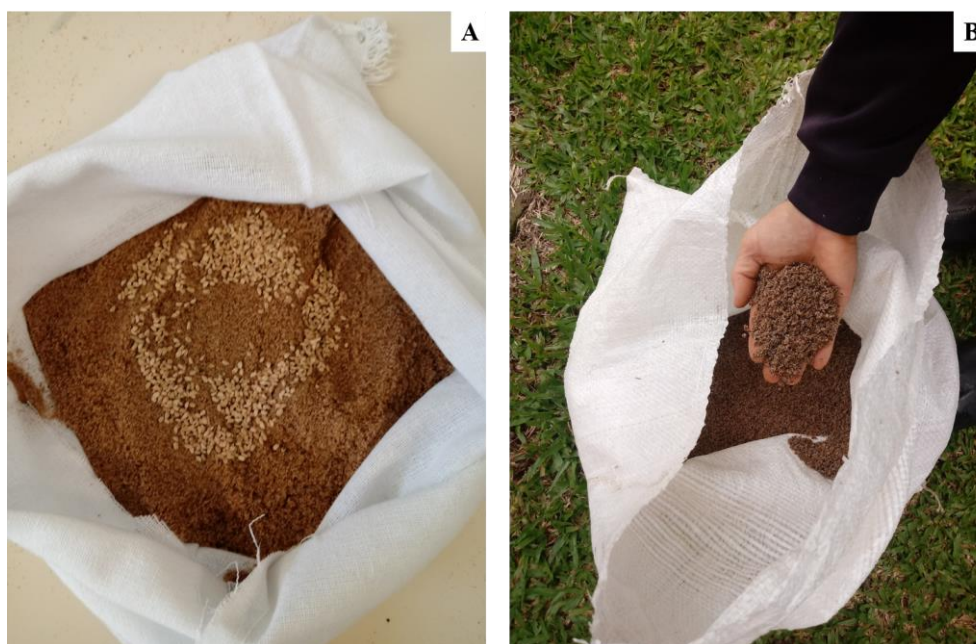


FIGURA 11. Estratificação de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) em areia. Porto Alegre, RS, 2018.

Além da estratificação em areia, outras técnicas para tentar acelerar a germinação foram testadas. É o caso da imersão das sementes em água destilada e água de coco por 24 h, imersão em água quente a 50 e 100 °C durante 30 min, armazenamento à temperatura de 5 e -5 °C em ausência de luz por 24 h (Schaparini & Viecelli, 2011), pré-resfriamento a 9 °C por 30 dias (Mello, 1980), diferentes substratos (areia, vermiculita e ágar) e temperaturas (20, 25 e 30 °C constantes, temperatura alternada 20-30 °C) na presença e ausência de luz (Catapan, 1998), estratificação em areia em diferentes temperaturas (-12, -2 e 25 °C) (Meneguetti *et al.*, 2004), estratificação com umedecimento da areia com água, ácido giberélico e solução de nitrato de potássio, com alternância de luz e temperatura (Cuquel *et al.*, 1994), escarificação química com ácido sulfúrico e corte no tegumento no lado oposto da micrópila (Miotto, 2014), escarificação mecânica com lixa, diferentes temperaturas (constantes: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C, e alternadas: 5/15, 10/20, 10/25, 15/25, 20/30 e 10/35 °C) e ácido giberélico (Souza, 2018). Porém, na maioria dos trabalhos citados a germinação foi baixa, em geral inferior a 20%. Contudo, Souza (2018) obteve 26% de germinação em temperatura alternada de 20/30 °C e 260µM de ácido giberélico e Catapan (1998) teve 52% de germinação após 222 dias de estratificação e 150 dias de germinação em areia, presença de luz e temperatura alternada de 20/30°C.

#### 2.2.4.2 Anatomia de sementes

Um dos primeiros trabalhos descrevendo a semente de erva-mate e sua composição foi realizado por Mello (1980), após Kuniyoshi (1983) descreveu aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento pós-seminal. Na sequência foram realizados estudos embriológicos e citológicos (Niklas, 1987), descrição do desenvolvimento embrionário tardio e a estrutura do endosperma (Heuser, 1990; Heuser *et al.*, 1993) e descrição do suspensor e do endosperma desde a embriogênese inicial até a embriogênese tardia (Heuser,



1999). Souza (2018) descreveu os aspectos morfológicos e o desenvolvimento embrionário após a dispersão das sementes, e Mireski *et al.* (2018) por meio de análises histoquímicas identificou a presença de polifenóis no tegumento das sementes de erva-mate. Contudo, há uma lacuna de estudos que acompanham o desenvolvimento embrionário durante testes de estratificação.

### **2.3 Adubação de mudas**

Para a obtenção de mudas com qualidade genética, fisiológica e sanitária e, conseqüentemente, plantas produtivas com alto padrão de matéria-prima (Duarte *et al.*, 2019) é de suma importância a nutrição adequada das mudas nos viveiros, pois o manejo da adubação de base ou de cobertura é um dos principais fatores que contribuem para a maior qualidade das mudas, sobrevivência e crescimento após o plantio no campo (Araújo *et al.*, 2018). A adubação é uma prática essencial nos viveiros para o acúmulo de biomassa, pois deficiências nutricionais comprometem o metabolismo da planta e reduzem o crescimento das mudas (Zavistanovicz *et al.*, 2017). Porém, para a maioria das espécies nativas as informações são escassas (Emer *et al.*, 2020).

O setor produtivo da erva-mate ainda carece de informações básicas, principalmente no que diz respeito à produção de mudas, alguns trabalhos ainda utilizam solo como substrato no cultivo em recipientes (Schafer *et al.*, 2015; Zavistanovicz *et al.*, 2017). Porém, cada vez mais são estudadas fontes alternativas como substratos à base de lodo de esgoto e resíduo de carvão (Gabira *et al.*, 2020b), misturas de fibra de coco e subprodutos industriais, incluindo os oriundos de resíduos do processamento de erva-mate (Gabira *et al.*, 2020a).

Contudo, o suprimento de elementos minerais se faz necessário, pois na maioria dos casos, o substrato não apresenta os nutrientes em quantidades adequadas para um bom desenvolvimento das mudas.

### 2.3.1 Fertilizante de liberação controlada

O uso de fertilizantes de liberação controlada é considerado uma alternativa como fonte de nutrientes para espécies florestais produzidas em viveiros, pois induzem rápido crescimento inicial e apresentam menores perdas das mudas após o plantio no campo (Araújo *et al.*, 2019).

Os fertilizantes de liberação controlada disponibilizam os nutrientes de forma gradual às plantas por meio de mecanismos de difusão controlada, apresentam baixas perdas por lixiviação e reduzem a salinização do ambiente nos viveiros. O uso adequado desses fertilizantes apresenta maiores benefícios agrônômicos e ambientais em comparação com as práticas de fertilização convencional (Shaviv, 2000).

As doses de fertilizantes de liberação controlada são variáveis para a produção de mudas de espécies nativas, pois apresentam diferentes necessidades nutricionais, e além do mais o tipo de substrato deve ser levado em consideração (Cabreira *et al.*, 2021). De maneira geral, a adição de fertilizantes de liberação controlada para a produção de mudas de espécies florestais tem respostas positivas (Gibson *et al.*, 2019). Mudas de *Cedrela fissilis* (Navroski *et al.*, 2016), *Moringa oleifera* (Rosa *et al.*, 2018), *Euterpe oleraceae* (Araújo *et al.*, 2019) apresentam bom crescimento com adubação de base com fertilizante de liberação controlada. Mudas bem fertilizadas de *Inga laurina* apresentaram uma taxa de sobrevivência maior após 12 meses de plantio a campo (Cabreira *et al.*, 2021).

Na produção de mudas de erva-mate a utilização desse tipo de fertilizante ainda é incipiente. Zavistanovicz *et al.* (2017) utilizaram 6 g L<sup>-1</sup> de Osmocote® 15-09-12 e verificaram desempenho similar quando comparado à adubação convencional com 0,7 g L<sup>-1</sup> de ureia, 8,0 g L<sup>-1</sup> de superfosfato simples e 0,4 g L<sup>-1</sup> cloreto de potássio. Gortari *et al.* (2020) através de testes preliminares convencionaram adicionar 3 kg m<sup>-3</sup> de Plantacote® Plus 6M ao substrato casca de pinus compostada para produção de mudas de erva-mate propagadas por sementes e estacas.

### 2.3.2 Atributos morfológicos de qualidade de mudas

A qualidade das mudas produzidas em viveiro pode ser avaliada por meio de atributos morfológicos facilmente mensuráveis como altura, diâmetro do coleto e número de folhas, sendo avaliações não destrutivas que podem ser obtidas ao longo do tempo. Métodos destrutivos também podem ser utilizados, dentre os quais estão: matéria seca, área foliar, comprimento e volume de raiz (Landis *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2018). Tais parâmetros são muito utilizados para determinar o padrão de qualidade das mudas e os resultados são de fácil compreensão por parte dos viveiristas (Gomes *et al.*, 2002). Por meio destes dados também é possível calcular índices como a relação da altura e diâmetro do coleto, relação da altura e massa seca da parte aérea, relação massa seca da parte aérea e massa seca radicular e índice de qualidade de Dickson (IQD) (Dickson *et al.*, 1960; Gomes *et al.*, 2002).

Para a classificação e seleção das mudas, a altura é um dos parâmetros mais utilizados (Gomes *et al.*, 2002); juntamente com o diâmetro do coleto são análises fáceis de serem mensuradas (Gomes *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2018; Araújo *et al.*, 2020), sendo estas as duas características morfológicas mais importantes que afetam a qualidade e por isso são muito utilizadas para a classificação das mudas. O diâmetro do coleto é um bom indicador que pode ser correlacionado com o desenvolvimento das mudas à campo (Landis *et al.*, 2010).

Com relação à altura, Cabreira *et al.* (2021) também verificaram que mudas de *Inga laurina* (Sw.) Willd que não receberam fertilização apresentaram a menor altura média. Para o diâmetro do coleto, mudas de *Melanoxylon brauna* Schott (Gibson *et al.*, 2019) apresentaram comportamento linear crescente para esta variável com o uso de fertilizante Basacote Mini 6M (13-6-16) quando comparado sem o uso, demonstrando o potencial das mudas em responder à fertilização de liberação controlada.

Silva *et al.* (2019) verificaram que doses crescentes de Osmocote Plus no cultivo de *Acacia mangium* contribuíram para aumentar a massa seca da parte aérea e radicular, com reflexos positivos no desenvolvimento das mudas. Para mudas de *Euterpe oleraceae* a massa seca radicular aumentou com as doses do fertilizante Osmocote (Araújo *et al.*, 2019).

O IQD é variável entre espécies, e de maneira geral os dados disponíveis para espécies da Mata Atlântica ainda são escassos (Cabreira *et al.*, 2021). Para *Inga laurina* houve aumento no IQD com as doses de fertilizante de liberação controlada (Cabreira *et al.*, 2021), já para *Peltophorium dubium* não foi verificado efeito significativo do fertilizante Osmocote (Dutra *et al.*, 2016).

## 2.4 Referências

- ARAÚJO, E. F. *et al.* Controlled release fertilizer in the rooting and performance of clones of *Paratecoma peroba*. **Cerne**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 202-211, 2020.
- ARAÚJO, J. M. *et al.* Shading and slow release fertilizer effects on the growth characteristics of açai seedlings (*Euterpe oleracea*). **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 31-39, 2019.
- ARAÚJO, M. M.; NAWROSKI, M. C.; SCHON, L. A. **Produção de sementes e mudas: um enfoque à silvicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2018. 448 p.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Rio de Janeiro: Instituto Souza Cruz, 2002. 325 p.
- BARBEDO, C. J.; SANTOS-JUNIOR, N. A. **Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2018. 208 p.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. London: Academic Press. 2014. 1586 p.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392 p.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 17, de 26 de abril de 2017. Regulamenta a produção, a comercialização e a utilização de sementes e mudas de espécies florestais ou de interesse ambiental ou medicinal, nativas e exóticas, visando garantir sua procedência, identidade e qualidade, revogando a Instrução Normativa MAPA nº 56, de 8 de dezembro de 2011, e

Instrução Normativa MAPA nº 39, de 21 de dezembro de 2012. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 28 abr. 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 56, de 8 de dezembro de 2011. Regulamenta a produção, a comercialização e a utilização de sementes e mudas de espécies florestais, nativas e exóticas, visando garantir sua procedência, identidade e qualidade, e aprova anexos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 9 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília, DF: MAPA, 17 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes (RAS)**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

BRITO, F. C.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, G. T. Extracts of the unripe fruit of *Ilex paraguariensis* as a potential chemical control against the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Ampullariidae). **Natural Product Research**, London, v. 33, n. 16, p. 2379-2382, 2018.

CABREIRA, G. V. *et al.* Controlled-release fertilizer and container volume to produce *Inga laurina* seedlings. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, [art.] e20190057, 2021.

CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 619-631, 2009.

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

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. v. 1. 1039 p.

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

CHECHI, L. A.; SCHULTZ, G. A produção de erva-mate: um estudo da dinâmica produtiva nos estados do sul do Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 13, n. 23, p. 16-26, 2016.

COELHO, G. C.; MARIATH, J. E. A.; SCHENKE, L. E. P. Populational diversity on leaf morphology of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, p. 47-51, 2002.

COLUSSI, J.; PRESTES, N. P. Frugivoria realizada por aves em *Myrciaria trunciflora* (Mart.) O. Berg. (Myrtaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Ilex paraguariensis* St.

Hil. no norte do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ornitologia**, São Leopoldo, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.

CROGE, C. P.; CUQUEL, F. L.; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 78, n. 5, [art.] e20190259, 2021.

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

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

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of White spruce and White pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 10-13, 1960.

DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 441-448, 2010.

DUARTE, M. M. *et al.* Rooting of yerba mate cuttings with different lengths. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 5-11, 2019.

DUBOC, E.; FRANÇA, R. S. S. R. Resultados preliminares sobre a qualidade de sementes de erva-mate coletados no Estado de Mato Grosso do Sul em 2015. **Cadernos de Agroecologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 1-10, 2016.

DUTRA, T. R. *et al.* Fertilizante de liberação lenta no crescimento e qualidade de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*). **Revista Floresta**, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 491-498, 2016.

EMER, A. A. *et al.* Controlled release fertilizer used for the growth of *Campomanesia aurea* seedlings. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 35-44, 2020.

FARIA, J. C. T. *et al.* Physical quality of seeds of *Moquiniastrum polymorphum*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 79, n. 1, p. 63-69, 2019.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 254 p.

FERREIRA, A. G. *et al.* *In vitro* germination of embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**, Buenos Aires, v. 1, n. 52, p. 27-32, 1991.

FERREIRA, A. G. *et al.* Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hill. **Brasil Florestal**, Brasília, DF, n. 53, p. 29-33, 1983.

FLORA DO BRASIL. **Aquifoliaceae in Flora do Brasil 2020**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 3 ago. 2021.

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

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

FUNDOMATE - FUNDO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO DA CADEIA PRODUTIVA DA ERVA-MATE. **Informativo do Fundomate**, Porto Alegre, n. 16, p. 1-3, jul. 2016. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201702/01083717-20160711140348informativo-do-fundomate-16-2016-esse.pdf>. Acesso em: 6 ago. 2021.

FUNDOMATE - FUNDO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO DA CADEIA PRODUTIVA DA ERVA-MATE. **Informativo do Fundomate**, Porto Alegre, v. 27, p. 1-4, jun. 2017. Disponível em: <https://bit.ly/3ddzJJs>. Acesso em: 8 ago. 2021.

GABIRA, M. M. *et al.* Industrial residues as substrate components for the production of *Ilex paraguariensis* seedlings. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, PI, v. 11, [art.] e3215, 2020a.

GABIRA, M. M. *et al.* Alternative substrates and containers for *Ilex paraguariensis* seedlings. **Acta Igazu**, Cascavel, v. 9, n. 3, p. 78-87, 2020b.

GALÍNDEZ, G. C. D. *et al.* Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2018.

GARAY, A.; ELIAS, S.; MEYER, D. J. L. Development of a uniform blowing procedure for grass seeds: principles, applications and benefits. **Ista News Bulletin**, Vollebekk, n. 138, p. 26-32, 2009.

GIBSON, E. L. *et al.* Controlled-release fertilizer on growth of *Melanoxylon brauna* Shott seedlings. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, [art.] e20180418, 2019.

GOMES, J. M. *et al.* Parâmetros morfológicos na avaliação de qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 6, p. 655-664, 2002.

GORTARI, F. *et al.* Growth and physiological responses of yerba mate seedlings and mini-cuttings under drought stress. **Cerne**, Lavras, v. 26, n. 3, p. 341-348, 2020.

GREFF, H. P.; FARIAS, J. A.; SOUZA, P. D. Description of the mate industrial agglomerate of the Alto Vale Taquari, Rio Grande do Sul, Brazil. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, [art.] e20180137, 2020.

GRZYBOWSKI, C. R. S. *et al.* Processing and physical and physiological quality of the native forest seeds of *Vernonanthura discolor*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 41, [art.] e39574, 2019.

HEUSER, E. D. **Embriogênese em *Ilex paraguariensis* St. Hil.:** aspectos do suspensor e endosperma. 1999. 156 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Curso de Pós-Graduação em

Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

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

HEUSER, E. D. *Ilex paraguariensis* St. Hill.: endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. 1990. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Curso de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em: 31 jul. 2021.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. 1983. 245 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

LANDIS, T. D.; DUMROESE, R. K.; HAASE, D. L. **The container tree nursery manual: seedling processing, storage, and outplanting**. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, 2010. v. 7. 200 p.

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

MEDEIROS, A. C. S. **Dormência em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)**. Colombo, PR: Embrapa- CNPF, 1998. 25 p. (Documentos, 36).

MEDRADO, M. J. S. *et al.* **Implantação de ervais**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2000. 26 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 41).

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

MENEGUETI, J. C. B. *et al.* Superação da dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) por estratificação. **Varia Scientia**, Cascavel, v. 4, n. 8, p. 157-182, 2004.

MIOTTO, R. **Métodos para a quebra de dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) St. Hill.** 2014. 20 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul, 2014.

MIRESKI, M. C. *et al.* Polyphenols in yerba mate seeds: potential inhibitors of germination. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 593-600, 2018.

MIRESKI, M. C. *et al.* Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1354-1362, 2019.



NAVROSKI, M. C. *et al.* Procedência e adubação no crescimento inicial de mudas de cedro. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 36, n. 85, p. 17-24, 2016.

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

PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 4. ed. Pelotas: Becker e Peske, 2019. 579 p.

PIRES, E. Z. *et al.* Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) em remanescente de floresta ombrófila mista Altomontana. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 13, n. 2, p. 171-180, 2014.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: an overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, London, v. 38, p. 308-320, 2017.

ROSA, T. L. M. *et al.* Controlled release fertilizer in the growth of *Moringa oleifera* LAM. seedlings. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 303-310, 2018.

SANSBERRO, P. A. *et al.* *In vitro* culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 17, n. 2, p. 101-105, 1998.

SANTOS, E. C.; BICCA, M. A.; BLUM-SILVA, C. H. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, New York, v. 292, p. 13-21, 2015.

SAPELLI, K. S.; FARIA, C. M. D. R.; BOTELHO, R. V. Conservação pós-colheita de pêssegos com aplicação de revestimentos aditivados de extrato de erva-mate. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 23, [art.] e2019044, 2020.

SCHAFER, G.; SOUZA, P. V. D.; FIOR, C. S. Um panorama das propriedades físicas e químicas de substratos utilizados em horticultura no sul do Brasil. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 299-306, 2015.

SCHAPARINI, P. S.; VIECELLI, C. A. Superação de dormência de sementes de erva mate. **Revista Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 4, n. 4, p. 163-170, 2011.

SHAVIV, A. Advances in controlled release of fertilizers. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 71, p. 1-49, 2000.

SILVA, L. D. D. *et al.* Controlled-release fertilizer in the production and quality of *Acacia mangium* seedlings. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, [art.] e02092017, 2019.

SILVA, M. A. F.; HIGUCHI, P.; SILVA, A. C. Impacto de mudanças climáticas sobre a distribuição geográfica potencial de *Ilex paraguariensis*. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 4, p. 2069-2079, 2018.

SINDIMATE'RS - SINDICATO DA INDÚSTRIA DO MATE NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. **Dados estatísticos: erva-mate**. Porto Alegre, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/2UrMg3v>. Acesso em: 6 ago. 2021.

- SOBRAL, M. *et al.* **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2. ed. Porto Alegre: RiMa, 2013. 362 p.
- SOUSA, V. A.; AGUIAR, A. V.; SPOLADORE, J. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 2, p. 315-323, 2015.
- SOUZA, A. C. **Dormência em sementes de *Ilex paraguariensis***. 2018. 80 f. Tese (Doutorado) –Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.
- SOUZA, A. C. *et al.* Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. samples (Aquifoliaceae). **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, [art.] e20170960, 2020a.
- SOUZA, G. F. *et al.* Detection methods of fungi in *Ilex paraguariensis* seeds. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, [art.] e20170983, 2020b.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2012. 768 p.
- STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
- TEZUKA, T. *et al.* Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 48, n. 3, p. 352–356, 2013.
- WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 195 p.
- YANG, Y. *et al.* Immature embryo germination and its micropropagation of *Ilex crenata* Thunb. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 50, n. 5, p. 733-737, 2015.
- ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1988. 8 p. (Circular Técnica, n. 16).
- ZAVISTANOVICZ, T. C. *et al.* Morphophysiological responses of *Ilex paraguariensis* seedlings to different substrates and fertilizations. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 111-115, 2017.

### **3 CAPÍTULO 1**

## **Uso de soprador contínuo com fluxo vertical de ar no beneficiamento de sementes de erva-mate\***

\*Artigo formatado conforme as normas da Revista Ciência Agronômica.

**Use of continuous blower with vertical air stream in conditioning yerba mate seeds**

**RESUMO** – *Ilex paraguariensis* é propagada principalmente por sementes, porém os lotes apresentam alta porcentagem de sementes vazias e deterioradas, tornando-se importante investigar práticas de beneficiamento para aumentar a pureza e viabilidade inicial do lote. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial do uso do soprador contínuo com fluxo de ar vertical no beneficiamento de sementes de erva-mate. Sementes de sete matrizes foram expostas a fluxos de ar vertical nas aberturas 0; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5 cm, resultando em frações leves (aleta) e pesadas (base). Foram avaliados o percentual de sementes não íntegras (vazias + deterioradas), viáveis, não viáveis e peso de mil sementes (PMS) retidas na base e aleta do soprador. A porcentagem de sementes não íntegras retidas na base do soprador reduziu com o aumento da abertura do fluxo de ar, também houve redução da fração de sementes viáveis e para a porcentagem de sementes não viáveis não houve diferença. O PMS de todas as matrizes apresentou aumento significativo na fração contida na base à medida que aumentou a abertura. Conclui-se que o uso do soprador aumenta a qualidade física e fisiológica das sementes de erva-mate ao promover a remoção de sementes não íntegras (vazias + degradadas). As aberturas de 5,5 e 6,5 cm, com velocidade terminal média de 100 km h<sup>-1</sup> são indicadas para o beneficiamento de sementes de erva-mate, considerando a viabilidade e o PMS obtidos neste trabalho.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.. South Dakota. Teste de tetrazólio. Viabilidade de sementes.

**ABSTRACT** - *Ilex paraguariensis* is mainly propagated by seeds, but the lots have a high percentage of empty and deteriorated seeds, making it important to investigate processing practices to increase the purity and initial viability of the lot. The objective of this work was to evaluate the potential of using a continuous blower with vertical air flow in the processing of yerba mate seeds. Seeds from seven mother-plants were exposed to vertical air stream at openings 0; 3.5; 4.5; 5.5; 6.5 and 7.5 cm, resulting in light (fin) and heavy (base) fractions.

The percentage of unhealthy seeds (empty + deteriorated), viable, non-viable and a weight of a thousand seeds (WTS) retained in the base and blade of the blower were evaluated. The percentage of unhealthy seeds retained at the base of the blower reduced with the increase of the air flow opening, there was also a reduction in the fraction of viable seeds and for the percentage of non-viable seeds there was no difference. The WTS of all mother-plants had a significant increase in the fraction contained in the base as the opening increased. It is concluded that the use of the blower increases the physical and physiological quality of yerba mate seeds by promoting the removal of non-integral seeds (empty + degraded). The opening of 5.5 and 6.5 cm, with an average terminal velocity of 100 km h<sup>-1</sup> are indicated for the cleaning of yerba mate seeds, considering the viability and the WTS obtained in this work.

**Key words:** *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.. South Dakota. Tetrazolium test. Seeds viability.

## INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A.St-Hil. (Aquifoliaceae) é uma espécie arbórea nativa no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai, cujas folhas são utilizadas principalmente para o preparo do chimarrão e do tererê. Além disso, a espécie apresenta potencial para diferentes usos, como conservantes, suplementos alimentares, corantes, produtos de higiene, cosméticos, entre outros (CROGE; CUQUEL; PINTRO, 2021).

A produção de mudas de erva-mate é realizada principalmente a partir de sementes (WENDLING; SANTIN, 2015), contudo, essas apresentam baixa qualidade genética e fisiológica, taxa de germinação reduzida e desuniforme, além de dormência morfofisiológica (WENDLING; SANTIN, 2015; GALÍNDEZ *et al.*, 2018). As taxas de germinação são, em geral, inferiores à 20%, sendo atribuídas principalmente à dormência. Estudos recentes indicam que lotes de sementes de erva-mate apresentam alta porcentagem de sementes vazias e deterioradas (SOUZA *et al.*, 2020a), tornando-se importante investigar práticas de beneficiamento que possam aumentar a pureza e a viabilidade inicial do lote.

O beneficiamento de sementes é um conjunto de técnicas e operações que visam retirar impurezas, como material inerte, sementes danificadas, vazias, deterioradas e de outras espécies, deixando o lote mais puro para a semeadura, armazenamento ou comercialização (PESKE; VILLELA; MENEGHELLO, 2019). Pelo fato de a maioria das impurezas apresentar velocidade terminal maior do que as sementes, torna-se possível remover o material mais leve do lote com uso de um fluxo de ar vertical (GARAY; ELIAS; MEYER, 2009). Esta operação pode ser realizada com soprador que opera com diferentes configurações de abertura para passagem do fluxo de ar, dividindo a amostra original em uma fração leve e outra pesada, sem afetar a integridade das sementes (FARIA *et al.*, 2019).

A escolha da velocidade do ar a ser utilizada depende das características do lote de sementes, sendo variável entre plantas matrizes e entre diferentes colheitas, pois fatores intrínsecos e extrínsecos ligados à formação da semente afetam o tamanho e o peso específico (GRZYBOWSKI *et al.*, 2019). O fluxo de ar aumenta com a abertura do soprador (FARIA *et al.*, 2019) e, conseqüentemente, é alterada a capacidade do fluxo de ar em deslocar sementes de diferentes massas, separando as frações leve e pesada em locais distintos, identificados, respectivamente, como aleta e base do soprador.

Culturas tradicionais, sejam elas arbóreas ou não, em função de seleção e melhoramento, apresentam sementes com características biométricas muito semelhantes, mesmo entre matrizes distintas, mas não é o caso da erva-mate. Em função disso, há necessidade de uma série de testes e adaptações, testando-se diferentes matrizes para atingir uma regulagem do fluxo de ar vertical, de maneira a tornar possível o seu uso para a cultura. O estudo de lotes de sementes oriundos de diferentes ecótipos auxilia no estabelecimento das aberturas de ar adequadas ao beneficiamento, sem que haja o descarte demasiado de sementes viáveis e, assim chegar a uma recomendação de faixa de abertura que pode ser utilizada para diferentes lotes.

A hipótese deste trabalho está baseada na teoria de que a massa das sementes vazias e deterioradas difere suficientemente das sementes viáveis, sendo possível remover sementes não íntegras utilizando um fluxo de ar vertical. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial do uso do soprador contínuo com fluxo de ar vertical no beneficiamento de sementes de erva-mate.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Em janeiro de 2020 foram selecionadas sete plantas matrizes de erva-mate (MA13, MA14, MA15, MA16, MA20, MA21, MA22), com idade média de 30 anos e distância mínima de cinco metros e máxima de 200 m entre elas. Essas plantas pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) existente na Estação Florestal Experimental do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis (Parque do Ibama), em Ilópolis – RS (28° 55' 57.688" S 52° 7' 54.026" W). Este BAG foi formado a partir de propágulos coletados na maior parte da área de abrangência de distribuição da espécie no Brasil, nos estados do RS, SC, PR, e MS. Neste local, a proporção de plantas femininas e masculinas é de aproximadamente 1:1, num total de 640 plantas em uma área de 2,0 ha. Através da análise química pode-se observar que o solo do local apresenta pH 4,5, 34% de argila, 3% de matéria orgânica, 2,7 mg dm<sup>-3</sup> de fósforo e 118 mg dm<sup>-3</sup> de potássio.

Em fevereiro e março de 2020 foram coletados os frutos maduros dispersos naturalmente (abscisados) sobre telas de polietileno, afastadas 30 cm do solo, dispostas sob a projeção da copa de cada árvore. Os frutos foram levados ao laboratório onde foram isolados de resíduos vegetativos, e em seguida macerados sobre peneira sob água corrente.

As sementes de cada matriz permaneceram secando sobre papel toalha por três dias em bancada de laboratório. Na sequência, foi analisado o teor de água (TA), determinado pelo método da diferença percentual de massa após secagem em estufa a 105 °C ± 5 °C, por 24 horas (BRASIL, 2009). Para cada planta matriz foram utilizadas três amostras de 0,5 g.

Em seguida foi realizada a caracterização biométrica das sementes de cada matriz. Com auxílio de paquímetro digital (0,01 mm), as sementes foram medidas no sentido longitudinal (ML) e transversal (MT) (mm), sendo utilizadas quatro repetições de 25 sementes, retiradas ao acaso, por planta matriz.

Após três meses de armazenamento em frascos de vidro com tampa metálica sob temperatura constante de  $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , foi efetuada a pré-limpeza das sementes utilizando um jogo de peneiras de furos oblongos. O material retido nas peneiras com abertura de malha de 2,5 e 2,25 mm foi descartado, sendo composto por impurezas como fragmentos de ramos, folhas e frutos mumificados. O material retido na peneira com abertura de malha igual ou inferior a 2,0 mm foi homogeneizado no equalizador de amostras. Em seguida, essas amostras foram pesadas em balança analítica (0,001 g) e separadas em sete amostras de 50 g para cada matriz. Nesse momento foi determinada a pureza (%) de cada matriz, a partir da pesagem dos diásporos e do material inerte, este último composto por restos de frutos (pedúnculos e pericarpos), pedaços de folhas e ramos com tamanho inferior às malhas de peneiras utilizadas na pré-limpeza.

Posteriormente procedeu-se a limpeza das sementes usando um soprador de sementes De Leo® (modelo South Dakota). Este equipamento regula a velocidade do fluxo de ar, dividindo a amostra original em uma fração leve (aleta) e uma fração pesada (base). Uma válvula metálica numerada de 0 a 25 ajusta a velocidade do fluxo de ar, que aumenta com o número do ajuste. O equipamento é ajustado manualmente, quanto maior a abertura, maior a velocidade do fluxo de ar no equipamento. O soprador foi ajustado com as aberturas de 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5 cm e no tempo de ventilação de 60 segundos para cada abertura. A velocidade do ar foi monitorada por meio de um anemômetro digital LT Lutron LM-8000A Akso® acoplado na parte superior do tubo do soprador (Anexo I).

As configurações de abertura foram definidas em testes preliminares. Cada abertura testada correspondeu a um tratamento de 50 gramas de sementes para cada matriz. A massa



das duas frações de cada abertura (aleta e base) foi determinada em balança analítica (0,001g), convertendo os resultados em porcentagem da massa original (Anexo I). Também foi adicionado a estas aberturas um tratamento controle, sem o uso do equipamento e, portanto, sem a limpeza de sementes e denominado de abertura zero.

Posteriormente, para cada abertura (0; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5) e fração (aleta e base) de cada matriz, foram realizadas as seguintes análises:

- Avaliação da integridade das sementes de erva-mate (quatro repetições de 25 sementes).

Inicialmente, as sementes foram imersas em água ultrapurificada a 30 °C por 24 horas para facilitar o corte (CATAPAN, 1998). Em seguida, foi realizado o corte longitudinal com o auxílio de pinça e bisturi. As sementes foram analisadas visualmente com auxílio de microscópio estereoscópico Leica EZ4 HD, com aumento de 20 a 30 vezes. Nessa avaliação, as sementes foram classificadas em não íntegras, compostas por sementes vazias (ausência de embrião e de endosperma ou por conter menos de 50% dos tecidos) e deterioradas (endosperma e embrião necrosados ou com tecido gelatinoso). As demais foram classificadas como íntegras e utilizadas na avaliação descrita a seguir.

-Viabilidade pelo teste de tetrazólio: as sementes íntegras foram imersas em solução de 0,1% de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio por 24 horas a 35 °C (CATAPAN, 1998). Após esse período, procedeu-se a observação em microscópio estereoscópico Leica EZ4 HD, com aumento de 20 a 30 vezes e foram consideradas viáveis as sementes que apresentaram endosperma corado com embrião visível, sem danos e com consistência firme. As sementes que não apresentaram estas características foram classificadas como não viáveis (BRASIL, 2009). O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes para cada matriz. O cálculo de porcentagem de sementes não íntegras, viáveis e não viáveis foi ajustado com base na porcentagem da massa de sementes de cada fração (aleta e base) considerando a pureza e o PMS de cada matriz antes do beneficiamento.

- Peso de mil sementes (PMS): conforme metodologia descrita nas Regras de Análises de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), foram pesadas em balança analítica (0,0001g), três repetições de oito amostras de 100 sementes:

$$\text{Peso de mil sementes (PMS)(g)} = \frac{\text{peso da amostra (g)} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes}}$$

O valor final do PMS (g) foi corrigido considerando o teor de água médio (9,5%) das sementes para todas as amostras.

Os dados de teor de água, biometria, PMS, pureza, porcentagem de sementes não íntegras, viáveis e não viáveis pelo teste de tetrazólio antes do beneficiamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro pelo software CoStat 6.45 em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial simples. Os dados de porcentagem de sementes não íntegras, viáveis, não viáveis e PMS para as diferentes matrizes e aberturas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo software Costat 6.45 e regressão exponencial pelo SigmaPlot 11.0 em delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial (matriz x abertura do soprador). Os dados de porcentagem de não viáveis na aleta não atenderam aos pressupostos da ANOVA, sendo transformados para  $\sqrt{x + 100}$ , porém estão apresentados em seus valores originais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente ao beneficiamento, as matrizes apresentam diferença no teor de água (TA), com variação de 8,8% a 10,6% e TA médio de 9,5% (Tabela 1), coincidindo com os valores observados para a espécie (MIRESKI *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2020b). A matriz MA20 apresentou o maior PMS (8,8 g) e a matriz MA13, o menor (5,3 g), as demais apresentaram valores intermediários (Tabela 1).

Quanto à biometria, sementes das matrizes MA14 e MA20 apresentaram 3,91 mm de medida longitudinal (ML) e a matriz MA22, 3,98 mm, sendo estes os maiores valores. A

matriz MA13 apresentou o menor valor (1,70 mm). Já para a medida transversal (MT), a matriz MA21 apresentou a maior medida (2,02 mm) e as matrizes MA13 e MA15, os menores valores, 1,70 e 1,75 mm, respectivamente. As demais matrizes apresentaram valores intermediários, evidenciando a diversidade fenotípica da espécie (Tabela 1).

Para a avaliação da pureza, as matrizes não diferiram estatisticamente, apresentando 86,3% de diásporos e 13,7% de impurezas como médias gerais (Tabela 1).

**Tabela 1** - Teor de água (TA) (%), peso de mil sementes (PMS) (g), medida longitudinal (ML) (mm), medida transversal (MT) (mm) e pureza (%) antes do beneficiamento de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.

Matriz	Data coleta	TA (%)	PMS* (g)	ML (mm)	MT (mm)	Pureza (%)	
						Diásporos (%)	Impurezas (%)
MA13	08/02/2020	9,5 cd	5,3 f	3,17 d	1,70 d	90,9 ns	9,1 ns
MA14	09/03/2020	9,7 bc	7,9 b	3,91 a	1,89 b	86,0	14,0
MA15	09/03/2020	8,9 de	7,0 d	3,78 b	1,75 d	85,8	14,2
MA16	09/03/2020	10,3 ab	6,1 e	3,67 c	1,74 d	85,1	14,9
MA20	24/02/2020	8,8 e	8,8 a	3,91 a	1,910 b	84,1	15,9
MA21	24/02/2020	10,6 a	7,1 cd	3,63 c	2,02 a	86,0	14,0
MA22	24/02/2020	8,9 de	7,5 bc	3,98 a	1,82 c	86,3	13,7
Média		9,5	7,1	3,7	1,8	86,3	13,7
p valor		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,0886	0,0886
CV (%)		4,0	3,8	1,3	2,1	2,85	17,7

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro; ns – não significativo; CV – coeficiente de variação.

\*PMS considerando o TA médio de 9,5%.

Na avaliação da integridade das sementes, ainda antes do beneficiamento, observou-se que as matrizes diferiram entre si com relação à quantidade de sementes não íntegras (vazias + deterioradas). As matrizes MA14, MA16, MA21 e MA22 apresentaram a maior porcentagem de sementes não íntegras, com média de 45%. Estas foram seguidas pelas matrizes MA15 e MA20, com 38%, e pela matriz MA13 com o menor valor (28%). Esta mesma matriz (MA13) apresentou a maior porcentagem de sementes viáveis (45%). As

demais apresentaram valores entre 30 e 38%. A porcentagem de sementes não viáveis foi em média de 22,8% e variação de 17 a 32% (Tabela 2).

**Tabela 2** - Avaliação da integridade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): não íntegras (%) e viabilidade pelo teste de tetrazólio - viáveis (%) e não viáveis (%) oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.

Matriz	% Não íntegras	% Viáveis	% Não viáveis
Matriz 13	28 c	45 a	27 ab
Matriz 14	45 a	34 bc	21 bcd
Matriz 15	38 b	30 c	32 a
Matriz 16	44 a	35 bc	21 bcd
Matriz 20	38 b	38 b	24 bc
Matriz 21	46 a	36 b	18 cd
Matriz 22	45 a	38 b	17 d
Média	40,6	36,6	22,8
p valor	<0,001	<0,001	0,001
CV (%)	7,6	9,4	19,5

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro; CV – coeficiente de variação.

A variabilidade observada nos diásporos das diferentes matrizes pode ser atribuída a fatores genéticos, inerentes a cada planta (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Neste caso, com menor influência dos fatores ambientais, pois as árvores estão localizadas num mesmo ambiente e assim, expostas ao mesmo microclima.

Após passagem das sementes pelo soprador, foi verificada interação entre matriz e abertura do soprador para a maioria das variáveis analisadas, com exceção da porcentagem de sementes viáveis e não viáveis na base. Esta última variável só apresentou significância para matriz (Tabela 3).

Em todas as matrizes, a porcentagem de sementes não íntegras na base do soprador (Figura 1A) reduziu com o aumento da abertura do fluxo de ar, e, conseqüentemente a quantidade deste tipo de semente na aleta aumentou (Figura 1B). À medida que aumentou a velocidade, ocorreu incremento na proporção de sementes vazias e deterioradas na fração leve, porém houve grande variação entre as matrizes pelo fato de as sementes apresentarem

diferenças com relação ao tamanho (Tabela 1) e presença de sementes não íntegras (Tabela 2).

**Tabela 3** - Análise de variância de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) de diferentes plantas matrizes, beneficiadas em soprador de ar vertical com diferentes aberturas de fluxo de ar.

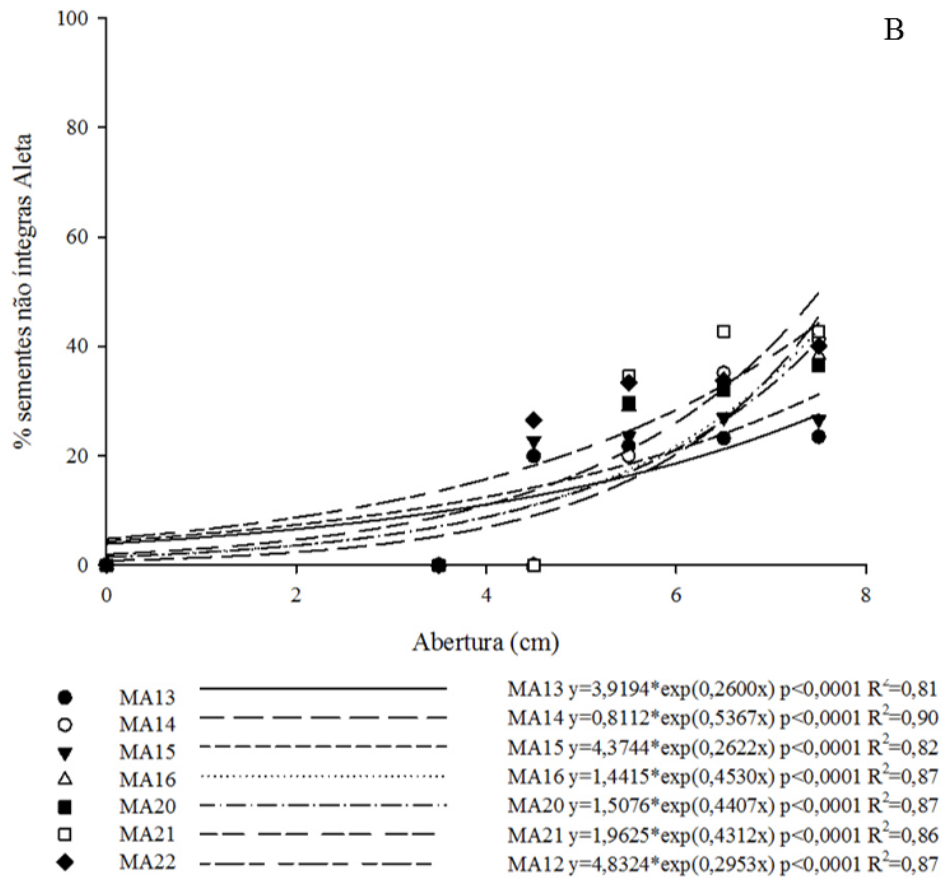
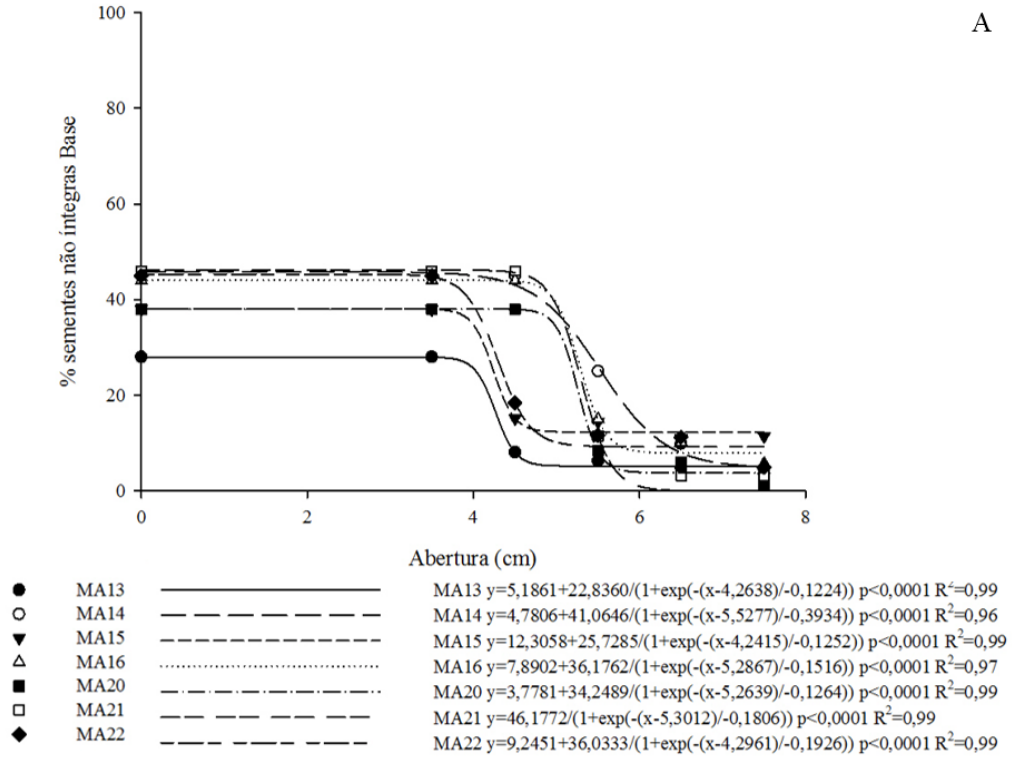
Variáveis analisadas	Matriz p valor	Abertura soprador p valor	Interação p valor	CV (%)	Média geral
% não íntegras Base	<0,001	<0,001	<0,001	13,2	23,3
% não íntegras Aleta	<0,001	<0,001	<0,001	16,5	17,3
% viáveis Base	<0,001	<0,001	0,0915	9,7	33,2
% viáveis Aleta	<0,001	<0,001	<0,001	28,4	3,4
% não viáveis Base	<0,001	0,0076	0,9999	19,8	21,3
% não viáveis Aleta*	<0,001	<0,001	<0,001	0,5	1,5
PMS Base (g)	<0,001	<0,001	<0,001	0,75	7,5
PMS Aleta (g)	<0,001	<0,001	<0,001	1,14	3,1

\*transformado para  $\sqrt{x + 100}$ ; CV - coeficiente de variação; 5% de probabilidade de erro.

Diásporos vazios ou malformados são deslocados pela massa de ar mais facilmente quando expostos numa coluna de ar vertical. Isso significa que o material indesejável pode ser removido usando uma velocidade de ar adequada (GARAY; ELIAS; MEYER, 2009). Para as matrizes MA13, MA15 e MA20, a abertura 3,5 permitiu remover apenas impurezas na aleta não sendo constatada a presença de sementes. Resultado semelhante foi obtido nas aberturas 3,5 e 4,5 para as matrizes MA14, MA16, MA21 e MA22 (Anexo I), demonstrando que essas aberturas são eficientes apenas na remoção de impurezas.

Este fato reduz a quantidade de material que é colocado para estratificar, já que o beneficiamento inadequado das sementes (presença de restos de polpa e outras impurezas) favorece a proliferação de microrganismos que podem acelerar a degradação das sementes e reduzir o estabelecimento de plântulas no viveiro provocando doenças (GRIGOLETTI JUNIOR *et al.*, 1999).

**Figura 1** - Porcentagem total de sementes não íntegras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) retidas na base (A) e na aleta (B) para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.



Embora os viveiristas realizam um pré-beneficiamento nas sementes de erva-mate, por meio do descarte do sobrenadante em água no momento da limpeza (WENDLING; SANTIN, 2015), as informações sobre a padronização desse processo e a porcentagem de sementes viáveis descartadas, bem como o quanto de sementes não íntegras permanece no lote e são colocadas para estratificar não estão esclarecidas. Além disso, os viveiristas colocam as sementes para estratificar logo após a limpeza, quando ainda existem restos de polpa, pericarpo e pedúnculos que favorecem a incidência de patógenos, contribuindo para a inviabilização das sementes ou causando doenças nas plântulas (SOUZA *et al.*, 2019). Isso é mais um fator que justifica o baixo percentual de germinação da espécie, conforme relatado na literatura (WENDLING; SANTIN, 2015; GALÍNDEZ *et al.*, 2018).

Nas aberturas 5,5; 6,5 e 7,5 restaram, em média, 13,2%, 8,1% e 5%, respectivamente, de sementes não íntegras na base, de um total de 40,6% antes do beneficiamento (Tabela 2), aumentando consideravelmente a qualidade das sementes na base do soprador. Contudo, este resultado está atrelado às características das sementes de erva-mate que apresentam diferentes comportamentos quando expostas a fluxos de ar.

A partir da abertura 5,5, 68,2% do total de sementes não íntegras foram transferidas da base do soprador para a aleta, considerando a média de todas as matrizes. Contudo, a variação entre as matrizes foi de 44% a 78,8%. Na abertura 6,5, a média foi de 80,1%, com variação de 70,9 a 93% entre as matrizes. E na abertura 7,5, a média de 87,2% do total de sementes não íntegras removidas da base e variação de 69,9 a 96%.

A quantidade de sementes viáveis na base do soprador foi muito variável entre matrizes e aberturas do soprador (Figura 2A). Embora para algumas matrizes a maior fração de sementes viáveis tenha permanecido na base do aparelho, à medida que aumentou o fluxo de ar, também reduziu proporcionalmente a fração de sementes viáveis na base, pois parte dessas foram sopradas para a aleta (Figura 2B). Nas aberturas zero e 3,5 não foi verificada a presença de sementes viáveis na aleta para nenhuma matriz, ou seja 100% das sementes

viáveis permaneceram na base do soprador. A partir da abertura 4,5 foi verificado que 95,4% do total de sementes viáveis permaneceram na base e somente 4,6% foram transferidas para a aleta. Na abertura 5,5 observou-se 90,4% do total de viáveis estavam na base e 9,6% foram sopradas para a aleta. Na abertura 6,5, 82,1% do total de sementes viáveis ficaram na base e 17,9% na aleta e na abertura 7,5, 74,5% do total de sementes viáveis permaneceram na base e 25,5% na aleta.

Contudo, a análise separada de cada matriz mostrou que os valores apresentaram muita variação. Na abertura 4,5 não foi verificada a presença de sementes viáveis na aleta para as matrizes MA14, MA16, MA20 e MA21. Porém, nesta mesma abertura, a matriz MA22 teve 17,1% do total de sementes viáveis sopradas para a aleta e as matrizes MA13 e MA15 apresentaram 4,9% e 10,0%.

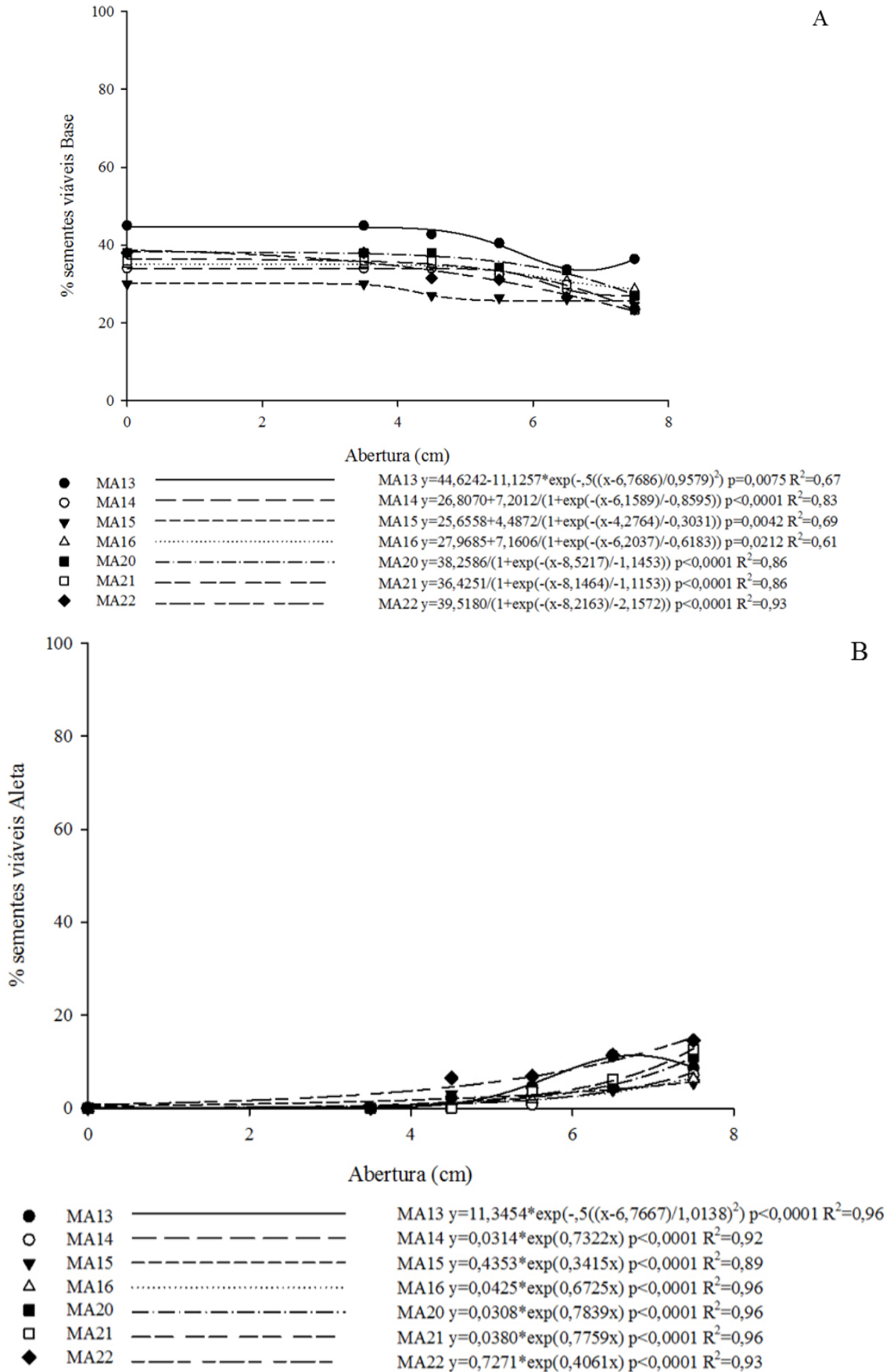
Na abertura 5,5, a perda média total de sementes viáveis foi de 9,6%, novamente com valores muito variáveis entre as matrizes. A matriz MA14 teve a menor perda (2%), seguida da matriz MA16 (5,1%). Já as matrizes MA13, MA15, MA20 e MA21 apresentaram em média 10% do total de sementes viáveis deslocadas da base para a aleta. De forma semelhante ao que foi verificado na abertura 4,5, a matriz MA22 também apresentou a maior porcentagem de perdas (18,1%) na abertura 5,5.

Na abertura 6,5 verificou-se perda média de 17,9% do total de sementes viáveis, e novamente a matriz MA22 apresentou o maior valor (30%), seguida da matriz MA13 (25,1%), MA21 (17,1%) e MA14 (16,1%). As matrizes MA20, MA16 e MA15 apresentaram média de 12,3% de sementes viáveis descartadas.

Para a abertura 7,5, 25,5% do total de sementes viáveis foram transferidas para a aleta, considerando a média de todas as matrizes, novamente com valores muito variáveis entre elas. As matrizes MA13, MA14, MA15 e MA16 apresentaram perda média de 19%, seguida pela matriz MA20 com 29,1%, da matriz MA21 com 35,1% e a matriz MA22 com 38,1% do total de viáveis.



**Figura 2** - Porcentagem total de sementes viáveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) retidas na base e na aleta para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.



De forma geral, a matriz MA22 apresentou as maiores porcentagens de sementes viáveis deslocadas para a aleta, com média de 25,8% do total de viáveis descartadas, sendo que na abertura 4,5 já apresentou 17,1% do total de viáveis descartadas e este valor foi aumentando acentuadamente, culminando com 38,1% do total de sementes viáveis sopradas para a aleta na maior abertura.

A variabilidade observada neste estudo se deve ao fato de as matrizes apresentarem diferenças principalmente com relação às características físicas, como PMS e dimensões (medida longitudinal e transversal) (Tabela 1), conseqüentemente apresentam comportamentos distintos quando expostas a um fluxo de ar. A remoção de materiais indesejáveis só é possível se houver diferenças físicas entre os componentes, dentre as quais estão: largura, espessura, comprimento, peso, forma, peso específico, textura superficial, cor, condutibilidade elétrica e afinidade por líquidos, sendo o peso e o tamanho as mais comumente utilizadas (PESKE; VILLELA; MENEGHELLO, 2019).

À medida que aumentou a abertura do soprador aumentou a velocidade terminal do fluxo de ar. Esta é afetada pela massa do objeto, aceleração da gravidade, densidade do fluido onde o objeto está caindo, área do objeto e coeficiente de atrito do objeto. Portanto, uma vez que há baixa variabilidade quanto à área das sementes de um mesmo lote, torna-se possível a separação de sementes de menor densidade, decorrente do processo deteriorativo ou de sua má formação. É o que foi verificado neste trabalho, porém com comportamento diferenciado entre matrizes, pelo fato de as sementes apresentarem características morfológicas distintas.

Neste estudo, o aumento da viabilidade foi associado ao aumento do fluxo de ar, ou seja, aberturas maiores, com maior fluxo de ar proporcionaram o aumento da qualidade do lote de sementes. O mesmo foi verificado por Faria *et al.* (2019) quando utilizaram seis aberturas (1, 2, 3, 4, 5 e 6) na limpeza de sementes de *Moquiniastrum polymorphum* (Less.) G. Sancho, e verificaram maior porcentagem de sementes cheias (100%) nas aberturas 5 e

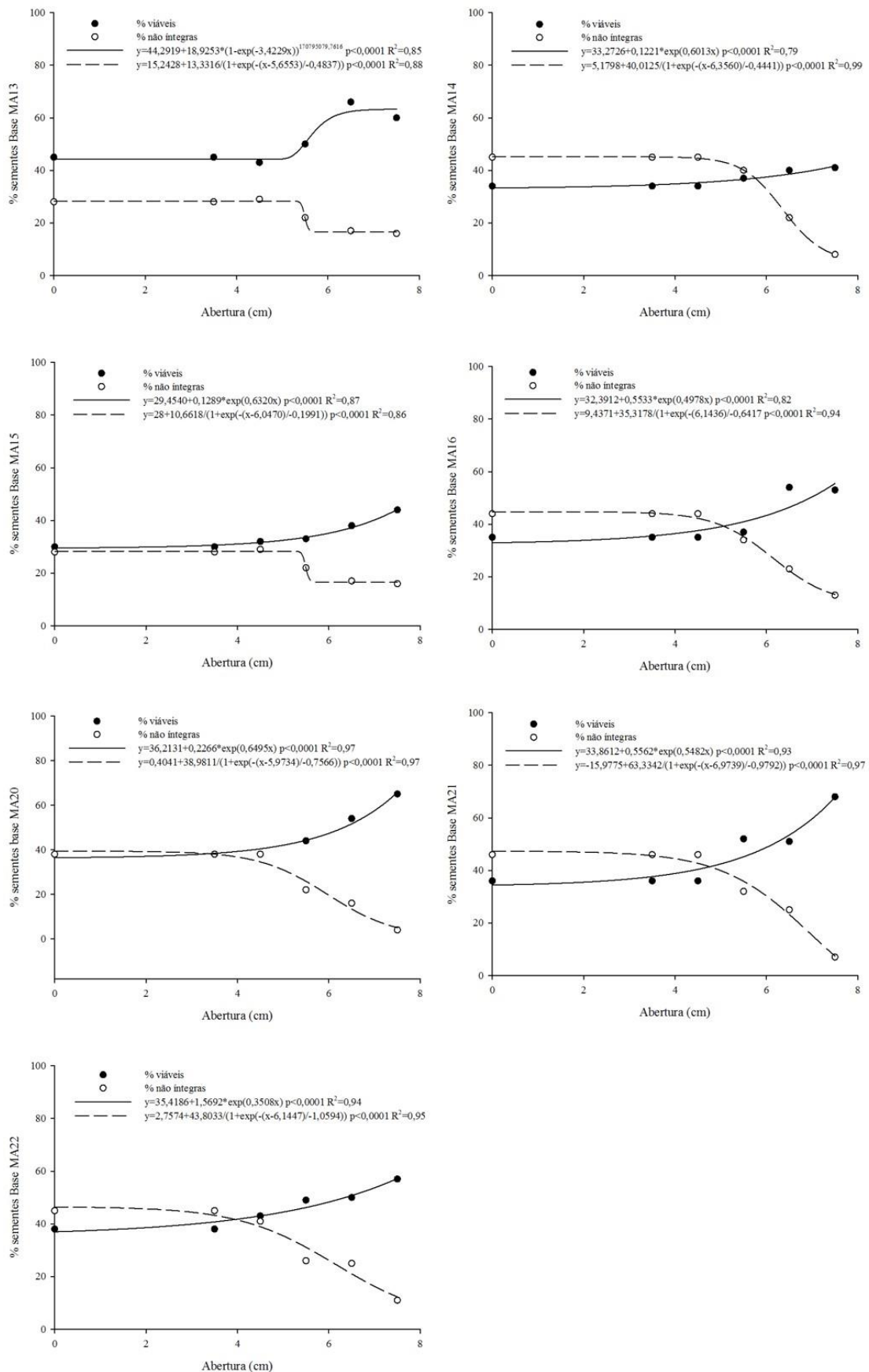
6. Por meio de testes de germinação estes mesmos autores confirmaram a eficiência no uso do soprador na separação de sementes vazias e malformadas, indicando um aumento na qualidade da amostra final da fração pesada.

O uso do soprador pode ser uma alternativa para aumentar a porcentagem de viabilidade de lotes de sementes florestais, caracterizados pela alta porcentagem de sementes vazias (PHARTYAL *et al.*, 2002) e, na maioria dos casos, com reduzida quantidade de sementes (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Em *Acer caesium* Wall. Ex. Brandis, o lote de sementes apresentava 36% de viabilidade antes da limpeza e, após passagem no soprador, aumentou para 67,5%. Assim, o soprador foi eficaz para melhorar a qualidade do lote, que antes da limpeza apresentava alta porcentagem de sementes vazias e conseqüentemente baixa viabilidade (PHARTYAL *et al.*, 2002).

Para a matriz MA14 foi verificado o menor incremento no percentual de sementes viáveis na base, de 34% para 41% na abertura 7,5, aumento de sete pontos percentuais e descarte de 20,9% do total de sementes viáveis. Esta foi seguida pela matriz MA15, que elevou em 14 pontos percentuais a viabilidade (30 para 44% e com 18% do total de sementes viáveis sopradas para a aleta (Figura 3).

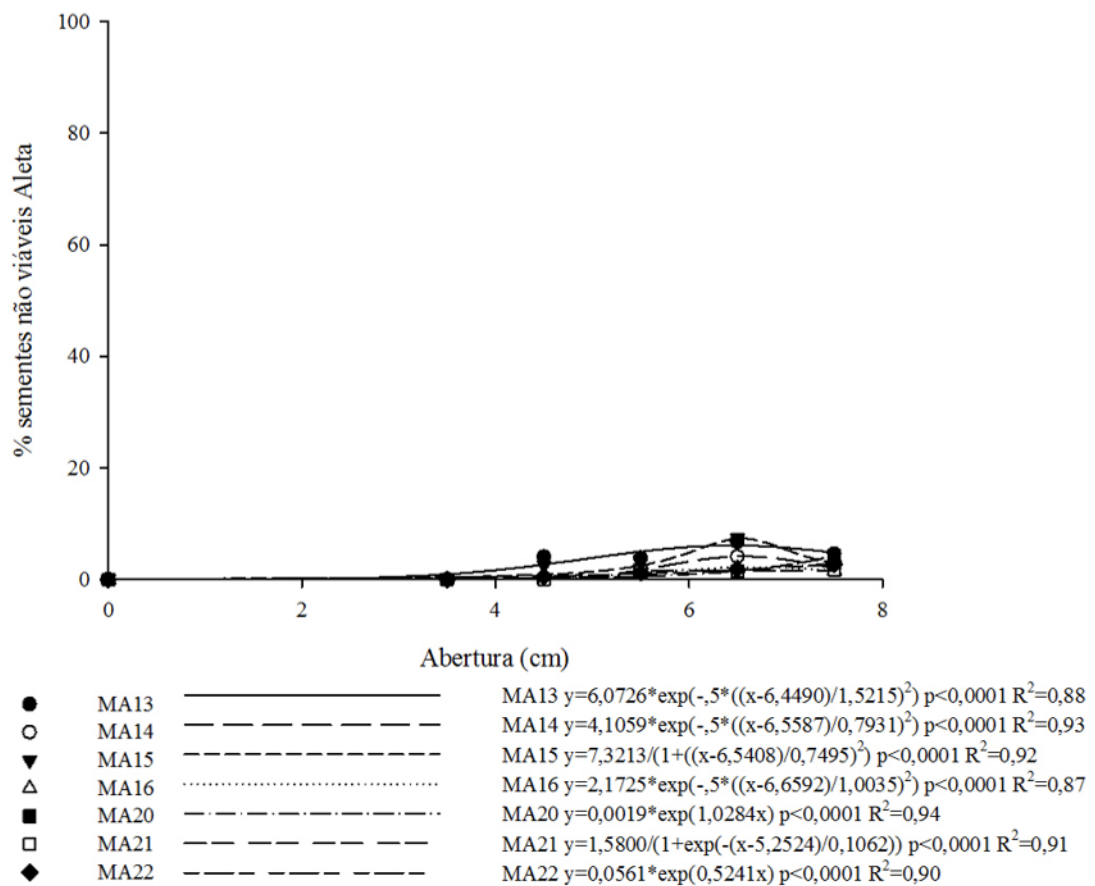
As matrizes MA16 e MA22 apresentaram aumento de 19 pontos percentuais, porém com 17,9% e 38,1% do total de sementes viáveis eliminadas na fração leve, respectivamente. As matrizes MA20 e MA21 apresentaram o maior aumento na porcentagem de sementes viáveis na base (27% e 32%), com 29,1% e 35,1% de sementes viáveis transferidas da base para a aleta do soprador, respectivamente. Para todas estas matrizes, a maior porcentagem de viáveis foi verificada após o tratamento com abertura 7,5. Já para a matriz MA13 o mesmo foi verificado com a abertura 6,5, apresentando 66% de viabilidade (Figura 3).

**Figura 3** - Porcentagem de sementes viáveis e não íntegras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) retidas na base, para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.



Para a porcentagem de sementes íntegras, mas não viáveis, este processo não foi muito eficiente, visto que, de forma geral, as sementes apresentam as mesmas características físicas (formato, cor e massa) das sementes viáveis. Dessa forma, não houve diferença entre as aberturas, não sendo possível ajustar uma equação. Na aleta, a proporção destas sementes teve um leve incremento à medida que aumentou a abertura até 6,5, com média de 3,5%, reduzindo para 2,8% na abertura 7,5 (Figura 4).

**Figura 4** - Porcentagem total de sementes não viáveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) retidas na aleta para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.



O peso de mil sementes de todas as matrizes apresentou aumento significativo na fração contida na base, à medida que aumentou a abertura, com exceção da matriz MA13 que apresentou maior PMS na abertura 6,5 (Figura 5A). Essa matriz apresentou maior velocidade terminal e maior quantidade de massa retida na abertura 6,5, quando comparado

com a abertura 7,5 (Anexo I). Isso pode ser explicado pelo fato dessa matriz apresentar os menores diásporos (Tabela 1), o que pode ter influenciando na distribuição da massa, quando exposta à fluxos de ar de maior velocidade.

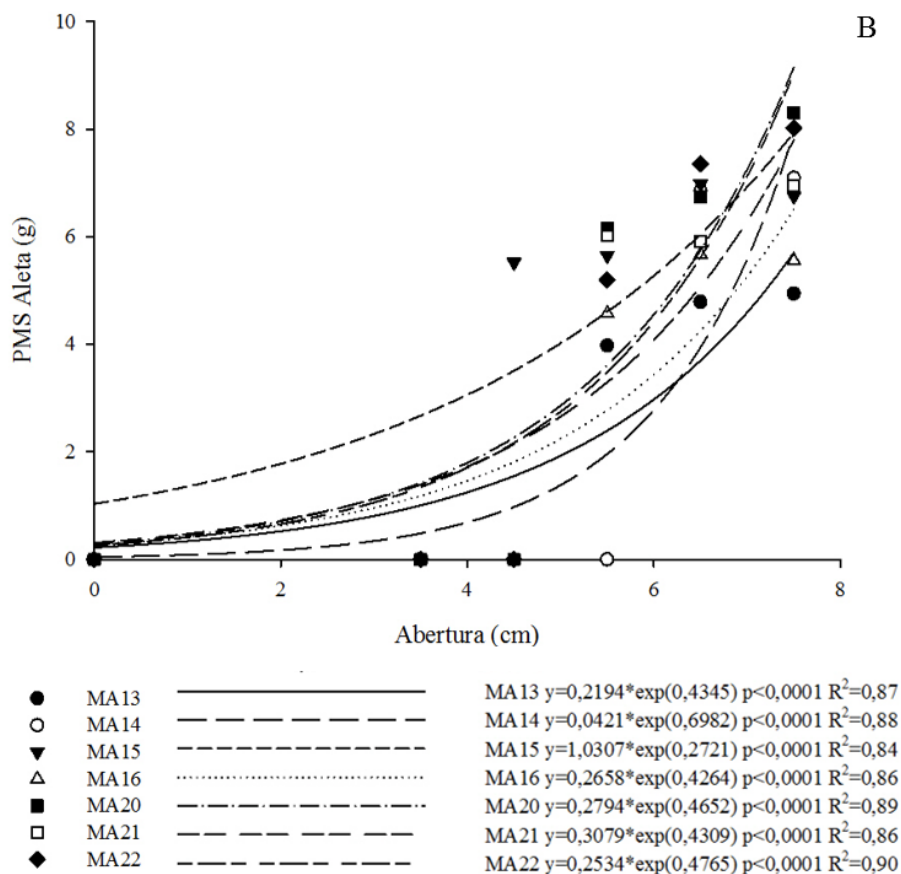
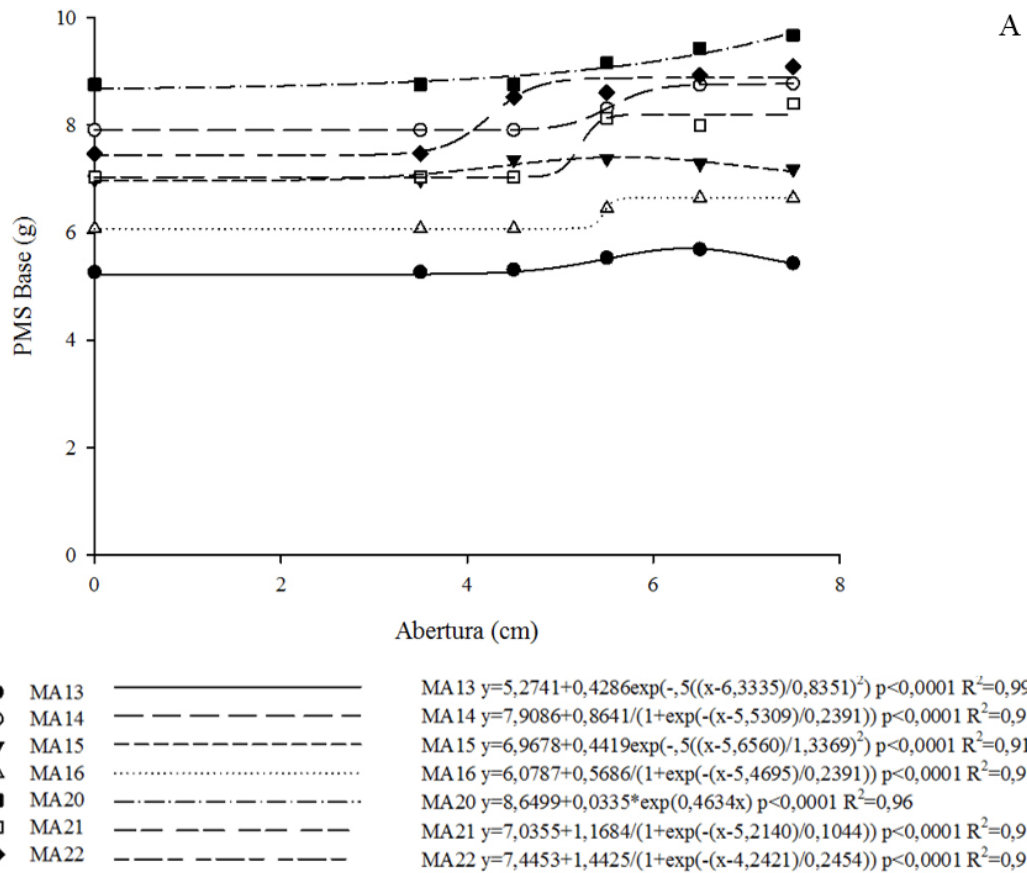
Para o PMS na aleta, observou-se aumento significativo, possivelmente porque nas aberturas inferiores (0, 3,5 e/ou 4,5) não foi verificada a presença de sementes (íntegras e viáveis) (Figura 5B). Porém, o PMS da fração pesada (da base) é superior ao PMS na fração leve (da aleta) para a mesma abertura e matriz. Esses resultados confirmam que a separação das sementes de erva-mate com soprador está diretamente relacionada à massa individual das mesmas.

Após o beneficiamento de sementes de *Tripsacum dactyloides* (L.) L. também foi verificado incremento no peso e na viabilidade das cariopses à medida que aumentou a abertura do soprador (FINNESETH; GENEVE, 2012). Tal relato confirma que o uso de soprador aumenta a qualidade do lote de sementes e disponibiliza sementes homogêneas com alto potencial fisiológico, garantindo melhor desempenho, por meio do crescimento e estabelecimento das mudas no campo (FARIA *et al.*, 2019).

Com o beneficiamento de sementes de *Eremanthus incanus* (Less.) em soprador, foi verificado incremento no número de sementes de maior tamanho, já que esta espécie apresenta baixa qualidade de sementes devido à formação de estruturas estéreis, o que contribuiu para melhorar a qualidade do lote (DAVIDE; TONETTI; SILVA, 2011).

Durante o beneficiamento de sementes, além do objetivo de retirar a maior porcentagem de impurezas do lote, é importante fazê-lo com o mínimo possível de perdas. Nenhum procedimento utilizando fluxo de ar é perfeito e absoluto, portanto, mesmo conseguindo definir um ponto de abertura ótimo, algumas sementes viáveis acabam sendo sopradas junto com as sementes vazias (GARAY; ELIAS; MEYER, 2009). Sendo assim, para definir o ponto de abertura ótimo é necessário levar em consideração qual o percentual de descarte aceitável para atingir determinada qualidade do lote de sementes.

**Figura 5** - Peso de mil sementes (PMS) (g) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) retidas na base e na aleta para diferentes aberturas (cm) do soprador e plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.



Para gramíneas forrageiras, o ponto ótimo de abertura é identificado no ponto de intersecção entre a porcentagem de sementes puras e impurezas. As cariopses vazias são facilmente eliminadas por esta técnica e incrementam a pureza do lote. Contudo, nem sempre é possível identificar o ponto exato de intersecção, como foi verificado para três diferentes lotes de sementes de *Festuca arundinaceae*, sendo que para dois lotes se encontrou o ponto de intersecção e no terceiro se determinou uma faixa adequada para a obtenção de um valor máximo de germinação (GARAY; ELIAS; MEYER, 2009).

Os lotes de sementes podem apresentar pesos específicos variáveis dependendo do ano de colheita, como consequência de fatores internos e externos que influenciam a formação das sementes. Isso faz com que a abertura do soprador seja ajustada de acordo com as características do lote para que se obtenha os melhores resultados na limpeza, ou que sejam adotadas faixas de abertura ideais que atendam a variabilidade de determinada espécie entre diferentes lotes e anos de colheita (GRZYBOWSKI *et al.*, 2019).

O uso do soprador no beneficiamento de sementes é um processo simples, prático e rápido, uma vez que a faixa de abertura ideal foi definida (GARAY; ELIAS; MEYER, 2009), sendo possível aumentar a viabilidade de um lote, com o incremento de sementes viáveis na fração pesada. Assim, do ponto de vista técnico, a velocidade média de  $100 \text{ km h}^{-1}$ , que neste trabalho corresponde às aberturas de 5,5 e 6,5 cm, as quais podem ser utilizadas no beneficiamento de sementes de erva-mate, aumentando a porcentagem de sementes viáveis na fração pesada, sem que ocorra um descarte em excesso na fração leve. Essa velocidade também promove a remoção de impurezas, o que diminui a quantidade de material que é colocado para estratificar e reduz a fonte de possíveis contaminações que contribuem para a degradação das sementes durante esse processo.

É provável que essa variabilidade seja consequência de as matrizes serem oriundas de diferentes ecótipos nativos. Não foram encontradas informações na literatura referentes



ao limite de perdas máximas na fração leve de sementes viáveis para a cultura da erva-mate. Na abertura 5,5 foi verificada uma perda média de 9,6% do total de sementes viáveis e na abertura 6,5 perdas de 17,9% do total de viáveis. Admite-se que perdas inferiores à 20% sejam aceitáveis, quando se considera o incremento da porcentagem de sementes viáveis na fração resultante do beneficiamento pelo aparelho. Porém, esta decisão depende do demandante, conforme disponibilidade de sementes. Atualmente, os pequenos viveiristas processam as sementes de forma artesanal, estando, por esta razão, sujeitos a variações na disponibilidade, uma vez que dispõem de um número reduzido de matrizes e dependem da produtividade destas em cada ano. No entanto, considerando a possibilidade de comercialização de sementes de erva-mate, oriundas de povoamentos de matrizes conduzidos para a produção de sementes, por exemplo, em que os lotes devem ter pureza e viabilidade padronizadas, considera-se que o método aqui testado pode auxiliar nesse processo.

O beneficiamento de sementes de erva-mate com soprador contribui para a redução de custos com manuseio de sementes na estratificação, semeadura e repicagem, além de otimizar recursos no viveiro com adubação e irrigação. Se levarmos em consideração o processo de produção de mudas de erva-mate, a obtenção de lotes de sementes com maior qualidade física e fisiológica pode contribuir para viabilizar a semeadura mecanizada.

### **CONCLUSÕES**

O uso do soprador aumenta a qualidade física e fisiológica das sementes de erva-mate ao promover a remoção de sementes não íntegras (vazias + degradadas). As aberturas de 5,5 e 6,5 cm, com velocidade terminal média de  $100 \text{ km h}^{-1}$  são indicadas para o beneficiamento de sementes de erva-mate, considerando a viabilidade e o PMS obtidos neste trabalho.

### **REFERÊNCIAS**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

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

CROGE, C. P.; CUQUEL, F. L.; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 5, p. 1-11, 2021.

DAVIDE, A. C.; TONETTI, O. A. O.; SILVA, E. A. A. da. Improvement to the physical quality and imbibition pattern in seeds of candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less.). **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 321-326, 2011.

FARIA, J. C. T. *et al.* Physical quality of seeds of *Moquiniastrum polymorphum*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 1, p. 63-69, 2019.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 254 p.

FINNESETH, C. H.; GENEVE, R. L. Physical enhancement improves seed-lot quality in eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*). **Acta Horticulturae**, v. 938, p. 69-75, 2012.

GALÍNDEZ, G. C. D. *et al.* Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2018.

GARAY, A.; ELIAS, S.; MEYER, D. J. L. Development of a uniform blowing procedure for grass seeds: principles, applications and benefits. **Ista News Bulletin**, n. 138, p. 26-32, 2009.

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

- GRZYBOWSKI, C. R. de S. *et al.* Processing and physical and physiological quality of the native forest seeds of *Vernonanthura discolor*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, e39574, 2019.
- MIRESKI, M. C. *et al.* Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1354-1362, 2019.
- PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. **Semente: fundamentos científicos e tecnológicos**. 4ª ed. Pelotas: Ed. Becker e Peske, 2019. 579 p.
- PHARTYAL, S. S. *et al.* Processing of seed to improve seed lot quality of rare and endangered tree species of Himalayan maple (*Acer caesium* Wall. Ex. Brandis) and elm (*Ulmus wallichiana* Planchon). **Seed Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 371-382, 2002.
- SOUZA, A. C. *et al.* Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. samples (Aquifoliaceae). **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 4, e20170960, 2020a.
- SOUZA, G. F. *et al.* Detection methods of fungi in *Ilex paraguariensis* seeds. **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 3, e20170983, 2020b.
- SOUZA, G. F. *et al.* Efeito da estratificação em substrato esterilizado na qualidade sanitária de sementes de *Ilex paraguariensis*, **Ciência Florestal**, v. 29, n. 2, p. 854-862, 2019.
- WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília: Embrapa, 2015. 195 p.

**Anexo I -** Velocidade (km h<sup>-1</sup>), porcentagem de sementes e impurezas retidas na base e aleta para as diferentes aberturas e matrizes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St-Hil),.

Matriz	Abertura (cm)	Velocidade (km/h)	Sementes Base (%)	Impurezas Base (%)	Sementes Aleta (%)	Impurezas Aleta (%)
MA13	0	0	90,9	9,1	0	0
MA13	3,5	86,9	90,9	4,2	0,0	4,9
MA13	4,5	95,8	85,4	2,2	5,5	6,9
MA13	5,5	96,6	72,4	0,0	18,5	9,1
MA13	6,5	103,0	44,8	0,0	46,1	9,1
MA13	7,5	68,7	60,3	0,0	30,6	9,1
MA14	0	0	86	14	0	0
MA14	3,5	85,3	86,0	1,5	0,0	12,5
MA14	4,5	97,8	86,0	1,4	0,0	12,6
MA14	5,5	101,5	83,2	0,0	2,8	14,0
MA14	6,5	104,9	63,4	0,0	22,6	14,0
MA14	7,5	101,7	43,1	0,0	42,9	14,0
MA15	0	0	85,8	14,2	0	0
MA15	3,5	82,7	85,8	1,5	0,0	12,7
MA15	4,5	99,3	73,5	0,2	12,3	14,0
MA15	5,5	102,8	65,1	0,2	20,7	14,0
MA15	6,5	80,5	63,7	0,0	22,1	14,2
MA15	7,5	71,3	50,1	0,0	35,7	14,2
MA16	0	0	85,1	14,9	0	0
MA16	3,5	91,7	85,1	4,5	0,0	10,4
MA16	4,5	90,9	85,1	4,3	0,0	10,6
MA16	5,5	98,7	74,6	0,0	10,5	14,9
MA16	6,5	102,2	52,2	0,0	32,9	14,9
MA16	7,5	86,7	36,7	0,0	48,4	14,9
MA20	0	0	84,1	15,9	0	0
MA20	3,5	90,4	84,1	1,5	0,0	14,4
MA20	4,5	98,2	84,1	0,9	0,0	15,0
MA20	5,5	102,2	69,9	0,0	14,2	15,9
MA20	6,5	99,0	50,7	0,0	33,4	15,9
MA20	7,5	103,0	36,5	0,0	47,6	15,9
MA21	0	0	86	14	0	0
MA21	3,5	90,0	86,0	0,4	0,0	13,6
MA21	4,5	100,6	86,0	0,7	0,0	13,3
MA21	5,5	102,5	73,1	0,0	12,9	14,0
MA21	6,5	106,5	72,1	0,0	13,9	14,0
MA21	7,5	105,9	47,3	0,0	38,7	14,0
MA22	0	0	86,3	13,7	0	0
MA22	3,5	91,7	86,3	3,5	0,0	10,2
MA22	4,5	99,1	76,3	3,1	10,0	10,6
MA22	5,5	99,5	74,5	0,0	11,8	13,7
MA22	6,5	109,4	47,8	0,0	38,5	13,7
MA22	7,5	104,6	24,5	0,0	61,8	13,7

## **4 CAPÍTULO 2**

### **Qualidade física e fisiológica de sementes de erva-mate\***

\*Artigo formatado conforme as normas da Revista Iheringia, Série Botânica.

**RESUMO** – O objetivo do estudo foi investigar a qualidade física e fisiológica das sementes de erva-mate de quatro matrizes e relacionar variáveis morfofisiológicas com a posição da copa em que os frutos foram coletados de uma planta-mãe. Foram avaliados: teor de água; peso de mil sementes; biometria (comprimento e espessura); avaliação da porcentagem de sementes vazias, predadas, deterioradas, com e sem embrião visível; e viabilidade por meio do teste de tetrazólio. Para as condições deste estudo, sementes coletadas de diferentes plantas matrizes apresentaram diferenças no teor de água, peso de mil sementes e na biometria. Possuem alta porcentagem de sementes danificadas, sendo a maioria deteriorada, com menor grau de vazias e predadas. Sementes coletadas em diferentes quadrantes não apresentam diferenças para o teor de água, peso de mil sementes, porcentagem de sementes vazias e embrião visível. No quadrante noroeste as sementes tiveram o menor comprimento e no quadrante nordeste maior espessura, menor porcentagem de deterioradas e maior presença de sementes sem embrião visível. No quadrante voltado para o sudeste apresentaram maior média de viabilidade.

**Palavras-chave:** Aquifoliaceae, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., peso de mil sementes, teste de tetrazólio, viabilidade.

**ABSTRACT** – **Physical and physiological quality of yerba mate seeds.** The study aimed to investigate the quality of yerba mate seeds from four mother plants and to relate morphophysiological variables with the position of the treetop in which the fruits were collected in a mother plant. The following were evaluated: water content; a thousand-seed weight; biometrics (length and thickness); evaluation of the percentage of empty, predated, deteriorated seeds, with and without visible embryo; and viability through the tetrazolium test. For the conditions of this study, seeds collected from different mother plants show differences in water content, a thousand-seed weight and in biometrics. They have a high percentage of not full seeds, most of which are deteriorated, and, to a lesser extent, empty and predated. Seeds collected in different quadrants do not show differences for water content, a thousand-seed weight, percentage of empty and visible embryo. In the northwest quadrant the seeds had the shortest length and in the northeast quadrant the greatest thickness, the lowest percentage of deteriorated seeds and the highest presence of seeds without visible embryo. In the quadrant facing southeast, they presented the highest mean of viability.

**Key-words:** Aquifoliaceae, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., a thousand-seed weight, tetrazolium test, viability.

## INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Aquifoliaceae) é uma espécie arbórea, conhecida popularmente como erva-mate. No Brasil, sua ocorrência é registrada nos estados da Bahia ao Rio Grande do Sul, na região nordeste da Argentina e em grande parte do Paraguai (Sobral *et al.* 2013). Sua cultura abrange vários setores da indústria e tem grande importância econômica, social, ambiental e cultural (Wendling & Santin 2015). Além disso, é um dos principais produtos florestais não madeireiros cultivados por agricultores familiares nos estados do sul do Brasil (Chechi & Schultz 2016).

As folhas de erva-mate são consumidas na forma tradicional de chimarrão, tererê e chás (Coelho *et al.* 2002), porém, diversos estudos buscam investigar outros potenciais para utilização da matéria-prima, como o desenvolvimento de cervejas, refrigerantes e energéticos. Além disso, a espécie apresenta propriedades farmacológicas, possibilitando a fabricação de medicamentos e cosméticos (Croge *et al.* 2021). Também possui propriedades alimentícias, podendo ser utilizada para alimentação humana, associada a farinhas, além de ração animal. Estudos também indicam potencial para utilização como pesticida no controle de pragas (caramujo-maçã - *Pomaceae caniculata* Lamarck, 1822) da cultura do arroz irrigado (Brito *et al.* 2018) e na redução da incidência da podridão parda (*Monilinia fructicola* (Winter) Honey) na conservação pós-colheita de pêssegos (cv. Della Nona) (Sapelli *et al.* 2020).

*I. paraguariensis* é uma espécie dioica (Ferreira *et al.* 1983) e apresenta elevada heterogeneidade na floração e frutificação, podendo ser observados vários estágios fenológicos no mesmo período (Zanon 1988, Pires *et al.* 2014). Essa variabilidade também é vista em diferentes pontos da copa das árvores, inclusive no mesmo ramo. Dependendo da posição do ramo, podem ocorrer diferentes respostas relacionadas ao seu desenvolvimento, pois os índices de radiação e luminosidade diferem na copa da árvore. Essa situação reflete no comportamento diferenciado das fases fenológicas de uma planta (Rocha *et al.* 1990) e pode afetar atributos físicos e fisiológicos das sementes produzidas.

A baixa qualidade fisiológica e genética das plantas-mãe podem comprometer a produção de sementes com características desejáveis (Fowler *et al.* 2007). A falta de parâmetros ou critérios subjetivos para a seleção das plantas matrizes afeta negativamente as características da erva-mate comercial delas obtida (Wendling 2004). Assim, a escolha

de matrizes com maior potencial para produção de biomassa como atributo desejável deve considerar a qualidade das sementes. Para muitas espécies cultivadas é possível relacionar características morfológicas e fisiológicas dos diásporos com a viabilidade, vigor e a conservação. Esses atributos refletem no desempenho das mudas no viveiro e nas plantas a campo e, conseqüentemente no produto final.

A unidade de dispersão da espécie é um pirênio, que é formado por endocarpo lenhoso e semente, esta última constituída por tegumento, endosperma e embrião (Heuser *et al.* 1993). Os pirênios têm dormência morfofisiológica (Cuquel *et al.* 1994, Medeiros 1998, Wendling 2004, Dolce *et al.* 2010, Galíndez *et al.* 2018), sendo esta considerada a principal causa da baixa porcentagem de germinação da espécie. Contudo, estudos indicam que diferentes lotes de sementes de erva-mate apresentam alta porcentagem de sementes vazias e deterioradas, o que implica em baixa viabilidade inicial do lote de sementes de erva-mate (Duboc & França 2016, Souza *et al.* 2020).

A avaliação das sementes considerando atributos físicos e fisiológicos como: pureza física, umidade, danos mecânicos, peso, tamanho, germinação e vigor (Barbedo & Santos Junior 2018) é de extrema importância, pois tem relação direta com as taxas de germinação. E para espécies com dormência, germinação lenta e desuniforme (Brasil 2009), como a erva-mate (Cuquel *et al.* 1994) as Regras para Análises de Sementes (RAS) indicam a utilização de testes rápidos, como o teste de tetrazólio. Através deste teste é possível determinar rapidamente a viabilidade de um lote de sementes (Brasil 2009).

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo investigar a qualidade física e fisiológica das sementes de erva-mate de quatro matrizes; relacionar variáveis morfofisiológicas com a posição da copa em que os frutos foram coletados de uma planta-mãe.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Localização das plantas matrizes

Foram utilizadas sementes (termo adotado ao longo do presente trabalho em substituição à unidade de dispersão da espécie que é o pirênio, constituído por endocarpo e semente) de erva-mate provenientes de dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil: Arvorezinha (28° 50' 56" S 52° 14' 14" W) – com temperatura média de 16,9 °C e pluviosidade anual média de 1704 mm, e Ilópolis (28° 53' 25" S 52° 08' 46" W) - com temperatura média de 17,1 °C, e pluviosidade anual média de 1689 mm. Ambos municípios



apresentam clima Cfb (clima temperado úmido com verão temperado), segundo a classificação de Köppen e Geiger (Climate 2020).

### **Coleta dos frutos e limpeza das sementes**

#### **a) Frutos oriundos de quatro plantas matrizes**

Em fevereiro de 2019, frutos maduros dispersos naturalmente (abscisados) foram coletados sobre lonas plásticas posicionadas sob a projeção da copa das plantas matrizes antes de iniciar a maturação dos frutos. As plantas matrizes foram identificadas como matriz A, B e D, coletadas em Ilópolis e matriz C, em Arvorezinha.

#### **b) Frutos obtidos de diferentes quadrantes de uma planta matriz**

Em uma planta matriz localizada na Estação Florestal Experimental do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis (Parque do Ibama), Ilópolis – RS (28° 55' 57.688" S 52° 7' 54.026" W), foi demarcada a porção da copa posicionada a cada quadrante geográfico: nordeste (NE), noroeste (NO), sudoeste (SO) e sudeste (SE), de acordo com a identificação dos quatro pontos cardeais com auxílio de uma bússola digital.

Em cada porção da copa, correspondente a cada quadrante (NE, NO, SO, SE), foram selecionados cinco ramos apicais ao acaso, localizados na parte superior, mediana e inferior da copa da planta. Estes ramos, medindo aproximadamente 30 cm de comprimento, foram envoltos com tecido *voal* quando os frutos ainda apresentavam coloração verde (início de fevereiro de 2019), em torno de 30 dias após a antese. O quadrante 1 (NE) teve a demarcação e proteção dos ramos 1 a 5, no quadrante 2 (NO) foram ensacados e identificados os ramos 6 a 10, no quadrante 3 (SO) foram os ramos 11 a 15, e no quadrante 4 (SE), os ramos 16 a 20.

Os frutos foram coletados em abril de 2019, quando apresentavam coloração violeta a roxo-escuro, sendo considerados maduros. Os frutos de cada ramo foram coletados separadamente e mantidos em embalagem devidamente identificada.

### **Limpeza e secagem das sementes**

Para os dois experimentos, os frutos foram levados ao laboratório, macerados e lavados com auxílio de peneira sob água corrente. Posteriormente, as sementes permaneceram secando sobre papel toalha em bancada durante três dias, quando foram acondicionadas em vidros tipo *snap cap* com tampa plástica, com capacidade de 100 mL, devidamente identificados e armazenados em câmara fria sob temperatura constante de  $5 \pm 2$  °C durante dois meses até o início das análises.

### **Caracterização das sementes**

- Teor de água (TA): foi determinado pelo método da diferença percentual de massa após secagem em estufa a  $105 \pm 5$  °C por 24 horas (Brasil 2009). Para cada planta matriz e quadrante foram utilizadas três amostras de aproximadamente 0,5 g, retiradas ao acaso.

- Peso de mil sementes (PMS): conforme metodologia descrita nas Regras de Análises de Sementes (RAS) (Brasil 2009), três repetições de oito amostras de 100 sementes para cada matriz e quadrante, retiradas ao acaso foram pesadas em balança analítica (0,0001 g). A seguir foi aplicada a equação:

$$\text{Peso de mil sementes (PMS)(g)} = \frac{\text{peso da amostra (g)} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes}}$$

Para todos os estudos realizados, o valor final do PMS (g) foi corrigido considerando o teor médio de umidade das sementes para todas as amostras.

- Caracterização biométrica: com auxílio de paquímetro digital (0,01 mm) foram medidos o comprimento (C) e a espessura (E) (mm) das sementes. Para cada planta matriz e quadrante foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, retiradas ao acaso.

- Avaliação da integridade das sementes de erva-mate: foram retiradas ao acaso quatro repetições de 50 sementes para cada matriz e quadrante. Inicialmente as sementes foram imersas em água ultrapurificada a 30 °C por 24 horas para facilitar o corte (Catapan 1998). Em seguida foi realizado o corte longitudinal com auxílio de pinça e bisturi. As sementes foram analisadas visualmente com auxílio de microscópio estereoscópico Leica EZ4 HD, com aumento de 20 a 30 vezes. Nessa avaliação, as sementes foram classificadas em não íntegras, composta por: sementes vazias, caracterizadas pela ausência de embrião e de endosperma ou por conter menos de 50% dos tecidos (Barbedo & Santos Júnior 2018); predadas, com presença do inseto ou sinais de predação; e deterioradas, caracterizadas pela presença de endosperma e embrião necrosados ou com tecido gelatinoso (Souza 2018); e íntegras quando verificada a presença de endosperma íntegro, com ou sem embrião visível. Os valores foram tabelados e transformados em porcentagem.

- Determinação de viabilidade pela análise com sal de tetrazólio: as sementes classificadas como íntegras na avaliação anterior foram submetidas à solução de 0,1% de tetrazólio por 24 horas a 35 °C (Catapan 1998). Em seguida, foi realizada tríplice lavagem com água ultrapurificada, e, posteriormente, sucedeu-se a avaliação visual das sementes para determinar a viabilidade. As sementes foram avaliadas quanto à reação à solução, sendo consideradas viáveis as que apresentaram endosperma firme e colorido, com embrião visível,

sem danos e com consistência firme. Todas as sementes que não apresentaram estas características foram classificadas como não viáveis (Brasil 2009).

### Análise estatística

Em todas as análises, o delineamento foi inteiramente casualizado. Os dados de teor de água, PMS, biometria (C e E), porcentagem de sementes vazias, predadas, deterioradas, sementes com embrião visível, sem embrião visível e sementes viáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA), após as médias foram comparadas pelo teste de LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro, pelo programa estatístico Costat. Na caracterização de sementes de erva-mate de uma planta matriz, de acordo com a distribuição pelos quadrantes, os dados de biometria (C e E) e porcentagem de predadas não apresentaram normalidade mesmo após as transformações e foram analisados pela ANOVA não paramétrica, utilizando o teste Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS

### a) Características das sementes oriundas de quatro plantas matrizes

Na Tabela 1 pode-se observar que existe diferença estatística entre as variáveis analisadas. Com relação ao teor de água, as matrizes apresentaram média geral de 8%, a matriz B apresentou o menor valor (7,4%) diferindo estatisticamente das demais. Para o PMS, a matriz D apresentou o maior valor (8,05 g), já a matriz B teve o menor valor (5,03 g) e as matrizes A e C não diferiram entre si e apresentaram valores intermediários (5,80 g e 6,07 g, respectivamente).

**Tabela 1.** Teor de água (TA) (%), peso de mil sementes (PMS) (g), comprimento (C) (mm) e espessura (E) (mm) de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.

Matriz	Município	TA (%)	PMS (g)	C (mm)	E (mm)
Matriz A	Ilópolis	8,2 a	5,80 b	3,65 a	1,84 b
Matriz B	Ilópolis	7,4 b	5,03 c	3,31 c	1,78 b
Matriz C	Arvorezinha	8,2 a	6,07 b	3,52 b	1,78 b
Matriz D	Ilópolis	8,3 a	8,05 a	3,70 a	2,01 a
Média		8,0	6,2	3,5	1,9
CV (%)		1,4	2,8	1,6	2,6
p-valor		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro; CV = coeficiente de variação.

Quanto à biometria das sementes, as matrizes A e D não diferiram entre si e apresentaram o maior valor para comprimento e a matriz B teve o menor valor (3,31 mm). A matriz D teve a maior espessura (2,01 mm), e as demais não diferiram entre si (Tab. 1).

Na Tabela 2 aparecem os dados da avaliação da integridade das sementes, onde é possível verificar que não houve diferença estatística para as variáveis porcentagem de sementes vazias e porcentagem de sementes com embrião não visível, com média de 14,3% e 12,3%, respectivamente. A menor porcentagem de sementes predadas (1,5%) foi verificada na matriz C e as demais não diferiram entre si. Quanto a presença de embrião visível, as matrizes C e D apresentaram os maiores valores (33% e 27%, respectivamente) e as matrizes A e B os menores valores (11% e 15,5%, respectivamente).

Para a viabilidade pelo teste de tetrazólio (Tab. 2), as matrizes C e D apresentaram a maior porcentagem de sementes viáveis (54,5% e 59,3% respectivamente) e as matrizes A e B a menor taxa de viabilidade (36,5% e 39,8% respectivamente).

**Tabela 2.** Avaliação da integridade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) por meio do teste de tetrazólio oriundas de diferentes plantas matrizes. Não íntegras – vazias (%), predadas (%) e deterioradas (%); e íntegras – com embrião visível (%) e sem embrião visível (%); e viabilidade (%), Rio Grande do Sul, Brasil.

Matriz	Não Íntegras			Íntegras		Teste Tetrazólio
	% Vazias	% Predadas	% Deterioradas	% Embrião Visível	% Embrião Não Visível	% Viáveis
Matriz A	15 <sup>ns</sup>	10 a	53,5 a	11 b	10,5 <sup>ns</sup>	36,5 b
Matriz B	14	9 a	49 a	15,5 b	12,5	39,8 b
Matriz C	16,5	1,5 b	34,5 b	33 a	14,5	54,5 a
Matriz D	11,5	10 a	40 b	27 a	11,5	59,3 a
Média	14,3	7,6	44,3	21,6	12,3	47,5
CV (%)	20,9	33,6	11,7	22,9	32,3	15,2
p-valor	2,1678	<0,001	<0,001	<0,001	0,5459	0,0017

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro; CV = coeficiente de variação; ns = não significativo.

#### **b) Caracterização de sementes de erva-mate obtidas de diferentes quadrantes de uma planta matriz**

O teor de água (TA) e o PMS apresentaram valores médios de 9,9% e 5,8 g, respectivamente e não diferiram entre os diferentes quadrantes. O quadrante dois (NO) apresentou sementes com o menor comprimento (C) (3,29 mm) e os demais não diferiram entre si. Para a espessura (E) o quadrante quatro (SE) teve o menor valor (1,88 mm) e o

quadrante um (NE) o maior valor (2,22 mm). Os quadrantes dois (NO) e três (SO) não diferiram entre si e apresentaram valores intermediários (Tab. 3).

**Tabela 3.** Teor de água (TA) (%), peso de mil sementes (PMS) (g), comprimento (C) (mm) e espessura (E) (mm) de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) oriundas de ramos localizados em diferentes quadrantes da planta matriz, Ilópolis, Rio Grande do Sul, Brasil.

Quadrante	TA (%)	PMS (g)	C (mm)	E (mm)
Quadrante 1 – nordeste (NE)	9,8 <sup>ns</sup>	5,97 <sup>ns</sup>	3,38 a	2,22 a
Quadrante 2 – noroeste (NO)	9,9	5,78	3,29 b	2,00 b
Quadrante 3 – sudoeste (SO)	9,9	5,63	3,34 a	1,99 b
Quadrante 4 – sudeste (SE)	10,1	5,83	3,34 a	1,88 c
Média	9,9	5,8	3,4	2,1
CV (%)	2,1	2,1	*	*
p valor	0,4139	0,513	0,012	0,0001

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de LSD-Fisher à 5% de probabilidade de erro; \*Kruskal-Wallis à 5% de probabilidade de erro; CV = coeficiente de variação; ns = não significativo.

**Tabela 4.** Porcentagem de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) oriundas de ramos localizados em diferentes quadrantes de planta matriz, Ilópolis, Rio Grande do Sul, Brasil, classificadas como: não íntegras (vazias, predadas, deterioradas) e íntegras (com embrião visível e sem embrião visível); e viáveis pelo teste de tetrazólio.

	% Não íntegras			% Íntegras		Teste Tetrazólio
	% Vazias	% Predadas	% Deterioradas	% Embrião visível	% Embrião não visível	% Viáveis
Quadrante 1 – nordeste (NE)	9,6 <sup>ns</sup>	1,1 bc	23,4 b	49,6 <sup>ns</sup>	16,3 a	51,2 c
Quadrante 2 – noroeste (NO)	8,9	0,3 a	41,4 a	41,2	8,2 b	57,1 ab
Quadrante 3 – sudoeste (SO)	8,8	0,4 ab	35,9 a	45,5	9,4 b	52,6 bc
Quadrante 4 – sudeste (SE)	9,9	1,2 c	38,3 a	41,9	8,7 b	61,5 a
Média Geral	9,3	0,8	34,6	44,6	10,7	55,6
CV (%)	37,7	*	30,1	22,3	43,7	13,7
p-valor	0,59	0,0054	<0,001	0,13	<0,001	<0,001

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD-Fisher à 5% de probabilidade de erro; \*Kruskal-Wallis à 5% de probabilidade de erro; CV = coeficiente de variação; ns = não significativo.

A porcentagem média de sementes vazias foi 9,3% e de embrião visível foi 44,6%, sem diferença estatística entre os quadrantes. O quadrante um (NE) apresentou a menor porcentagem de sementes deterioradas (23,4%) e a maior quantidade de sementes sem

embrião visível (16,3%), para esta duas variáveis os demais quadrantes não diferiram entre si. O quadrante quatro (SE) teve a maior porcentagem de sementes predadas (1,2%), porém sem diferença com o quadrante um (NE) (1,1%). O quadrante dois (NO) teve a menor porcentagem de sementes predadas (0,3%), mas não diferiu do quadrante três (SO) (0,4%). Com relação à viabilidade, o quadrante um (NE) apresentou a menor porcentagem de sementes viáveis (51,2%), mas não diferiu do quadrante três (SO) (52,6%), já no quadrante quatro (SE) se observou maior viabilidade (61,5%), o qual não diferiu do quadrante dois (NO) (57,1%) e este não teve diferença com o quadrante três (Tab. 4).

## DISCUSSÃO

O teor de água expressa a quantidade de água livre presente nas sementes. Esta variável define o ponto de colheita da maioria das espécies e está intimamente relacionada com a atividade metabólica da semente, influenciando os processos de deterioração e germinação (Barbedo & Santos Junior 2018). Souza (2018) verificou variação de 6,9 a 12,2% no teor de água de lotes de sementes de erva-mate coletadas em quatro municípios de Santa Catarina e um no Rio Grande do Sul. Duboc & França (2016), avaliando sete lotes oriundos de três municípios de Mato Grosso do Sul, observaram variabilidade entre 9,96 e 11,48% para esta variável. Estes resultados corroboram com os do presente estudo, que apresentou valores similares (Tab. 1), confirmando que esta é uma característica que varia muito, provavelmente em razão das diferentes condições ambientais em que as plantas matrizes ocorrem.

O peso de mil sementes é utilizado para calcular a quantidade de sementes de um lote. As sementes vazias e malformadas apresentam um peso inferior quando comparadas com um lote que apresenta sementes bem formadas (Marcos-Filho 2015). Para diásporos com formato irregular, como são os da erva-mate, o peso de mil sementes está relacionado como tamanho das sementes e pode ser usado para comparar diferentes lotes (Barbedo & Santos Junior 2018). Poucos trabalhos analisaram o PMS de sementes de erva-mate, mas Duboc & França (2016) verificaram que esta variável variou entre 2,78 e 6,49 g para diferentes lotes oriundos de Mato Grosso do Sul. Já no presente estudo, a variação foi menor (5,03 a 8,05 g), com média de 6,2 g próximo da média observada por Meneguetti *et al.* (2004) que foi de 6,69 g para sementes coletadas em Grarapuava, PR. Fatores bióticos e abióticos ocorridos antes e durante a maturidade fisiológica das sementes podem reduzir a massa seca e, conseqüentemente, o peso de mil sementes, além de afetar a viabilidade e a qualidade visual.

A biometria está relacionada ao tamanho das sementes e é uma característica complementar na análise dos diferentes caracteres utilizados para a identificação de plantas (Araújo *et al.* 2015). O tamanho e o peso das sementes são testes físicos usados para a caracterização destas e podem ser associados com o vigor (Kryzanowski & França-Neto 2001). Em algumas espécies, as sementes podem apresentar diferenças relacionadas ao tamanho, forma e cor, ocasionado por condições ambientais em que os diásporos estão expostos durante a fase de desenvolvimento. Vários fatores ambientais exercem influência sobre estes caracteres, como temperatura, luz e disponibilidade de nutrientes, principalmente durante a formação e desenvolvimento dos diásporos (Baskin & Baskin 2014). Estas condições contribuem para a variabilidade no tamanho das sementes entre matrizes e nos diferentes quadrantes de uma mesma planta, conforme observado neste trabalho. Duboc & França (2016) também observaram diferentes tamanhos de sementes de erva-mate em lotes distintos.

A presença de sementes vazias foi verificada em lotes de sementes de *I. paraguariensis* por diversos autores (Niklas 1987, Zanon 1988, Catapan 1998, Duboc & França 2016, Souza *et al.* 2020). No presente estudo houve variação para esta variável entre as matrizes (Tab. 2), porém sem diferenças entre os quadrantes de uma mesma planta (Tab. 4). Em *I. paraguariensis* a polinização é predominantemente entomófila, sendo que a abertura floral ocorre de outubro a novembro (Ferreira *et al.* 1983, Pires *et al.* 2014), com maior intensidade no mês de novembro. Em dias chuvosos e nublados, as anteras ficam fechadas e a polinização pelos insetos é interrompida durante as precipitações, o que pode ser agravado em locais com temperaturas baixas durante o período de polinização, em função da redução da atividade dos polinizadores (Pires *et al.* 2014, Souza *et al.* 2020). Além disso, altitudes maiores favorecem o aumento da quantidade de sementes vazias (Souza *et al.* 2020). Fatores ambientais podem causar danos mais severos em espécies com polinização cruzada do que em autógamias, pois o pólen precisa percorrer distâncias maiores para encontrar o estigma viável (Peske *et al.* 2019).

Devido à assincronia nos eventos reprodutivos de *I. paraguariensis*, a polinização controlada aumenta a quantidade de frutos e sementes quando comparada à polinização livre (Sousa *et al.* 2015). Esta pode ser uma alternativa para aumentar a quantidade de diásporos produzidos em matrizes selecionadas que produzem mudas de alta qualidade por ser uma técnica laboriosa. Sementes predadas foram observadas em espécies do gênero *Ilex* (Takagi & Togashi 2003) e em *I. paraguariensis* foi identificado um micro himenóptero da família Torymidae (Souza *et al.* 2020) que pode provocar altos índices de sementes danificadas, podendo chegar a valores próximos de 50% (Zanon 1988). As larvas desse inseto se

alimentam do endosperma e do embrião da semente e saem por um orifício facilmente identificado no endocarpo (Souza *et al.* 2020).

A quantidade de sementes predadas é variável entre lotes, podendo alguns não apresentar diásporos predados (Souza *et al.* 2020), variação que também foi observada neste estudo (Tab. 2). Entre os diferentes quadrantes também foi observada variação, porém com menor amplitude nos valores (0,3 a 1,2%) (Tab. 4).

O processo de deterioração das sementes é irreversível, com variações em sementes de um mesmo lote, ocorrendo de forma gradativa após o ponto de maturidade fisiológica (Peske *et al.* 2019). É causada por alterações fisiológicas e bioquímicas que são influenciadas pelo ambiente em que estão expostas. Dentre estes fatores, temperatura e umidade relativa do ar são os que exercem maior influência (Kryzanowski & França-Neto 2001). Quando ocorrem condições ambientais adversas, principalmente alterações da temperatura e umidade relativas do ar, ocorre a desnaturação proteica que causa a inativação e perda da função biológica (Marcos-Filho 2015). Após a maturidade fisiológica das sementes, fatores bióticos e abióticos em que as sementes estão expostas retardam ou aceleram a degradação (Peske *et al.* 2019).

A presença de sementes deterioradas pode estar relacionada à maturação heterogênea dos frutos (Zanon 1988), já que os primeiros frutos a completarem o ciclo ficam mais tempo expostos a situações de amplitude térmica e de umidade, favorecendo o aumento de sementes deterioradas. Além disso, sementes com teores de água maiores podem sofrer maior deterioração, pois a respiração é mais intensa, implicando na maior degradação das reservas (Carvalho & Nakagawa 2012). Assim como estresses bióticos e abióticos que ocorrem após a maturidade fisiológica agem sobre a perda de viabilidade (Peske *et al.* 2019).

Pelo fato de o quadrante sudeste estar voltado para a face sul, acaba recebendo menor radiação. Assim, espécies clímax, como é o caso da erva-mate, estão ambientalmente mais adaptadas às condições de sombreamento, tendo a habilidade de se desenvolver em condições de pouca luz (Poletto *et al.*, 2010). O que pode explicar o fato do quadrante quatro (SE) apresentar maior porcentagem de sementes viáveis. Contudo, mais estudos como estes devem ser realizados para tentar entender o comportamento da espécie com relação à qualidade das sementes produzidas.

Para as condições deste estudo, sementes coletadas de diferentes plantas matrizes apresentam diferenças no tamanho, teor de água e peso de mil sementes. Apresentam alta porcentagem de sementes não íntegras, sendo a maioria deteriorada e, em menor grau, vazias e predadas. Sementes coletadas em diferentes quadrantes não apresentam diferenças para o teor de água, peso de mil sementes, porcentagem de sementes vazias e embrião visível. No



quadrante noroeste as sementes tiveram o menor comprimento e no quadrante nordeste maior espessura, menor porcentagem de deterioradas e maior presença de sementes sem embrião visível. No quadrante voltado para o sudeste apresentaram maior média de viabilidade.

## REFERÊNCIAS

- Araújo, B.A., Silva, M.C.B., Moreira, F.J.C., Silva, K.F. & Tavares, M.K.N. 2015. Caracterização biométrica de frutos e sementes, química e rendimento de polpa de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.). *Agropecuária Científica no Semi-Árido* 11(2):15-21.
- Barbedo, C.J. & Santos Junior, N.A. dos. 2018. Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira. Instituto de Botânica, São Paulo. 208 p.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. 2. ed. Elsevier, San Diego. 1586 p.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. MAPA/ACS, Brasília. 395 p.
- Brito, F.C. de, Gosmann, G. & Oliveira, G.T. 2018. Extracts of the unripe fruit of *Ilex paraguariensis* as a potential chemical control against the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Ampullariidae). *Natural Product Research* 33(16):2379-2382.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J. 2012. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5 ed. FUNEP, Jaboticabal. 590 p.
- Catapan, M.I.S. 1998. Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Dissertação 109 f., Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Cechi, L.A. & Schultz, G.A. 2016. Produção de Erva-Mate: um Estudo da Dinâmica Produtiva nos Estados do Sul do Brasil. *Enciclopédia Biosfera* 13(23):16-26.
- Climate. 2020. Dados climáticos para cidades mundiais. Disponível em: <http://pt.climate-data.org/>. Acessado em: 24.06.2021.
- Coelho, G.C., Mariath, J.E. de A. & Schenkel, E.P. 2002. Populational diversity on leaf morphology of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45:47-51.
- Croge, C.P., Cuquel, F.L. & Pinto, P.T.M. 2021. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. *Scientia Agricola* 78(5):1-11.
- Cuquel, F.L., Carvalho, M.L.M. de & Chamma, H.M.C.P. 1994. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. *Scientia Agricola* 51(3):415-421.
- Dolce, N.R., Mroginski, L.A. & Rey, H.Y. 2010. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St. -HiL. (Aquifoliaceae) seed germination. *Seed Science and Technology* 38:441-448.

- Duboc, E. & França, R.S.S.R de. 2016. Resultados preliminares sobre a qualidade de sementes de erva-mate coletados no estado de Mato Grosso do Sul em 2015. *Cadernos Agroecológicos* 11:1-10.
- Ferreira, A.G., Kaspary, R., Ferreira, H.B. & Rosa, L.M. 1983. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hill. *Brasil Florestal* (53):29-33.
- Fowler, J.A.P., Sturion, J.A. & Zuffellato-Ribas, K.C. 2007. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. *Pesquisa Florestal Brasileira* (54):105-108.
- Galíndez, G., Ceccato, D., Bubbillo, R., Lindow-López, L., Malagrina, G., Ortega-Baes, P. & Baskin, C.C. 2018. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. *Seed Science Research* 28(2):131-139.
- Heuser, E.D., Ferreira, A.G. & Mariath, J.E. de A. 1993. *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 29(1-2):39-48.
- Krzyzanowski, F.C. & França Neto, J.B. 2001. Vigor de sementes. *Informativo ABRATES* 11(3):81-84.
- Marcos-Filho, J. 2015. *Fisiologia de Plantas Cultivadas*. ABRATES, Londrina. 660 p.
- Medeiros, A.C. de S. 1998. *Dormência em Sementes de Erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)*. Embrapa CNPF, Colombo. 25 p.
- Meneguetti, J.C.B., Nobrega, L.H.P., Smanhotto, A., Silveira, J.K.M. da. 2004. Superação da dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por estratificação. *Revista Varia Scientia* 04(08):157-182.
- Niklas, C.O. 1987. Estudios embriológicos y citológicos em la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Bonplandia* 6(1):45-56.
- Peske, S.T., Villela, F.A. & Meneghello, G.E. 2019. *Semente: fundamentos científicos e tecnológicos*. 4ª ed. Ed. Becker e Peske, Pelotas. 579 p.
- Pires, E.Z., Stedille, L.I.B., Machado, S., Mantovani, A. & Bortoluzzi, R.L. da C. 2014. Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 13(2):171-180.
- Poletto, I., Muniz, M.F.B., Ceconi, D.E., Mezzomo, R., Rodrigues, J. 2010. Influência da inoculação de *Fusarium* sp. e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva-mate. *Ciência Florestal* 20(3):513-521.
- Rocha, A.C., Tavares, E.D., Sandrini, M., Paiva, R. & Carvalho, S.A. 1990. Época e intensidade de florescimento e pegamento de frutos segundo a distribuição pelos quadrantes em Laranjeiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 25(6):85-88.

- Sapelli, K.S., Faria, C.M.D.R., Botelho, R.V. 2020 Conservação pós-colheita de pêssegos com aplicação de revestimentos aditivados de extrato de erva-mate. *Brazilian Journal of Food Technology* 23(e2019044):1-13.
- Sobral, M., Jarenkow, J.A., Brack, P., Irgang, B., Larocca, J. & Rodrigues, R.S. 2013. Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. 2. Ed. Editora Rima, São Carlos. 357 p.
- Sousa, V.A. de, Aguiar, A.V. de & Spoladore, J. 2015. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae. *Revista Árvore* 39(2):315-323.
- Souza, A.C. de. 2018. Dormência em sementes de *Ilex paraguariensis*. Tese 80 f., Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- Souza, A.C. de, Oliveira, L.M. de, Souza, G.F., Schmidt, S.S. & Liesch, P.P. 2020. Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. samples (Aquifoliaceae). *Floresta e Ambiente* 27(4):1-4.
- Takagi, E. & Togashi, K. 2013. Oviposition of the seed parasitoid wasp *Macrodasyceras hirsutum* (Hymenoptera: Torymidae) into seeds of nonhost tree *Ilex latifolia*. *Journal of the Entomological Research Society* 15(2):17-20.
- Wendling, I. 2004. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras. Embrapa Florestas, Colombo. 46 p.
- Wendling, I. & Santin, D. 2015. Propagação e nutrição de erva-mate. Embrapa, Brasília. 195 p.
- Zanon, A. 1988. Produção de sementes de erva-mate. Embrapa CNPF, Curitiba. 8 p.

## **5 CAPÍTULO 3**

### **Avaliação da qualidade de sementes de erva-mate oriundas de diferentes plantas matrizes\***

\*Artigo aceito para publicação na Revista Ciência Florestal.

EVALUATION OF THE QUALITY OF SEEDS OF YERBA MATE (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) FROM DIFFERENT MOTHER-PLANTS

**RESUMO**

Mudas de erva-mate com qualidade genética e fisiológica, altos índices de sobrevivência no plantio e resistência a estresses ambientais são necessários para a implantação e estabelecimento de ervais produtivos que irão fornecer matéria-prima de qualidade. No entanto, a produção de mudas, na maioria dos casos, é realizada a partir de sementes, as quais são coletadas de plantas matrizes com poucos critérios de seleção. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo investigar a qualidade das sementes de erva-mate após pré-limpeza por flutuação de diferentes plantas matrizes, por meio da obtenção de informações sobre a caracterização biométrica (medida longitudinal e transversal), teor de água, peso de mil sementes, avaliação da integridade das sementes e viabilidade por meio do teste de tetrazólio. As sementes foram coletadas de 10 plantas matrizes localizadas em três municípios da região ervateira Alto Vale do Taquari – RS, Brasil. Na avaliação da integridade foram contabilizadas a quantidade de sementes não íntegras (vazias e deterioradas) e íntegras (com e sem embrião visível). No teste de tetrazólio foi avaliada a porcentagem de sementes viáveis e não viáveis. As sementes das diferentes plantas matrizes apresentaram diferenças estatísticas para todas as variáveis analisadas. As análises mostraram que há diferenças relacionadas à biometria e teor de água e, conseqüentemente, no peso de mil sementes. A erva-mate apresenta percentual variado de sementes vazias e deterioradas. A porcentagem de sementes não viáveis é alta, o que reduz significativamente a viabilidade de um lote de sementes.

**Palavras-chave:** Biometria; Peso de mil sementes; Teste de tetrazólio; Viabilidade de sementes.

**ABSTRACT**

Yerba mate seedlings with genetic and physiological quality, high rates of sowing survival and resistance to environmental stresses are necessary for the implantation and establishment of productive plants that will provide quality raw material. However, the production of seedlings, in most cases is carried out from seeds, which are collected from mother-plants with few selection criteria. In this sense, the work aimed to investigate the quality of the seeds of yerba mate after processing by flotation from different mother-plants, by obtaining information about the biometric characterization (longitudinal and transversal measure), water content, a thousand-seed weight, evaluation of the seed integrity and viability through the tetrazolium test. The seeds were collected from 10 mother-plants located in three cities in the yerba-mate region Alto Vale do Taquari – RS state, Brazil. In the integrity assessment, the number of not full (empty and deteriorated) and full (with and without visible embryo) seeds was counted. In the tetrazolium test, the percentage of viable and non-viable seeds was evaluated. The seeds of the different parent plants showed statistical differences for all the variables analyzed. The analysis showed that there are differences related to biometric parameters and water content and, consequently, in the weight of a thousand seeds. Yerba mate shows a varied percentage of empty and deteriorated seeds. The percentage of non-viable seeds is high, which significantly reduces the viability of the seed lot.

**Keywords:** Biometry; Thousand seed weight; Tetrazolium test; Seeds viability.

**INTRODUÇÃO**

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Aquifoliaceae), conhecida por erva-mate, tem ocorrência registrada no Brasil nos estados da Bahia ao Rio Grande do Sul, na região nordeste da Argentina e em grande parte do Paraguai (SOBRAL et al., 2013). É uma espécie arbórea dioica, apresenta flores pistiladas e estaminadas em plantas diferentes e polinização realizada predominantemente por insetos (FERREIRA et al., 1983; PIRES et al., 2014). A floração ocorre nos meses de setembro a dezembro e a maturação dos frutos é heterogênea, ocorrendo de dezembro a abril, apresentando, inicialmente, coloração verde, posteriormente vermelha e finalizando com violeta-escuro (ZANON, 1988). Os frutos geralmente contêm quatro pirênios que constituem as unidades de dispersão da espécie e são denominados popularmente de sementes. São formados por endocarpo lenhoso e semente, esta última constituída por tegumento, endosperma e embrião (HEUSER; FERREIRA; MARIATH, 1993).

A principal forma de consumo da erva-mate dá-se a partir das folhas desidratadas e trituradas, utilizadas para o preparo do chimarrão ou tererê, porém a espécie tem potencial para fornecer

matéria-prima para a produção de refrigerantes, doces, cosméticos e medicamentos (OLIVEIRA; WAQUIL, 2015). Seu cultivo comercial, de importância econômica, social, ambiental e cultural (WENDLING; SANTIN, 2015) é praticado na região sul do Brasil, por agricultores familiares (CHECHI; SCHULTZ, 2016).

Para o sucesso dos cultivos, no que se refere à produção, são necessárias mudas de padrão genético e fisiológico com altos índices de sobrevivência no plantio, bem como resistência a estresses ambientais. No entanto, a produção de mudas de erva-mate, em grande parte, é realizada a partir de sementes (WENDLING; SANTIN, 2015) coletadas em ervais nativos ou implantados, porém com critérios subjetivos de seleção, o que implica em altas taxas de mortalidade, desenvolvimento heterogêneo e baixa qualidade da massa foliar produzida (STURION; RESENDE, 2010).

A falta de critérios para a seleção das plantas matrizes tem efeitos negativos na qualidade da erva-mate comercial, implicando na geração de um produto industrializado com baixo valor agregado e de difícil comercialização (WENDLING, 2004). Neste sentido, a seleção de matrizes com maior potencial para a produção de mudas de qualidade passa pela análise das suas sementes, pois, para grande parte das espécies cultivadas, há uma estreita relação entre as características morfológicas e fisiológicas dos diásporos com a conservação, a viabilidade e o vigor, repercutindo diretamente no desempenho das mudas no viveiro e, posteriormente, na constituição do erval.

Dessa forma, testes como pureza física, umidade, danos mecânicos, peso, tamanho, germinação e vigor são utilizados para determinar atributos de qualidade física e fisiológica de sementes (BARBEDO; SANTOS-JUNIOR, 2018). No caso de espécies com germinação lenta, acima de 60 dias (BRASIL, 2009), e ainda desuniforme (de 100 a 360 dias), como é o caso da erva-mate (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994), é recomendado o teste de tetrazólio (BRASIL, 2009), que é um método rápido, utilizado para estimar a viabilidade e o vigor de sementes, e que está fundamentado na modificação da coloração dos tecidos vivos, principalmente a atividade das enzimas desidrogenases que estão diretamente relacionadas com a viabilidade das sementes (MARCOS-FILHO, 2015).

Nesse sentido, Souza et al. (2020a) avaliaram sementes de *I. paraguariensis* oriundas de diferentes locais e verificaram que há diferenças entre os lotes, notadamente em relação à quantidade de sementes vazias e deterioradas, o que afeta diretamente a porcentagem de sementes viáveis. Essas condições interferem na taxa de germinação, visto que a maioria dos trabalhos atribui a baixa porcentagem de germinação à dormência morfofisiológica (NIKLAS, 1987; CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994; MEDEIROS, 1998; WENDLING, 2004; GALÍNDEZ et al., 2018). De modo geral, os viveiristas realizam uma pré-limpeza nas sementes antes de submetê-las a estratificação. Inicialmente maceram os frutos e a massa obtida é submersa em um recipiente com água. Nessa etapa, descartam o sobrenadante (ZANON, 1988; WENDLING; SANTIN, 2015). No entanto, ainda faltam estudos que investiguem a qualidade das sementes utilizadas pelos viveiristas após este beneficiamento.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar a qualidade de sementes de erva-mate após pré-limpeza por flutuação de diferentes plantas matrizes, por meio da obtenção de dados biométricos (medidas longitudinais e transversais); teor de água; peso de mil sementes; avaliação da integridade das sementes, considerando não íntegras (sementes vazias ou deterioradas) e íntegras (com e sem embrião visível); e viabilidade por meio do teste de tetrazólio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Embora a unidade de dispersão da espécie seja um pirênio, o termo semente será utilizado ao longo do trabalho, representando a unidade de germinação, constituído por endocarpo e semente. Para a realização do estudo foram utilizadas sementes de erva-mate provenientes de três municípios (Tabela 1), localizados no Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil. As árvores estão localizadas a uma distância mínima de cinco metros e máxima de trinta quilômetros. Frutos dispersos naturalmente (abscisados) foram coletados sobre lonas plásticas dispostas no solo (Figura 1A), sob a copa das plantas matrizes, em toda a sua projeção, anteriormente ao início da maturação dos frutos. As plantas matrizes foram identificadas com o código MA + número ordinal, seguindo a ordem da coleta (Tabela 2).

**Tabela 1: Locais de coleta de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), em municípios do Alto Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil.**

Table 1: Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) seed collection sites, in localities in Alto Vale do Taquari, Rio Grande do Sul state, Brazil.

	Nº matrizes	Altitude (m)	Precipitação média (mm/ano)	Temperatura média (°C)
Arvorezinha	3	732	1704	16,9
Ilópolis	6	695	1689	17,1
Putinga	1	450	1531	18,2

Fonte: Climate-data.org (2020)

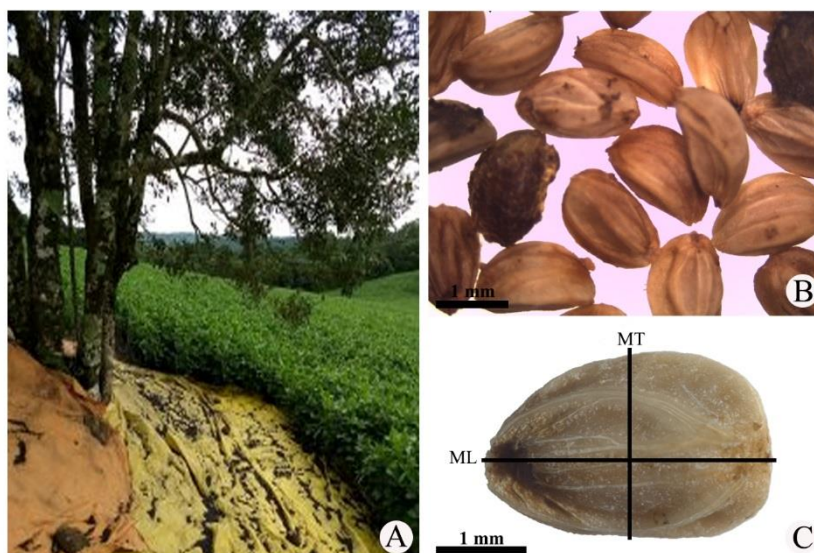
**Tabela 2: Plantas matrizes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), com o respectivo código, município de coleta, ambiente em que a mesma está inserida, coordenadas e data de coleta.**

Table 2: Yerba mate mother-plants (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), with the respective code, localities of collection, environment in which they are inserted, coordinates and date of collection.

Matriz	Código	Município	Ambiente	Coordenadas	Coleta
Matriz 1	MA1	Ilópolis	mata nativa	28°53'25"S52°08'46"W	24/01/2018
Matriz 2	MA2	Ilópolis	mata nativa	28°53'25"S52°08'46"W	24/01/2018
Matriz 3	MA3	Ilópolis	mata nativa	28°53'25"S52°08'46"W	25/01/2018
Matriz 4	MA4	Ilópolis	mata nativa	28°53'25"S52°08'46"W	25/01/2018
Matriz 5	MA5	Ilópolis	mata nativa	28°53'25"S52°08'46"W	25/01/2018
Matriz 6	MA6	Arvorezinha	lavoura soja	28°50'56"S52°14'14"W	26/01/2018
Matriz 7	MA7	Arvorezinha	mata nativa	28°50'56"S52°14'14"W	25/01/2018
Matriz 8	MA8	Arvorezinha	lavoura soja	28°50'56"S52°14'14"W	25/01/2018
Matriz 9	MA9	Ilópolis	erval	28°55'04"S52°08'56"W	26/01/2018
Matriz 11	MA11	Putinga	mata nativa	28°57'10"S52°10'33"W	07/02/2018

Fonte: Os Autores (2021)

Após coletados, os frutos foram levados ao laboratório, onde foi realizada a retirada de folhas e ramos. Posteriormente, foram macerados e lavados em peneira sob água corrente. A massa constituída de sementes e polpa macerada foi submersa em um recipiente com água e descartadas as sementes sobrenadantes (ZANON, 1988; WENDLING; SANTIN, 2015). Nessa etapa, foram descartadas aproximadamente 10% das sementes. Em seguida, as sementes permaneceram secando sobre papel toalha em bancada de laboratório durante três dias (Figura 1B), depois foram acondicionadas em vidros do tipo *snap cap* com tampa plástica, cuja capacidade é de 100 mL, devidamente identificados (número da planta matriz) e armazenados em câmara fria sob temperatura constante de  $5\pm 2$  °C até o início das análises.



Fonte: Os Autores (2018)

**Figura 1: A) Coleta de frutos maduros sobre lonas; B) pirênios e C) identificação da medida longitudinal (ML) e transversal (MT) na biometria de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.).**

Figure 1: A) Ripe fruits; B) pyrenes and C) biometric parameters of yerba mate seeds (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.).

Posteriormente, as sementes de cada matriz foram utilizadas para realizar as seguintes análises:

- **Caracterização biométrica:** com auxílio de paquímetro digital (0,01 mm), as sementes foram medidas no sentido longitudinal (ML) e transversal (MT) (mm) (Figura 1C). Para cada planta matriz foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, retiradas ao acaso de cada vidro.
- **Teor de água (TA):** foi determinado pelo método da diferença percentual de massa após secagem em estufa a  $105 \pm 5$  °C, por 24 horas (BRASIL, 2009). Para cada planta matriz, foram utilizadas três amostras de aproximadamente 0,5 g.
- **Peso de mil sementes (PMS):** foram pesadas, em balança analítica (0,0001g) conforme a metodologia descrita nas regras de Análises de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), oito amostras de 100 sementes para cada matriz, e calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Peso de mil sementes (PMS)(g)} = \frac{\text{peso da amostra (g)} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de sementes}}$$

O valor final do PMS foi corrigido considerando, para isso, o teor de água médio das sementes (6,9%) para todas as amostras, e o resultado foi expresso em gramas. Uma vez que as sementes das diferentes matrizes apresentam diferentes teores de água, esse ajuste foi realizado para que se pudesse saber qual é a diferença de matéria seca.

- **Avaliação da integridade das sementes de erva-mate:** foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada matriz. Inicialmente, as sementes foram imersas em água ultrapurificada a 30 °C por 24 horas para facilitar o corte (CATAPAN, 1998). Em seguida, foi realizado o corte longitudinal com o auxílio de pinça e bisturi. As sementes foram analisadas visualmente com auxílio de microscópio estereoscópico Leica EZ4 HD, com aumento de 20 a 30 vezes. Nessa avaliação, as sementes foram classificadas em (a) não íntegras, compostas por sementes vazias, caracterizadas pela ausência de embrião e de endosperma (Figura 2A) ou por conter menos de 50% dos tecidos (Figura 2B) (BARBEDO; SANTOS-JÚNIOR, 2018); (b) deterioradas, caracterizadas pela presença de endosperma e embrião necrosados (Figura 2C) ou com tecido gelatinoso (Figura 2D); e (c) íntegras quando apresentaram embrião visível (Figura 2E) ou não (Figura 2F).



**- Determinação de viabilidade pela análise com sal de tetrazólio:** as sementes classificadas como íntegras na avaliação anterior, que apresentaram endosperma firme e sem nenhum dano ou alteração de cor, com e sem embrião visível, foram submetidas à solução de 0,1% de tetrazólio por 24 horas a 35 °C (CATAPAN, 1998). Em seguida, foi realizada a tríplice lavagem das sementes com água ultrapurificada, e, posteriormente, sucedeu-se a avaliação visual das sementes para determinar a viabilidade. As sementes foram avaliadas no que se refere à reação à solução, sendo consideradas viáveis as que apresentaram endosperma firme e colorido, com embrião visível, sem danos e com consistência firme (Figura 2G). Todas as sementes que não apresentaram essas características foram classificadas como não viáveis (BRASIL, 2009).



Fonte: Os Autores (2018)

**Figura 2: Sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) classificadas como não íntegras: A) vazia somente com o endocarpo; B) vazia contendo menos de 50% dos tecidos; C) deteriorada com tecidos necrosados; D) deteriorada com tecido gelatinoso; e íntegras: E) endosperma de consistência firme com embrião visível; F) endosperma de consistência firme sem embrião visível e G) viável com endosperma firme e colorido, com embrião visível, sem danos e com consistência firme. Em que: Em = embrião; End = endocarpo; En = endosperma.**

Figure 2: Yerba mate seeds (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) classified as not full: A) empty only with the endocarpy; B) empty containing less than 50% of the tissues; C) deteriorated with necrotic tissues; D) deteriorated with gelatinous tissue; classified as full: E) endosperm and visible embryo both with firm consistency; F) endosperm with firm consistency without visible embryo and G) viable with firm and colored endosperm, with visible embryo, without damage and with firm consistency. In where: Em = embryo; End = endocarpy; En = endosperm.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados de biometria (medida longitudinal e transversal), teor de água, PMS, porcentagem de sementes íntegras e não íntegras, porcentagem de sementes viáveis e não viáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA), após as médias foram comparadas pelo teste de LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro, pelos programas estatísticos Costat 6.45 (COHORT SOFTWARE, 2017) e InfoStat 5.13.1 (DI RIENZO et al., 2008). Os dados de porcentagem de sementes vazias, com embrião visível e viáveis, foram transformados para  $\sqrt{(x + 10)}$ , sendo os resultados apresentados em seus valores originais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística mostrou que a matriz MA4 apresentou o maior valor para a medida longitudinal (ML), porém sem diferenças com a MA11, que por sua vez não diferiu da MA3. Para a medida transversal (MT), as matrizes MA11 e MA8 apresentaram os maiores valores. A matriz MA1 apresentou os menores valores para as duas variáveis. O teor de água médio das sementes foi de 6,9%, e a matriz MA5 apresentou o maior TA. As matrizes MA6 e MA8 apresentaram o maior peso de mil sementes (PMS) e a matriz MA4 o menor PMS (Tabela 3).

**Tabela 3: Medida longitudinal (mm), medida transversal (mm), teor de água (%) e peso de mil sementes (g) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.**

Table 3: Longitudinal measure (mm), transversal measure (mm), water content (%) and a thousand-seed weight (g) of yerba mate seeds (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) from different mother-plants, Rio Grande do Sul state, Brazil.

Matriz	ML (mm)	MT (mm)	TA (%)	PMS (g)
Matriz 1	2,96 h	1,95 f	6,3 d	5,9470 d
Matriz 2	3,30 g	2,09 e	6,3 d	6,0090 cd
Matriz 3	3,87 b	2,23 c	7,0 c	6,5156 c
Matriz 4	3,99 a	2,16 d	7,8 b	5,0415 e
Matriz 5	3,46 e	2,29 b	10,4 a	4,2805 f
Matriz 6	3,79 c	2,32 b	5,7 e	8,7051 a
Matriz 7	3,36 fg	2,20 cd	6,1 de	6,2249 cd
Matriz 8	3,55 d	2,43 a	5,7 e	8,9174 a
Matriz 9	3,43 ef	2,33 b	6,8 c	7,3426 b
Matriz 11	3,93 ab	2,40 a	7,2 c	7,8580 b
Média	3,56	2,24	6,9	6,6842
CV (%)	7,58	9,29	3,94	4,85
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro.

Em que: ML = medida longitudinal; MT = medida transversal; TA = teor de água; PMS = peso mil sementes; CV = coeficiente de variação.

Fonte: Os Autores (2021)

A caracterização biométrica das sementes é realizada por meio da mensuração do tamanho das sementes, o qual está relacionado com a multiplicação celular do eixo embrionário e tecido de reserva, como, por exemplo, cotilédones e endosperma. Geralmente, sementes bem nutridas durante a formação apresentam maior tamanho, o que implica em maior quantidade de reservas e, conseqüentemente, em maior vigor (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Já o PMS é utilizado para calcular o número de sementes por embalagem e a densidade de semeadura (BRASIL, 2009) e pode ser utilizado como indicativo de qualidade, já que sementes vazias e malformadas, quando comparadas às bem formadas, apresentam menor peso (BARBEDO; SANTOS-JUNIOR, 2018).

Em determinadas espécies, diferentes condições ambientais durante o período de desenvolvimento das sementes podem ocasionar variações de tamanho, forma e cor. Contudo, o tamanho das sementes está relacionado à massa, cujas alterações estão relacionadas com a influência de vários fatores, principalmente ambientais. Luz, temperatura e disponibilidade de nutrientes são fatores que influenciam a planta mãe durante a formação e o desenvolvimento das sementes (BASKIN; BASKIN, 2014). As plantas matrizes, referidas neste estudo, estão localizadas em diferentes ambientes e expostas a condições distintas, o que pode ter contribuído para as diferenças observadas em relação ao tamanho das sementes. Mesmo as árvores localizadas próximas, com distância aproximada de cinco metros, como as matrizes MA3, MA4 e MA5, apresentaram diferenças com relação à biometria, TA e PMS, evidenciando a importância de fatores genéticos que podem estar contribuindo para a variabilidade observada.

Com relação ao teor de água (TA), os resultados observados neste estudo (Tabela 3) coincidem com os valores observados para a espécie. Os valores mínimos descritos na literatura são de até 5,9% de teor de água, por essa razão, as sementes de erva-mate são classificadas como ortodoxas (MEDEIROS; SILVA, 2001). Souza et al. (2020b), analisando quatro lotes de sementes de erva-mate, oriundos dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, verificaram teor de água entre 6,9 e 12,5% e Mireski et al. (2019) observaram 10,7% de TA no lote analisado. Já no estudo

de seis diferentes espécies de *Ilex*, oriundas da região subtropical da Argentina, foi observada variação entre 7,1 e 14,1% de teor de água. Dentre as seis espécies, *I. paraguariensis* apresentou teor de água médio de  $10,6 \pm 0,7\%$  (GALÍNDEZ et al., 2018), enquanto no presente trabalho o teor médio foi de 6,9%, com teores mínimos de 5,7% e máximos de 10,4% (Tabela 3), evidenciando que o teor de água é variável entre diferentes lotes.

O teor de água interfere diretamente no peso das sementes, porém variações ocorrem dependendo das condições do local de coleta e do grau de maturação das sementes (MARCOS-FILHO, 2015). O teor de água das sementes, juntamente com a temperatura de armazenamento, são os dois fatores mais importantes dentre vários que podem influenciar na longevidade das sementes durante o armazenamento (BEWLEY et al., 2013). Sementes tolerantes à dessecação e que apresentam teor de água inferior a 10% tendem a aumentar as chances de suportarem o armazenamento por um longo período de tempo, permanecendo viáveis (BARBEDO; SANTOS-JUNIOR, 2018).

A análise estatística para a avaliação da integridade das sementes (Tabela 4) apresentou diferenças significativas para a maioria das variáveis analisadas. Para a porcentagem de sementes vazias, a matriz MA11 apresentou o maior valor (10%), já a matriz MA8 não teve nenhuma semente vazia (Tabela 4). A presença de sementes vazias na cultura da erva-mate foi relatada por diversos autores (NIKLAS, 1987; ZANON, 1988; CATAPAN, 1998; SOUZA et al., 2020a), sendo, também, observada em outras espécies do gênero *Ilex*. Em *I. aquifolium* L. foi verificada a presença de 23,3% de sementes vazias, as quais foram removidas do lote por flutuação (ARRIETA; SUÁREZ, 2004).

A técnica da flutuação é indicada para a remoção de impurezas por meio do descarte de sementes sobrenadantes (WENDLING; SANTIN, 2015), sendo muito difundida entre os viveiristas. Na avaliação de sementes de erva-mate, Niklas (1987) verificou que todas as sementes que flutuavam estavam vazias. Neste trabalho, durante o processo de limpeza das sementes, aproximadamente 10% do sobrenadante foi descartado. A análise das sementes desse descarte confirmou que as mesmas estavam vazias ou predadas. Como estas sementes apresentam menor peso específico flutuando em água, podem ser facilmente retiradas, auxiliando o beneficiamento. Esta metodologia é sugerida por diversos autores justamente para reduzir a quantidade de sementes vazias e predadas de um lote (ZANON, 1988; WENDLING; SANTIN, 2015). Porém, neste trabalho, pode-se verificar que, para algumas matrizes, mesmo depois do descarte do sobrenadante, ainda permanecem sementes vazias (Tabela 4). Contudo, para a matriz MA8 não foi verificada a presença de nenhuma semente vazia. Dessa forma, outros métodos de limpeza podem ser explorados para esta espécie a fim de buscar uma forma de padronização e redução, de forma significativa, da quantidade de sementes vazias de um lote e, conseqüentemente, aumentar a viabilidade do mesmo.

O percentual médio de sementes deterioradas, considerando todas as matrizes, foi de 36,5%. Já para cada matriz individual, MA5 apresentou o maior percentual (62%), seguida pelas matrizes MA1, MA2 e MA4 com 48%. Já a matriz MA9 apresentou a menor porcentagem (11%) entre as matrizes. Souza et al. (2020a) também verificaram diferenças na porcentagem de sementes deterioradas oriundas de diferentes plantas matrizes, com variações entre 3,5% e 57,7%, confirmando que esta variável depende de fatores ambientais, intrínsecos do local de coleta, e de fatores genéticos, inerentes da planta matriz. Diversos fatores podem contribuir para a quantidade de sementes deterioradas num lote, porém é muito difícil identificar o momento da morte das sementes, sendo este um processo complexo (MARCOS-FILHO, 2015). A maioria dos estudos que tentam esclarecer essa questão usam espécies anuais, sendo escassas as informações sobre sementes florestais nativas. Mudanças bioquímicas, como, por exemplo, a diminuição da síntese de DNA, modificações na atividade respiratória e redução ou perda de permeabilidade seletiva das membranas celulares são algumas das causas de deterioração de sementes (MARCOS-FILHO, 2015).

**Tabela 4: Avaliação da integridade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): não íntegras – vazias (%) e deterioradas (%) e íntegras - com embrião visível (%) e sem embrião visível (%); e viabilidade pelo teste de tetrazólio - viáveis (%) e não viáveis (%) oriundas de diferentes plantas matrizes, Rio Grande do Sul, Brasil.**

Table 4: Evaluation of the integrity of yerba mate seeds (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): not full - empty (%) and deteriorated (%) and full - with visible embryo (%) and without visible embryo (%); and viability by the tetrazolium test – viable (%) and non-viable of yerba mate seeds (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) from different mother-plants, Rio Grande do Sul state, Brazil.

Matriz	Não íntegras		Íntegras		Viabilidade	
	% Vazias	% Deterioradas	% Embrião visível	% Embrião não visível	% Viáveis	% Não viáveis
Matriz 1	2 ab	48 d	17 ns	33 b	30,1 abc	69,9 abc
Matriz 2	2 ab	48 d	17	33 b	30,1 abc	69,9 abc
Matriz 3	7 cd	37 c	16	40 bc	28,8 abc	71,2 abc
Matriz 4	2 ab	48 d	17	33 b	30,1 abc	69,9 abc
Matriz 5	2 ab	62 e	18	18 a	36,4 a	63,6 a
Matriz 6	2 ab	22 b	19	57 d	23,3 bc	76,7 bc
Matriz 7	5 bc	31 bc	25	39 bc	7,9 d	92,1 d
Matriz 8	0 a	23 b	33	44 c	35,1 ab	64,9 ab
Matriz 9	7 cd	11 a	26	56 d	19,5 cd	80,5 cd
Matriz 11	10 d	35 c	20	35 bc	20,5 cd	79,5 cd
Média	3,9	36,5	20,8	38,8	26,2	73,8
CV (%)	9,2	17,6	12,2	17,6	12,9	12
p-valor	<0,0001	<0,0001	0,05	<0,0001	0,0032	0,0032

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro.

Em que: CV = coeficiente de variação.

Fonte: Os Autores (2021)

Além do exposto, o endosperma das sementes de erva-mate é constituído de proteínas e lipídeos (HEUSER; FERREIRA; MARIATH, 1993). Condições ambientais adversas, como a elevação da temperatura e da umidade relativa do ar podem causar desnaturação proteica, ocasionando inativação e perda da função biológica (MARCOS-FILHO, 2015), aumentando a deterioração e diminuindo a porcentagem de sementes viáveis. Outro fator que pode contribuir para o elevado percentual de sementes deterioradas tem relação com o longo período de maturação dos frutos de erva-mate (de dezembro a abril) (ZANON, 1988). Graças a essa maturação heterogênea, os frutos que amadurecem primeiro ficam mais tempo expostos às condições adversas de mudança de temperatura e umidade, o que pode estar contribuindo para a presença de sementes deterioradas. Com relação à quantidade de sementes íntegras, é importante ressaltar que o número de sementes com embrião não visualizado para todas as matrizes foi superior ao de sementes com embrião visível, com exceção da MA5 que apresentou o mesmo valor para ambos (18%) (Tabela 4). A presença de sementes sem embrião visível na cultura da erva-mate é citada na literatura, sendo contabilizadas, por alguns autores, como viáveis (CATAPAN, 1998; MEDEIROS; SILVA, 2001), porém, neste trabalho, as sementes sem embrião visível foram consideradas como não viáveis, seguindo a metodologia proposta por Brasil (2009).

Com relação à viabilidade pelo teste de tetrazólio, na Tabela 4, observa-se a porcentagem de sementes viáveis e não viáveis sobre o total de sementes íntegras avaliadas, desconsiderando a porcentagem de sementes vazias e deterioradas. Pode-se verificar que as matrizes diferiram estatisticamente (Tabela 4). Para a porcentagem de sementes viáveis, a matriz MA5 apresentou o maior valor (36,4%), seguida da matriz MA8 (35,1%). Já a matriz MA7 apresentou a maior

porcentagem de sementes não viáveis (92,1%), seguida pelas matrizes MA9 e MA11 que apresentaram 80,5% e 79,5%, respectivamente.

Analisando a porcentagem de sementes viáveis para as diferentes matrizes (Tabela 4), observa-se a média geral de 26,2%, o que justifica a baixa porcentagem de germinação da espécie, quando considerado o número de sementes germinadas em relação às semeadas; muitos trabalhos mencionam porcentagem de germinação próxima de 20% (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994; SCHAPARINI; VIECELLI, 2011; GALÍNDEZ et al., 2018; SOUZA et al., 2020a). Galíndez et al. (2018) verificaram que a viabilidade das sementes de erva-mate é de 40% através do teste de tetrazólio; esses autores também descartaram as sementes que flutuavam (< 20%). Mireski et al. (2019) verificaram que 150 dias após o início do teste de germinação apenas 1% das sementes germinaram e que passados 210 dias observaram 8% de germinação. Após 210 dias realizaram o teste de tetrazólio e verificaram que 30% das sementes apresentavam embriões viáveis, sendo assim, concluíram que estas sementes estavam dormentes.

A deterioração das sementes é um processo irreversível e gradativo que se inicia após a maturidade fisiológica sendo que diversos fatores podem contribuir para que este processo ocorra mais rapidamente (MARCOS-FILHO, 2015). De modo geral, as sementes de espécies nativas apresentam baixas porcentagens de germinação, principalmente devido a fatores como, por exemplo, a má formação, predação por insetos e ataque de fungos (BARBEDO; SANTOS-JUNIOR, 2018). Dessa forma, é de fundamental importância conhecer as características das sementes da espécie com a qual se está trabalhando, o que tornam indispensáveis os estudos de caracterização e qualidade das sementes. Estudos como estes servem de subsídios a viveiristas, extensionistas, pesquisadores e demais interessados que trabalham com a cultura da erva-mate, podendo auxiliar na compreensão da baixa porcentagem de germinação das sementes da espécie e no desenvolvimento de técnicas de beneficiamento a fim de melhorar a qualidade dos lotes.

## CONCLUSÃO

As sementes oriundas de diferentes plantas matrizes avaliadas neste trabalho, mesmo após a pré-limpeza por flutuação, apresentam diferenças relacionadas ao tamanho e teor de água e, conseqüentemente, no peso de mil sementes. A erva-mate apresenta percentual variado de sementes vazias e deterioradas. A porcentagem de sementes não viáveis é alta, o que reduz significativamente a viabilidade de um lote de sementes.

## REFERÊNCIAS

- ARRIETA, S.; SUÁREZ, F. Germination and seed bank depletion of holly (*Ilex aquifolium* L.) in four microhabitat types. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 305-313, 2004.
- BARBEDO, C. J.; SANTOS-JUNIOR, N. A. dos. **Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2018. 208 p.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2nd. ed. San Diego: Elsevier, 2014. 1586 p.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA; ACS, 2009. 399 p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.
- CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.
- CHECHI, L. A.; SCHULTZ, G. A Produção de erva-mate: um estudo da dinâmica produtiva nos estados do Sul do Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 13, n. 23, p. 16-26, 2016.
- CLIMATE-DATA.ORG. **Dados climáticos para cidades mundiais**. Oedheim, 2020. Disponível em: <http://bit.ly/2EGikV2>. Acesso em: 24 abr. 2021.
- COHORT SOFTWARE. **CoStat**. Pacific Grove, 2017. Disponível em: [www.cohort.com](http://www.cohort.com). Acesso em: 24 abr. 2021.

- CUQUEL, F. L.; CARVALHO, M. L. M. de; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 415-421, 1994.
- DI RIENZO, J. A. *et al.* **InfoStat, versión 2008**. Grupo InfoStat, FCA. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, 2008.
- FERREIRA, A. G. *et al.* Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hill. **Brasil Florestal**, Brasília, n. 53, p. 29-33, 1983.
- GALÍNDEZ, G. C. D. *et al.* Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2018.
- HEUSER, E. D.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A. *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, La Plata, v. 29, n. 1/2, p. 39-48, 1993.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina, PR: ABRATES, 2015. 660 p.
- MEDEIROS, A. C. de S. **Dormência em Sementes de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo, PR: Embrapa; CNPF, 1998. 25 p. (Documentos, 36).
- MEDEIROS, A. C. de S.; SILVA, L. C. da. Efeitos da secagem na viabilidade das sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hill. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 35-46, 2001.
- MIRESKI, M. C. *et al.* Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1354-1362, 2019.
- NIKLAS, C. O. Estudios embriológicos y citológicos en la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 6, n. 1, p. 45-56, 1987.
- OLIVEIRA, S. V. de; WAQUIL, P. D. Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 4, p. 750-756, 2015.
- PIRES, E. Z. *et al.* Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 13, n. 2, p. 171-180, 2014.
- SCHAPARINI, P. S.; VIECELLI, C. A. Superação de dormência de sementes de erva mate. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 4, n. 4, p. 163-170, 2011.
- SOBRAL, M. *et al.* **Flora arbórea e arborecente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: Rima, 2013. 362 p.
- SOUZA, A. C. *et al.* Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. samples (Aquifoliaceae). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 27, n. 4, e20170960, 2020a.
- SOUZA, G. F. *et al.* Detection methods of fungi in *Ilex paraguariensis* seeds. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 27, n. 3, e20170983, 2020b.
- STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. de. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.
- WENDLING, I. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2004. 46 p. (Documentos, 91).
- WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 195 p.
- ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba, PR: EMBRAPA; CNPF, 1988. 8 p. (Circular Técnica, 16).

## **6 CAPÍTULO 4**

**Pré-tratamentos, estratificação e emergência de sementes de erva-mate\***

\*Artigo formatado conforme as normas da Revista Floresta.

### Resumo

A propagação da erva-mate é realizada por sementes que apresentam baixa taxa de germinação e dormência. Na natureza as aves são as principais dispersoras e a passagem das sementes pelo sistema digestivo auxilia na germinação. A simulação em laboratório das condições proporcionadas pela passagem das sementes no trato digestivo pode ser uma alternativa de pré-tratamento. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de pré-tratamentos, associando ambiente ácido na estratificação, sobre a emergência de sementes de *I. paraguariensis*. Foram testados dois pré-tratamentos (PT): solução aquosa acidificada (PT1) e uma sequência de soluções aquosas (neutra + ácidas) (PT2). As sementes pré-tratadas foram submetidas a estratificação em areia (T1 e T2), além de sementes sem pré-tratamento que foram estratificadas em areia (T3) e sementes estratificadas em areia e enterradas (T4). Aos 90, 135 e 180 dias foram retiradas sementes da estratificação e levadas ao laboratório. Aliado a estes quatro tratamentos, incluiu-se um tratamento controle (sementes sem pré-tratamento e sem estratificação) e sementes pré-tratadas (PT1 e PT2) sem estratificação (T5 e T6) que foram submetidas à emergência e acompanhadas semanalmente durante 180 dias. Após este período foi realizado o teste de tetrazólio nas sementes não emergidas. Sementes estratificadas por 90 dias não emergiram, com 135 dias obteve-se 0,9% de emergência e o tratamento com estratificação em areia e enterrado (T4) apresentou a maior emergência (4,25%). Com 180 dias de estratificação obteve-se emergência média de 9,6% e a maior porcentagem foi verificada no T2 (pré-tratamento seguido de estratificação), com 33% de emergência.

*Palavras-chave:* dormência, erva-mate, teste de tetrazólio, tratamento ácido, viabilidade.

### Abstract

*Pre-treatments, stratification, and emergence of seeds of Ilex paraguariensis A.St.-Hil.* The propagation of yerba mate is carried out by seeds that have dormancy and a low germination rate. In nature, birds are the main dispersers and the passage of seeds through the digestive system helps in germination. The laboratory simulation of the conditions provided by the passage of seeds in the digestive tract can be a pre-treatment alternative. Thus, the objective of the work was to evaluate the effect of pre-treatments, associating acid environment in the stratification, on the emergence of *I. paraguariensis* seeds. Two pre-treatments (PT) were tested: acidified aqueous solution (PT1) and a sequence of aqueous solutions (neutral + acid) (PT2). The pretreated seeds were subjected to stratification in sand (T1 and T2), in addition to seeds without pretreatment that were stratified in sand (T3) and stratified in sand and buried (T4). At 90, 135, and 180 days, seeds were removed from the stratification and taken to the laboratory. In addition to these four treatments, a control treatment (seeds without pre-treatment and stratification) and pre-treated (PT1 and PT2) seeds without stratification (T5 and T6), which were submitted to the emergency and followed up weekly for 180 days, were included. After this period, the tetrazolium test was performed on non-emerged seeds. Seeds stratified for 90 days did not emerge, with 135 days there was 0.9% emergence, and the treatment with stratification in sand and buried (T4) had the greatest emergence (4.25%). With 180 days of stratification, an average emergency of 9.6% was obtained and the highest percentage was seen in T2 (pre-treatment followed by stratification), with 33% of emergence.

*Keywords:* dormancy, yerba mate, tetrazolium test, acid treatment, viability.

## INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Aquifoliaceae), conhecida como erva-mate, é uma espécie arbórea, dioica, com um dos esporângios abortivos (CARVALHO, 2003; PIRES *et al.*, 2014). A floração ocorre de setembro a dezembro e a frutificação de dezembro a meados de maio (PIRES *et al.*, 2014). A unidade de dispersão são os pirênios, geralmente em número de quatro em cada fruto, constituídos de endocarpo lenhoso e semente. A semente, por sua vez é composta pelo tegumento, endosperma e embrião (CARVALHO, 2003; WENDLING; SANTIN, 2015; GALÍNDEZ *et al.*, 2018).

O cultivo da erva-mate no Brasil é realizado principalmente por agricultores familiares, apresentando grande importância econômica, social, cultural e ambiental, fazendo parte de um dos sistemas florestais mais equilibrados do Brasil, com crescente descoberta de novos usos de sua matéria prima (WENDLING; SANTIN, 2015). A propagação é realizada principalmente por via seminal (CARVALHO, 2003; WENDLING; SANTIN, 2015), contudo, as sementes apresentam baixa qualidade genética e fisiológica, baixo poder germinativo, germinação desuniforme e dormência morfofisiológica (WENDLING; SANTIN, 2015; GALÍNDEZ *et al.*, 2018). A dormência morfofisiológica é apontada como uma das principais causas das baixas taxas de germinação das sementes (WENDLING; SANTIN, 2015), que se caracterizam por apresentar embrião com desenvolvimento incompleto (estágio globular ao estágio cordiforme tardio) e presença de compostos inibitórios (BEWLEY *et al.*, 2013; BASKIN; BASKIN, 2014),

A forma mais difundida para superar a dormência das sementes de erva-mate é a estratificação. Esta se resume em manter as sementes misturadas ou intercaladas em camadas de areia úmida por 180 dias (WENDLING; SANTIN, 2015). Este processo favorece o desenvolvimento embrionário ao promover a superação da dormência morfológica e permite a lixiviação de compostos inibitórios, favorecendo a superação da dormência fisiológica (BEWLEY *et al.*, 2013; BASKIN; BASKIN, 2014). Ainda assim, a germinação é lenta e desuniforme (de 100 a 360 dias) com baixas taxas, em geral inferiores à 20% (WENDLING; SANTIN, 2015).

Para a obtenção das mudas de erva-mate são necessários cerca de 18 meses, considerando o período compreendido pela coleta das sementes, estratificação, semeadura, germinação e desenvolvimento das mudas. O que contribui para esse período prolongado é a não evolução das técnicas de superação de dormência. Nesse sentido, a utilização de pré-tratamentos nas sementes associado à estratificação pode ser uma alternativa viável,



com o intuito de uniformizar e aumentar as taxas de germinação, reduzir o período de estratificação e, conseqüentemente, o tempo para a formação de mudas.

Na natureza, inúmeras espécies vegetais, especialmente as de frutos carnosos, estão adaptadas para a dispersão por animais, principalmente aves. O consumo de frutos frescos, com a posterior dispersão das sementes é considerado um processo chave na ecologia de plantas (SILVEIRA *et al.*, 2012). No caso específico da erva-mate, que apresenta fruto carnoso do tipo drupa, a dispersão é do tipo zoocórica, por síndrome de ornitocoria, com destaque para aves do gênero *Turdus*, como os sabiás (CARVALHO, 2003). Estas aves ingerem os frutos inteiros (COLUSSI; PRESTES, 2011), podendo as sementes serem dispersadas por até cerca de 2,0 km de distância (DIAZ *et al.*, 2013), evidenciando a importância da avifauna neste processo. A passagem das sementes pelo sistema digestivo tem ação mecânica e/ou química, podendo afetar a estrutura e/ou a permeabilidade do tegumento (TRAVESET, 1998; LEHOUCK *et al.*, 2011). As aves também podem auxiliar na superação da dormência, principalmente na remoção de substâncias como suberinas presentes na cutícula interna e externa do tegumento por meio da passagem pelo sistema digestivo (BEWLEY *et al.*, 2013), além de afetar outras estruturas das sementes e contribuir para a remoção de inibidores (TRAVESET, 1998).

Sementes de *Xymalos monospora* (Harv.) Baill. ex Warb. (Monimiaceae), que passaram pelo trato digestivo de três espécies de aves, apresentaram maior porcentagem e menor tempo médio de germinação, quando comparado às sementes sem esse tratamento, evidenciando a eficiência das aves no processo de indução da germinação (LEHOUCK *et al.*, 2011). Contudo, a maioria dos trabalhos tem foco em identificar quais são as espécies de aves que dispersam as sementes de determinada planta e alguns avaliam *in situ* as sementes que passaram pelo sistema digestivo. São poucos os estudos que avaliam, em laboratório, formas análogas às condições proporcionadas pela passagem das sementes no trato digestivo dos animais, o que seria uma alternativa de pré-tratamento, sendo uma metodologia acessível na superação da dormência de sementes de erva-mate.

Neste sentido, o estudo partiu da hipótese de que a simulação do trato digestivo das aves pode auxiliar na superação da dormência de sementes de erva-mate e reduzir o tempo necessário para a produção de mudas. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de pré-tratamentos, associando ambiente ácido na estratificação, sobre a emergência de sementes de *I. paraguariensis*, em um viveiro comercial.

## MATERIAL E MÉTODOS

Embora a unidade de dispersão da espécie seja um pirênio, o termo semente será utilizado ao longo do trabalho para designar um diásporo, constituído pelo endocarpo e a semente.

### Coleta das sementes

Foram utilizadas sementes provenientes de duas plantas matrizes localizadas no município de Arvorezinha, Rio Grande do Sul, Brasil (28° 50' 56" S 52° 14' 14" W). Nessa região, segundo a classificação de Köppen e Geiger, o clima é do tipo Cfb (clima temperado úmido com verão temperado) com temperatura média de 16,9 °C e pluviosidade anual média de 1704 mm (CLIMATE, 2021).

Em janeiro de 2018, frutos dispersos naturalmente (abscisados) foram coletados sobre lonas plásticas dispostas na projeção da copa das plantas matrizes antes de iniciar a maturação dos frutos. A coleta desses frutos foi realizada num intervalo de dispersão de três dias. Posteriormente, foram levados ao laboratório e macerados em água corrente. A massa resultante, constituída de sementes e polpa, foi submersa num recipiente com água, sendo então descartadas as sementes sobrenadantes (WENDLING; SANTIN, 2015), que corresponderam a aproximadamente 10%. Em seguida, as sementes permaneceram secando sobre papel toalha em bancada de laboratório durante cinco dias, na sequência foram homogeneizadas compondo um único lote. Após, foi determinado o teor de água por meio da diferença percentual de massa após secagem em estufa a 105 ± 2 °C por 24 horas, utilizando-se três repetições de 0,5 g (BRASIL, 2009). Também foi avaliada a viabilidade inicial do lote pelo teste de tetrazólio. Na sequência, as sementes foram armazenadas em vidro tipo *snap cap* e mantidas em temperatura controlada de 5 ± 2 °C durante quatro meses.

### Pré-tratamentos das sementes em laboratório

Parte das sementes foi exposta a dois pré-tratamentos:

- Pré-tratamento 1 (PT1): sementes embebidas em solução aquosa acidificada (pH 2,78) durante 48 horas a 40 °C.

- Pré-tratamento 2 (PT2): sementes embebidas em água ultra purificada (pH 6,95) por duas horas a 40 °C. Posteriormente o pH da água foi ajustado para 3,5 com ácido clorídrico (1 N), permanecendo nessa solução aquosa acidificada por oito horas, a temperatura de 40 °C. Durante esse período, o pH foi monitorado a cada 30 min e, quando necessário, adicionado ácido clorídrico ou hidróxido de potássio (1 N) para mantê-lo constante. Após as sementes foram imersas em solução aquosa acidificada com pH 5,9, também a 40 °C, durante 30 minutos. Então as sementes foram transferidas e mantidas em areia peneirada e autoclavada com 60% da capacidade de retenção de água (CRA), a temperatura de 25 °C por aproximadamente 40 horas.

### Estratificação das sementes estabelecidas em viveiro comercial

As sementes pré-tratadas foram imediatamente transferidas para o viveiro e juntamente com sementes sem pré-tratamento foram submetidas aos tratamentos de estratificação:

- Tratamento 1 (T1): as sementes passaram pelo pré-tratamento 1 (PT1) (como descrito no item anterior) e foram estratificadas em areia.
- Tratamento 2 (T2): as sementes passaram pelo pré-tratamento 2 (PT2) (como descrito no item anterior) e foram estratificadas em areia.
- Tratamento 3 (T3): sementes sem pré-tratamento estratificadas em areia.
- Tratamento 4 (T4): sementes sem pré-tratamento estratificadas em areia e enterradas a 20 cm de profundidade em local bem drenado no viveiro comercial. O solo nesse local apresenta 21% de argila, pH 4,8, 2,2% de matéria orgânica, 10,7 mg dm<sup>-3</sup> de fósforo e 151 mg dm<sup>-3</sup> de potássio.

Para a estratificação, foram utilizadas bandejas de polietileno brancas (192 x 116 x 64 mm) onde as sementes foram dispostas sobre uma tela de polietileno preta com malha de 50 *mesh*, e estas entre duas camadas de areia, de aproximadamente 3 cm de altura cada (1,0 L cada). A areia foi umedecida com água a 60% da CRA. O fundo de cada bandeja foi previamente perfurado (cada bandeja com 12 orifícios de 3 mm de diâmetro) para viabilizar a drenagem e, para evitar a perda de areia uma tela de polietileno foi colocada no fundo da bandeja e outra sobre a camada superior de areia. Os tratamentos de estratificação (T1, T2, T3 e T4) foram mantidos sob as condições de irrigação manual e manejo que o viveirista adota na sua propriedade, com monitoramento diário, de modo que a areia ficasse com umidade próxima à 60% da CRA durante todo o período experimental. Cada tratamento foi composto por quatro repetições de aproximadamente 1.000 sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e o período de estratificação foi de 180 dias.

### Emergência de sementes

Aos 90, 135 e 180 dias de estratificação foi retirada uma amostra de sementes de cada tratamento de estratificação (T1, T2, T3 e T4). Essas sementes foram transferidas para o laboratório onde foram lavadas com água ultra purificada e autoclavada. A estes tratamentos foi adicionado um tratamento controle (TC) - sementes sem pré-tratamento e sem estratificação, armazenadas em frasco de vidro tipo *snap cap* e mantidas a temperatura controlada de  $5 \pm 2$  °C. Também foram utilizadas sementes submetidas aos dois pré-tratamentos 1 e 2 (PT1 e PT2), porém sem estratificação, os quais foram denominados de tratamento 5 e 6 (T5 e T6) respectivamente, totalizando sete tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos tratamentos de emergência de sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Table 1. Description of the seed emergence treatments of *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Tratamento	Código	Pré-tratamento	Estratificação
Tratamento Controle	TC	não	não
Tratamento 1	T1	solução aquosa acidificada - pH 2,78/48h	em areia
Tratamento 2	T2	solução neutra - pH 6,95/2h, soluções aquosas acidificadas - pH 3,5/8h e pH 5,9/30 min.	em areia
Tratamento 3	T3	não	em areia
Tratamento 4	T4	não	em areia e enterradas
Tratamento 5	T5	solução aquosa acidificada - pH 2,78/48h	não
Tratamento 6	T6	solução neutra - pH 6,95/2h, soluções aquosas acidificadas - pH 3,5/8h e pH 5,9/30 min.	não

Para todos os tratamentos foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes que foram submetidas à emergência em caixas do tipo *gerbox* devidamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1,5% (i.a.). Cada caixa *gerbox* recebeu 250 g de areia média peneirada e autoclavada, umedecida com água ultra purificada e autoclavada até 60% da CRA.

As caixas *gerbox* foram mantidas em germinadores do tipo *Mangelsdorf* com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, e umidade relativa > 90% sem controle do fotoperíodo, em delineamento inteiramente casualizado. A emergência foi acompanhada semanalmente durante 180 dias, sendo considerada emergida a semente que emitiu qualquer estrutura visível na superfície da areia (BRASIL, 2009). O cálculo de porcentagem de emergência foi realizado com base na viabilidade inicial do lote de sementes (64%).

### Análise da viabilidade das sementes

Para cada tratamento, ao completar 180 dias em emergência, foi realizado o teste de tetrazólio das sementes remanescentes. Para tanto, as sementes não emergidas que restavam nas caixas *gerbox* foram peneiradas e lavadas com água ultra purificada e autoclavada para retirada do excesso de areia. Em seguida foi realizado um corte longitudinal com auxílio de pinça e bisturi e submetidas à solução de 0,1% de tetrazólio por 24 horas a 35 °C (Souza *et al.*, 2020). Após, as sementes foram analisadas com auxílio de microscópio estereoscópico *Leica EZ4 HD*, com aumento de 20 a 30 vezes e avaliadas quanto à reação à solução. Foram consideradas viáveis as que apresentaram endosperma firme e colorido, com embrião visível, sem danos e com consistência firme. Todas as sementes que não apresentaram estas características foram classificadas como não viáveis (BRASIL, 2009).

Os dados de porcentagem de emergência, porcentagem de sementes viáveis e não viáveis para 90, 135 e 180 dias de estratificação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema bifatorial (tratamento x tempo de estratificação) e as médias foram comparadas pelo teste de LSD-Fisher ao nível de 5% de probabilidade de erro pelos programas estatísticos Costat 6.4 e Sigmaplot 11.0. Os dados de porcentagem de sementes viáveis aos 180 dias de estratificação não atenderam os pressupostos da ANOVA por isso foram transformados para  $\sqrt{x}$ , sendo os resultados apresentados em seus valores originais.

## RESULTADOS

O lote apresentou 5,7% de teor de água e a análise de variância apontou interação ( $p < 0,001\%$ ) entre os tratamentos e o tempo de estratificação para a porcentagem de emergência, considerando a viabilidade inicial do lote de 64%. Na Tabela 2 são apresentados os resultados da porcentagem de emergência após 180 dias, onde é possível verificar que as sementes estratificadas por 90 dias não emergiram. Sementes estratificadas por 135 dias apresentaram porcentagem média de emergência de 0,9%, sendo que o tratamento com estratificação em areia e enterrado (T4) diferiu estatisticamente dos demais e apresentou o maior valor (4,25%). Com 180 dias de estratificação obteve-se emergência média de 9,6%, com destaque para as sementes expostas a um pré-tratamento seguido de estratificação (T2), que apresentou 33% de emergência, seguido da estratificação em areia e enterrado (T4) (19,28%) e da estratificação em areia (T3) (10,46%).

Tabela 2. Porcentagem média de emergência de sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. aos 180 dias, para os diferentes tratamentos e tempos de estratificação.

Table 2. Mean seed emergence percentage of *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. At 180 days for the different treatments and periods of stratification.

Tempo de estratificação	90 dias	135 dias	180 dias
Tratamentos	-----% emergência-----		
TC-Sementes armazenadas a 5 °C	0 a A	0 b A	0 e A
T1-Sementes embebidas em solução aquosa acidificada + estratificação em areia	0 a B	0 b B	4,25 d A
T2-Sementes embebidas em solução aquosa neutra, seguida de soluções aquosas acidificadas + estratificação em areia	0 a B	0,98 b B	33 a A
T3-Sementes estratificadas em areia	0 a B	0,98 b B	10,46 c A
T4-Sementes estratificadas em areia e enterradas	0 a C	4,25 a B	19,28 b A
T5-Sementes embebidas em solução aquosa acidificada	0 a A	0 b A	0 e A
T6-Sementes embebidas em solução aquosa neutra, seguida de soluções aquosas acidificadas	0 a A	0 b A	0 e A
Média	0	0,9	9,6

TC=Tratamento controle; T=Tratamento; médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro.

TC=Control treatment; T=treatment; means followed by distinct lowercases in the same column and distinct uppercases in the same line are different between themselves by the LSD-Fisher test with a 5% error probability.

Não houve interação entre os tratamentos e o tempo de estratificação para a porcentagem de sementes viáveis e não viáveis. O teste de emergência com 90 dias de estratificação apresentou valores médios de 11,75% de sementes viáveis e 88,25% de não viáveis (Tabela 3). Para este tempo de estratificação, no tratamento em que as sementes foram estratificadas em areia (T3) houve o maior percentual de sementes viáveis (33,25%), seguidos pelos tratamentos controle (TC), sementes estratificadas e enterradas (T4) e pré-tratamento em solução aquosa acidificada com estratificação (T1), os quais não diferiram entre si.

Para o teste de emergência com 135 dias de estratificação, no tratamento controle (TC) houve maior porcentagem de sementes viáveis (19,75%), mas sem diferença estatística dos tratamentos onde as sementes foram enterradas e estratificadas (T4) e dos pré-tratamentos seguido de estratificação (T1 e T2). E estes três tratamentos não diferiram das sementes que foram estratificadas em areia (T3).

No teste de emergência com 180 dias de estratificação, para o tratamento controle (TC) verificou-se a maior porcentagem de sementes viáveis (19,75%), seguido da estratificação em areia (T3) e com pré-tratamento em solução aquosa acidificada seguido de estratificação (T1) (12,5% e 9,5%, respectivamente), e em seguida apareceu a estratificação enterrada (T4) e sementes pré-tratadas em uma sequência de solução aquosa e estratificadas (T2), ambas com 5,5%.

Tabela 3. Porcentagem de sementes viáveis e não viáveis de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. após 180 dias de emergência, considerando os tempos 90, 135 e 180 dias de estratificação.

Table 3. Viable and non-viable seed percentage of *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. after 180 days of emergence, considering 90, 135 and 180 of stratification.

Tempo de estratificação	90 dias		135 dias		180 dias	
	Viáveis	Não viáveis	Viáveis	Não viáveis	Viáveis	Não viáveis
TC-Sementes armazenadas a 5 °C	17,25 b	82,75 b	19,75 a	80,25 c	19,75 a	80,25 d
T1-Sementes embebidas em solução aquosa acidificada + estratificação em areia	14,75 b	85,25 b	14 ab	86 bc	9,5 b	90,5 bc
T2-Sementes embebidas em solução aquosa neutra, seguida de soluções aquosas acidificadas + estratificação em areia	0 c	100 a	13,75 ab	86,25 bc	5,5 c	94,5 b
T3-Sementes estratificadas em areia	33,25 a	66,75 c	13,5 b	86,5 b	12,5 b	87,5 c
T4-Sementes estratificadas em areia e enterradas	17 b	83 b	14,5 ab	85,5 bc	5,5 c	94,5 b
T5-Sementes embebidas em solução aquosa acidificada	0 c	100 a	0 c	100 a	0 d	100 a
T6-Sementes embebidas em solução aquosa neutra, seguida de soluções aquosas acidificadas	0 c	100 a	0 c	100 a	0 c	100 a
Média	11,75	88,25	10,79	89,21	7,54	92,46
p valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

TC=Tratamento controle; T=Tratamento; médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de LSD-Fisher a 5% de probabilidade de erro.

TC=Control treatment; T=treatment; means followed by distinct lowercases in the same column are different between themselves by the LSD-Fisher test with a 5% error probability.

## DISCUSSÃO

Na literatura não foram encontrados registros da utilização de pré-tratamentos com soluções aquosas acidificadas na superação da dormência de sementes de erva-mate. Alguns trabalhos testaram pré-tratamentos, como imersão em água quente (50 e 100 °C), imersão em água destilada e água de coco por 24 h, porém a porcentagem de germinação foi  $\leq 1\%$  (SCHAPARINI; VIECELLI, 2011).

Os pré-tratamentos com embebição das sementes em uma sequência de soluções aquosas (T2 e T6) tentaram simular o sistema digestivo de uma ave, já que na natureza os pássaros são os principais dispersores das sementes de erva-mate (CARVALHO, 2003; COLUSSI; PRESTES, 2011). Na germinação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. houve incremento de 50% no tratamento ácido que simulou os efeitos de um dispersor, apresentando resultado satisfatório quando comparado às sementes que não passaram por nenhum tratamento (SOUZA *et al.*, 2015). No presente trabalho, o incremento na emergência foi de 33% quando houve um pré-tratamento com solução aquosa neutra, seguido de ácida aliado à estratificação (T2).

A ação de tratamentos ácidos está comprovada na superação da dormência física, pois auxilia no amolecimento do tegumento. No entanto, há poucas informações sobre o efeito nos demais tipos de dormência. Para a maioria das espécies que apresentam diásporos do tipo drupa, como é o caso da erva-mate, as sementes não possuem dormência física (BEWLEY *et al.*, 2013; BASKIN; BASKIN, 2014). Assim, a exposição do

diásporo ao ácido auxilia no amolecimento do endocarpo, que é extremamente duro (BASKIN; BASKIN, 2014). O endocarpo possui várias camadas de células lignificadas, sendo esta característica responsável por dificultar a entrada de água nas sementes (GRIGOLETTI JÚNIOR *et al.*, 1999) e, conseqüentemente, a expansão dos tecidos e o crescimento do embrião (DOLCE *et al.* 2010).

O efeito de tratamentos ácidos pode ir além dos efeitos físicos no tegumento das sementes com dormência fisiológica, já que a escarificação da semente não é necessária para a germinação (BASKIN; BASKIN, 2014). A ação dos ácidos intestinais pode desencadear vários processos fisiológicos que atuam diretamente nos embriões das sementes e contribuem para o aumento da germinação (BRAVO *et al.*, 2020). Em sementes com dormência morfológica/morfofisiológica foi observada porcentagem de germinação significativamente maior após a passagem pelo intestino de aves quando comparado com sementes sem essa passagem (SOLTANI *et al.*, 2018). De forma geral, a maneira como a passagem pelo intestino afeta a dormência ainda permanece obscura (BRAVO *et al.*, 2020), assim como a ação de tratamentos com soluções aquosas que tentam simular estes efeitos.

Em sementes com dormência morfofisiológica, os tecidos que circundam o embrião (endosperma, tegumento, pericarpo) devem sofrer afrouxamento e com isso ficam mais fragilizados, constituindo um processo chave para a remoção da dormência, pois possibilita a extensão e protrusão da radícula através destas camadas (BEWLEY *et al.*, 2013). O endosperma da semente madura também pode estar envolvido no controle da germinação, servindo principalmente como barreira no desenvolvimento radicular. Quando ocorre o estímulo à germinação, várias enzimas são ativadas, ocorre o enfraquecimento do endosperma micropilar fazendo com que a radícula consiga se expandir para tecidos adjacentes (LINKIES *et al.*, 2010). O pré-tratamento, com uma sequência de soluções aquosas podem ter contribuído para o enfraquecimento do endosperma e mobilização de reservas para a nutrição do embrião, com conseqüente desenvolvimento e crescimento. A estratificação auxiliou na remoção de compostos inibitórios, como polifenóis (MIRESKI *et al.*, 2018) o que culminou com maiores taxas de emergência observadas no tratamento T2.

O escurecimento do endocarpo também foi verificado em muitas sementes, isso pode ser devido à presença de fungos que atuam na degradação do mesmo (SOUZA *et al.*, 2019) e contribuiu para aumentar significativamente a porcentagem de sementes não viáveis em todos os tratamentos. Durante a estratificação e emergência, o desenvolvimento de fungos é favorecido pela elevada umidade que ocorre durante o processo (GRIGOLETTI JÚNIOR *et al.*, 1999).

Nas sementes submetidas aos pré-tratamentos sem estratificação (T5 e T6) foi verificada alta porcentagem de sementes não viáveis (100%), além de não ter sido observada emergência, confirmando que as sementes de erva-mate necessitam do período de estratificação para a superação da dormência morfofisiológica. Nas sementes destes tratamentos (T5 e T6) foi verificado que o endocarpo estava amolecido, com endosperma gelatinoso ou líquido e em muitos casos com coloração escurecida. Isto pode ser devido ao pré-tratamento associado à temperatura constante (25 °C) sem estratificação, visto que maior deterioração de sementes de erva-mate também foi verificada na estratificação em areia à 25 °C comparadas as que foram estratificadas à -2 °C (MENEGUETI *et al.*, 2004). Já no tratamento controle foi observada maior porcentagem de sementes viáveis, ou seja, maior presença de sementes dormentes após 180 dias de emergência, novamente evidenciando a importância da estratificação na superação da dormência.

É importante destacar que o resultado obtido no presente trabalho foi devido à associação dos efeitos do pré-tratamento em uma sequência de soluções aquosas neutra e ácidas com a estratificação (T2), já que a ação de apenas um dos fatores não foi efetiva, comprovando a hipótese inicial deste estudo. Além disso, estes resultados estão atrelados às condições ambientais específicas existentes durante o período de estratificação, por esse motivo são necessários mais trabalhos que envolvam pré-tratamentos para obter maiores taxas de germinação. Contudo este trabalho é pioneiro e apresentou alta taxa de emergência (33%) quando comparado com os trabalhos disponíveis na literatura que apresentam valores inferiores à 20%.

De modo geral, o pré-tratamento de solução aquosa neutra, seguida de soluções aquosas acidificadas associado à estratificação (T2) contribuiu com o amolecimento do endocarpo e do tegumento, favorecendo a entrada de oxigênio e água, auxiliando na mobilização de reservas para o desenvolvimento embrionário, além de facilitar a remoção de compostos inibitórios, superando assim a dormência morfofisiológica e culminando com maiores taxas de emergência.

Mais estudos são necessários no sentido de aumentar a porcentagem de viabilidade inicial do lote de sementes, pois estudos recentes indicam que as baixas taxas de germinação da espécie não podem ser totalmente atribuídas à dormência morfofisiológica e sim, a qualidade inicial do lote, que pode ter alta porcentagem de sementes vazias e deterioradas (Souza *et al.*, 2020). Dessa forma é importante realizar estudos de beneficiamento de sementes, além de associar pré-tratamentos e elementos químicos, principalmente fontes de nitratos na estratificação, porque na natureza o efeito da fertilização por meio da deposição de material fecal no entorno da semente pode auxiliar na germinação e estabelecimento das mudas (LEHOUCK *et al.*, 2011; SOLTANI *et al.*, 2018).

## CONCLUSÕES

As análises realizadas permitem concluir que:

- O pré-tratamento com solução aquosa neutra, seguido de soluções aquosas acidificadas aliado à estratificação favorece a emergência de sementes de erva-mate.

## REFERÊNCIAS

- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2nd. ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2014. 1586 p.
- BEWLEY, J. D., BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- BRAVO, C.; CHAMORRO, D.; HIRALDO, F.; SPEZIALE, K.; LAMBERTUCCI, S. A.; TELLA, J. L.; BLANCO, G. Physiological dormancy broken by endozoochory: Austral parakeets (*Enicognathus ferrugineus*) as legitimate dispersers of calafate (*Berberis microphylla*) in the Patagonian Andes. **Journal of Plant Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 538-544, 2020.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v. 1. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2003. 1039 p.
- CLIMATE. **Dados climáticos para cidades mundiais**. Oedheim, 2021, Disponível em: <http://pt.climate-data.org/>. Acesso em: 06 de abr. 2021.
- COLUSSI, J.; PRESTES, N. P. Frugivoria realizada por aves em *Myrciaria trunciflora* (Mart) O. Berg. (Myrtaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Ilex paraguariensis* St. Hil. no norte do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ornitologia**, Basingstoke, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.
- DIAZ, A. V. S.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAME, P. Y.; SEBBENN, A. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico em populações de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na área de entorno do Parque Nacional do Iguçu**. Documento, 247. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2013. 48 p.
- DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St. -Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. **Seed Science and Technology**, Bassersdorf, v. 38, n. 2, p. 441-448, 2010.
- GALÍNDEZ, G. C. D.; BUBILLO, R.; LINDOW-LÓPEZ, L.; MALAGRINA, G.; ORTEGA-BAES, P.; BASKIN, C. C. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2018.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; ZANON, A.; AUER, C. G.; FOWER, J. A. P. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes, na emergência de plântulas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 9, p. 31-39, 1999.
- LEHOUCK, V.; SPANHOVE, T.; LENS, L. Avian fruit ingestion differentially facilitates seed germination of four fleshy-fruited plant species of an Afrotropical forest. **Plant Ecology and Evolution**, Meise, v. 144, n. 1, p. 96-100, 2011.
- LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, Hoboken, v. 186, n. 4, p. 817-831, 2010.
- MENEGUETI, J. C. B.; NÓBREGA, L. H. P.; SMANHOTTO, A.; SILVEIRA, J. C. M. da. Superação da dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) por estratificação. **Revista Varia Scientia**, Cascavel, v. 4, n. 8, p. 157-182, 2004.
- MIRESKI, M. C.; BÜHRER, C. de B.; HELM, C. V.; WENDLING, I.; VIEIRA, E. S. N.; SANTOS, A. F. dos; NOGUEIRA, A. C. Polyphenols in yerba mate seeds: potential inhibitors of germination. **Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 593-600, 2018.
- PIRES, E. Z.; STEDILLE, L. I. B.; MACHADO, S.; MANTOVANI, A.; BORTOLUZZI, R. L. da C. Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 13, n. 2, p. 171-180, 2014.
- SCHAPARINI, P. S.; VIECELLI, C. A. Superação de dormência de sementes de erva mate. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 4, n. 4, p. 163-170, 2011.

- SILVEIRA, F. A. O.; MAFIA, P. O.; LEMOS-FILHO, J. P.; FERNANDES, G. W. Species-specific outcomes of avian gut passage on germination of Melastomataceae seeds. **Plant Ecology and Evolution**, Meise, v. 145, n. 3, p. 350-355, 2012.
- SOLTANI, E.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; HESHMATI, S.; MIRFAZELI, M. S. A meta-analysis of the effects of frugivory (endozoochory) on seed germination: role of seed size and kind of dormancy. **Plant Ecology**, Bassersdorf, v. 219, n. 11, p. 1283-1294, 2018.
- SOUZA, A. C.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, G. F.; SCHMIDT, S. S.; LIESCH, P. P. Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. samples (Aquifoliaceae). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 27, n. 4, e20170960, 2020.
- SOUZA, G. F.; OLIVEIRA, L. M. de; AGOSTINETTO, L.; PUCHALE, L. Z.; SÁ, A. C. S. Efeito da estratificação em substrato esterilizado na qualidade sanitária de sementes de *Ilex paraguariensis*, **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 854-862, 2019.
- SOUZA, M. L.; SILVA, D. R. P.; FANTECELLE, L. B.; LEMOS FILHO, J. P. de. Key factors affecting seed germination of *Copaifera langsdorffii*, a Neotropical tree. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, DF, v. 29, n. 4, p. 473-477, 2015.
- TRAVESET, A. Effect of seed passage through vertebrate frugivores' guts on germination: a review. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 151-190, 1998.
- WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 195 p.

## **7 CAPÍTULO 5**

**O desenvolvimento embrionário e a viabilidade das sementes afetam a germinação de  
erva-mate\***

\*Artigo formatado conforme as normas da Revista Acta Botanica Brasilica.



## RESUMO

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. é propagada por sementes que apresentam dormência morfofisiológica. Este estudo teve como objetivo responder as seguintes questões: 1) Quais são as alterações que ocorrem no embrião ao longo do período de diferentes métodos de estratificação de sementes de *Ilex paraguariensis*? 2) O tipo de substrato utilizado e/ou a incorporação de fertilizantes químicos durante a estratificação podem promover o aumento das taxas de germinação da espécie? Para isso, sementes de erva-mate foram submetidas a quatro tratamentos de estratificação que variaram quanto ao tipo de substrato e adição de adubo, acrescidos de uma testemunha, durante 180 dias. Em intervalos de 30 dias foram retiradas sementes para análises anatômicas estruturais e, aos 150 e 180 dias também para testes de germinação a 25 °C que tiveram acompanhamento por 180 dias. O tratamento com a maior porcentagem de germinação (15,4%) na estratificação e nos testes de germinação (15,2 e 20,1%) foi o que teve adubo mineral incorporado na areia de estratificação. Este tratamento foi o único a diferir significativamente dos demais que apresentaram baixas taxas de germinação ( $\leq 1,3\%$ ). Somente nesse tratamento foram observados embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento (torpedo e maduro). Conclui-se que o desenvolvimento embrionário e a germinação foram favorecidos pela estratificação em areia com adição de fertilizante químico.

**Palavras Chave:** Anatomia, Aquifoliaceae, dormência morfofisiológica, estratificação, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

**Embryonic development and seed viability affect the germination of yerba mate**

**ABSTRACT**

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. is propagated by seeds that present morphophysiological dormancy. This study aimed at answering the following questions: 1) What are the changes that occur in the embryo throughout different *Ilex paraguariensis* seed stratification methods? 2) Can the type of substrate and/or the incorporation of chemical fertilizers in stratification treatments promote an increase in the germination percentage in yerba mate seeds? For this purpose, yerba mate seeds were subjected to four stratification treatments that varied according to the type of substrate and fertilizer addition, plus a control, for 180 days. At intervals of 30 days, seeds were removed for structural anatomical analysis and, at 150 and 180 days, also for germination tests at 25 °C, which were monitored for 180 days. The treatment with the highest germination percentage (15.4%) in the stratification and in the germination tests (15.2 and 20.1%) was the one with mineral fertilizer incorporated in the stratification sand. This treatment was the only one to differ significantly from the others that had low germination rates ( $\leq 1.3\%$ ). Only in this treatment embryos in more advanced stages of development (torpedo and mature) were observed. It is concluded that embryonic development and germination were favoured by sand stratification with addition of chemical fertilizer.

**Keywords:** Anatomy, Aquifoliaceae, morphophysiological dormancy, stratification, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

## **Introdução**

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., popularmente conhecida como erva-mate, é uma espécie arbórea e perenifólia, originária da Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (Sobral *et al.* 2013). A erva-mate é muito consumida na forma de chimarrão, tererê e chá (Coelho *et al.* 2002), porém, é crescente os estudos que visam a criação de outras formas de uso, como

bebidas (cervejas, refrigerantes e energéticos), na produção de cosméticos, alimentos funcionais e ração animal (Croge *et al.* 2021). Além disso, é também utilizada como medicinal (Cardozo-Junior & Morand 2016; Riachi & De Maria 2017), tendo propriedades estimulante, ansiolítica e neuroprotetora (Santos *et al.* 2015).

A produção de mudas de erva-mate é realizada principalmente a partir de sementes (Wendling & Santin 2015), porém a ocorrência da dormência morfofisiológica é apontada como uma das principais causas das baixas taxas de germinação da erva-mate (Niklas 1987; Heuser *et al.* 1993; Wendling & Santin 2015; Galíndez *et al.* 2018; Mireski *et al.* 2019; Souza *et al.* 2020). O embrião se encontra em estágio indiferenciado ou não completamente desenvolvido (estágio globular ao estágio cordiforme tardio) (Bewley *et al.* 2013; Baskin & Baskin 2014), associado a mecanismos inibitórios, como a presença de polifenóis no tegumento da semente (Mireski *et al.* 2018), o que dificulta o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente a germinação (Bewley *et al.* 2013; Baskin & Baskin 2014).

Para acelerar o desenvolvimento embrionário das sementes, a estratificação é o método mais utilizado, processo pelo qual as sementes permanecem em areia por 180 dias (Cuquel *et al.* 1994; Wendling & Santin 2015). Contudo, as técnicas de estratificação não evoluíram ao longo do tempo. Uma alternativa pode ser aliar a estratificação a outros tratamentos, com o intuito de reduzir o tempo de superação da dormência e contribuir para a germinação mais homogênea e, conseqüente uniformização na produção de mudas.

Nesse sentido, buscando acelerar o processo germinativo, diferentes métodos de estratificação têm sido testados, porém, os percentuais de germinação sempre foram baixos (0% a 3,8%), mesmo após seis meses de estratificação (Cuquel *et al.* 1994; Meneguetti *et al.* 2004; Schaparini & Viecelli, 2011). Dolce *et al.* (2010) registraram 74,4% de germinação de embriões mantidos isolados em cultivo *in vitro* por 120 dias. Porém, abordagens sobre desenvolvimento do embrião durante o processo de estratificação ainda são desconhecidas. Para as sementes de *Malus domestica* Borb cv. Antonovka (maçã) submetida à estratificação

a frio, foram observadas alterações morfológicas nos embriões ao longo do tempo (Dawidowicz-Grzegorzewska & Lewak 1978) e, em sementes de *Sambucus chinensis* o embrião aumentou 25% de tamanho e também foram verificadas diferenças no formato durante o seu desenvolvimento até a superação da dormência morfofisiológica (Chen *et al.* 2014).

Aliado as análises anatômicas durante a estratificação, para acompanhamento do desenvolvimento embrionário, a realização de testes de germinação é importante para comprovar a eficácia dos tratamentos de estratificação. Associado a isso, o teste de tetrazólio pode ser uma alternativa para verificar a presença de sementes dormentes no final do período experimental, já que para espécies que apresentam germinação lenta, acima de 60 dias (Brasil 2009), como é o caso da erva-mate, ainda pode haver sementes dormentes. Na literatura há relatos de que as sementes desta espécie podem apresentar período de repouso de dois anos (Cuquel *et al.* 1994) ou mais.

Estudos com algumas espécies que apresentam sementes com dormência, indicam a utilização de elementos minerais, como nitrato de potássio para superação da dormência (Batak *et al.* 2002; Alboresi *et al.* 2005). Este composto, associado a baixas temperaturas durante a estratificação de *Acer morrisonense* Hayata, favoreceu a superação da dormência de sementes, sendo observadas mudanças na concentração dos hormônios ácido abscísico (ABA) e ácido giberélico (GA3), proteínas, lipídeos, açúcares e aminoácidos (Chen *et al.* 2015). Já em maçã cultivar Ligol, a utilização de nitrato de potássio na embebição das sementes, durante a estratificação, auxiliou na superação da dormência, incrementando a porcentagem de germinação (Grezsik *et al.* 2017). Estudos como estes ainda são escassos e restritos a algumas espécies, não havendo registros de abordagens desse tipo para erva-mate (*I. paraguariensis*).

Diante de tais fatos, análises anatômicas visando o acompanhamento do desenvolvimento embrionário podem ser importantes para confirmar a influência de

métodos de estratificação. Já o teste de germinação, aliado ao teste de tetrazólio, pode auxiliar na verificação da eficácia dos tratamentos de estratificação para a superação de dormência. Deste modo, o presente estudo objetivou responder às questões (1) Quais são as alterações que ocorrem no embrião ao longo do período de diferentes métodos de estratificação de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.? (2) O tipo de substrato e/ou a incorporação de fertilizantes químicos nos tratamentos de estratificação podem promover o aumento da porcentagem de germinação de sementes de erva-mate?

## **Material e Métodos**

### *Coleta e beneficiamento das sementes*

Para termos de descrição fisiológica, os pirênios (endocarpo mais semente) foram denominados de sementes ao longo da descrição deste trabalho. As sementes de *I. paraguariensis* foram extraídas de frutos maduros de coloração vermelha à violeta-escura, coletados em janeiro de 2018 de quatro plantas matrizes localizadas no município de Ilópolis, Rio Grande do Sul, Brasil (28° 53' 25" S 52° 08' 46" W). Nessa região o clima é Cfb (clima temperado úmido com verão temperado) segundo a classificação de Köppen e Geiger, com temperatura média de 17,1 °C, e pluviosidade anual média de 1690 mm (Climate 2020).

Em laboratório, as sementes foram extraídas dos frutos por lavagem em água corrente com auxílio de peneiras e em seguida dispostas sobre papel absorvente, onde permaneceram em bancada de laboratório sob temperatura ambiente por cinco dias. Posteriormente foi determinado o teor de água obtido pela diferença percentual de umidade após secagem em estufa a  $105 \pm 2$  °C por 24 horas, utilizando-se três repetições de 0,5 g (Brasil 2009), cujo resultado indicou 6,85% de teor de água para o lote. Em seguida, foram armazenadas em vidro tipo *snap cap* e mantidas sob temperatura controlada de  $5 \pm 2$  °C por 30 dias até a instalação do experimento.

### *Testes de estratificação*

As sementes das quatro matrizes foram misturadas, constituindo um único lote, pois foram coletadas no mesmo período, de plantas matrizes próximas, em locais com condições ambientais semelhantes. Em seguida, foram submetidas a quatro tratamentos de estratificação por 180 dias (Tab. 1) (T) - Testemunha - sementes mantidas em sacos de papel e dentro de caixas de isopor, sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C) e umidade relativa do ar de aproximadamente 15%; (T1) - Tratamento 1 - sementes misturadas em areia úmida com 60% da capacidade de retenção de água (CRA), dispostas em sacos de algodão e enterrados a 20 cm de profundidade em ambiente sombreado e bem drenado (pH 5,2, 52% de argila, 2% de matéria orgânica,  $5,2 \text{ mg dm}^{-3}$  de fósforo e  $111 \text{ mg dm}^{-3}$  de potássio); (T2) Tratamento 2 - sementes em bandejas, entre duas camadas de areia, cada uma com 3 cm de altura (1,0 L cada); (T3) Tratamento 3 - sementes dispostas em bandejas entre duas camadas de areia, sendo a mais basal composta por 1000 mL e a superior de 500 mL e, sobre esta última, mais uma camada de 500 mL de substrato comercial (composto por turfa de *Sphagnum*, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola, fertilizante NPK e micronutrientes) coberta por 20 g de palha de milho desfiada, totalizando 6 cm de altura; (T4) Tratamento 4 - sementes dispostas entre duas telas de polietileno e duas camadas de areia cada uma com 3 cm de altura (1,0 L cada), sendo adicionado  $4,0 \text{ g L}^{-1}$  de adubo de liberação controlada Basacote Plus 6M® (16-8-12), à camada superior.

Este adubo contém nitrogênio (8,6% na forma amoniacal e 7,4% na forma nítrico), fósforo (5,6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), potássio (12% de  $\text{K}_2\text{O}$ ), magnésio (2% de  $\text{MgO}$  total), enxofre (12% de  $\text{SO}_3$  total) e micronutrientes (0,02% de boro, 0,05% de cobre, 0,4% de ferro, 0,06% de manganês, 0,015% de molibdênio e 0,02% de zinco).

Os tratamentos T2, T3 e T4 foram estabelecidos em casa de vegetação, em bandejas de polietileno brancas (192 x 116 x 64 mm) com fundo perfurado, com 9 furos de 0,5 cm de

diâmetro em cada bandeja, para drenagem. No período da estratificação a irrigação foi manual, mantendo o substrato sempre úmido (aproximadamente 60% da CRA).

Para cada tratamento foram usadas 5000 sementes distribuídas em quatro repetições (4 x 1250). Antes da instalação dos testes, as sementes foram desinfestadas com álcool 70% por um minuto, seguido de lavagem em água ultra purificada autoclavada. Após foram imersas por 20 minutos em hipoclorito de sódio (1,5%) contendo cinco gotas de Tween<sup>TM</sup>20 e então submetidas a tríplice lavagem com água ultra purificada autoclavada e secagem sob papel absorvente para retirada do excesso de água. Somente para o tratamento T1 não foi realizado este procedimento.

Valores referentes às temperaturas mínimas, médias e máximas, durante o período de condução do experimento de estratificação, foram obtidos da Estação Meteorológica da Universidade do Vale do Taquari (Univates) para a cidade de Lajeado (Tab. 2).

#### *Caracterização estrutural do pirênio e das sementes durante a estratificação*

Para a análise estrutural, foram retirados 10 pirênios da testemunha (T) e de cada um dos tratamentos de estratificação (T1, T2, T3 e T4) nos períodos de zero, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de estratificação. Os pirênios foram fixados em formaldeído, ácido acético e álcool (FAA50) (Johansen 1940) e, após 24 horas, foram transferidos para o armazenamento em álcool 70%. Para otimizar o processo de infiltração, conservando a estrutura do embrião, foi retirado o endocarpo dos pirênios e, posteriormente as sementes foram seccionadas longitudinalmente com o auxílio de lâmina de aço, sendo então desidratadas em série etílica crescente, infiltradas e incluídas em historesina (Leica Historesin Embedding Kit) (Feder & O'Brien 1968 com modificação).

Foram realizadas secções seriadas longitudinais no pirênio e na semente com o auxílio de micrótomo rotativo (modelo RM 2245 Leica Microsystems Inc.®) com 5,0 µm de espessura. As secções foram submetidas à coloração com azul de toluidina a 0,05% (Feder

& O'Brien 1968) e montadas em meio permanente com Entellan®. As imagens foram capturadas com auxílio de câmera digital DP041 acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX70 utilizando o programa DP Controller.

Para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), dois pirênios de cada tratamento e período de tempo (zero, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de estratificação) foram seccionados longitudinalmente, fixados em glutaraldeído a 2,5%, lavados em tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,3), desidratados em série etanólica e metalizados em ouro. As imagens foram capturadas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO® LS-10 e software SmartSEM® V05.06.

A terminologia utilizada para descrição dos estágios embrionários foi baseada nos trabalhos de Heuser *et al.* (1993) e Heuser (1999), que são: cotiledonar, cordiforme, cordiforme tardio, torpedo e maduro. As medidas das sementes e embriões foram realizadas no programa Image Pro-Plus.

#### *Germinação das sementes durante a estratificação*

Durante a estratificação, as sementes foram monitoradas semanalmente para verificação da germinação, sendo consideradas germinadas aquelas dotadas de, no mínimo, 2 mm de protrusão radicular (Brasil 2009). O cálculo de porcentagem de germinação foi realizado com base na porcentagem de sementes viáveis do lote, ou seja, foi descartada a porcentagem de sementes mortas, vazias e predadas, assim que iniciou o experimento.

#### *Teste de germinação após a estratificação*

Esse teste consistiu na amostragem de 100 sementes de cada repetição para os diferentes tratamentos, retiradas da estratificação aos 150 e aos 180 dias, que consistiram nos Teste 1 e 2, respectivamente. As sementes foram lavadas três vezes consecutivas em água ultra purificada autoclavada, e dispostas sob papel toalha. Após, as sementes foram



colocadas em caixas plásticas do tipo gerbox contendo 250 g de areia peneirada e autoclavada umedecida com água ultra purificada autoclavada a 60% da CRA.

As sementes foram enterradas na areia a 1 cm de profundidade. Posteriormente foram acondicionados em germinadores do tipo Mangelsdorf, sem regulagem de fotoperíodo e temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa superior a 90%. A porcentagem de germinação foi calculada com base na porcentagem de sementes viáveis presentes no lote, assim que iniciou o experimento. Para as sementes que não germinaram após 180 dias foi realizado o teste de tetrazólio. A avaliação da germinação foi realizada semanalmente, durante 180 dias por meio da contagem das sementes emergidas (Brasil 2009).

#### *Teste de tetrazólio*

As sementes foram peneiradas e lavadas com água ultra purificada autoclavada para retirada do excesso de areia, em seguida foi realizado corte longitudinal com auxílio de pinça e bisturi. As sementes foram analisadas com auxílio de microscópio estereoscópico Leica EZ4 HD, com aumento de 20 a 30 vezes. Inicialmente foram contabilizadas as sementes não íntegras, compostas por sementes vazias - sem a presença de embrião e endosperma ou com resquícios iniciais de tegumento; e deterioradas - com endosperma e embrião necrosados ou com tecido gelatinoso. As sementes que apresentaram endosperma firme e sem nenhum dano ou alteração de cor foram submetidas à solução de 0,1% de tetrazólio por 24 horas a 35 °C (Catapan 1998). Em seguida, foi realizada tríplex lavagem das sementes com água ultra purificada, e posteriormente sucedeu-se a avaliação visual para determinar a viabilidade. As sementes que apresentaram endosperma firme e colorido, com embrião visível e colorido, sem danos e com consistência firme foram consideradas viáveis. Todas as sementes que não apresentaram estas características foram classificadas como não viáveis (Brasil 2009).

#### *Análise estatística*

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial (tratamentos de estratificação x tempo de estratificação). Os dados de porcentagem de germinação durante a estratificação, porcentagem de germinação a 25 °C, porcentagem de sementes não íntegras, viáveis e não viáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste LSD-Fisher ao nível de 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do software Costat 6.4 e SigmaPlot 11.0. Os dados de porcentagem de germinação na estratificação, porcentagem de germinação a 25 °C e porcentagem de não viáveis não atenderam os pressupostos da ANOVA sendo transformados para  $\sqrt{x}$ , porém os resultados são apresentados em seus valores absolutos.

## **Resultados**

### *Caracterização estrutural do pirênio e das sementes durante a estratificação*

Os pirênios apresentaram tamanhos entre 1,85 mm e 3,54 mm de comprimento, com endocarpo lenhoso, seguido do tegumento, endosperma e embrião na região micropilar (Fig. 1A). O envoltório das sementes apresenta endocarpo lenhoso e pluriestratificado, constituído por fileiras de células fibrosas dispostas no maior eixo da semente e células esclerenquimáticas (Fig. 1A-F). Abaixo do endocarpo nota-se a presença de células parenquimáticas e lignificadas que compõem o tegumento da semente (Fig. 1E, I), seguido do endosperma (Fig. 1I). Para as sementes dos tratamentos de estratificação (T1, T2, T3 e T4) foram observadas hifas de fungos no endocarpo, principalmente a partir de 30 dias de estratificação, aumentando visivelmente ao longo dos períodos amostrados (Fig. 1G-H).

Desenvolvimento embrionário - em muitas sementes não foi possível determinar o desenvolvimento embrionário pela ausência do embrião. No tratamento testemunha, apenas 21% das sementes apresentaram embrião visível, enquanto nos demais tratamentos os percentuais foram maiores: 48% em T1, 31% em T2 e 38% para os tratamentos T3 e T4.

Naquelas com embrião, todos estavam na fase de embriogênese tardia, porém com variações quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário, tanto nas sementes sem estratificar com aquelas estratificadas (Tab. 3).

Para a testemunha e os tratamentos T1 e T3 foram observados essencialmente embriões cordiformes (0,30 a 0,42 mm de comprimento) (Tab. 3). Já nos tratamentos T2 e T4 predominaram embriões nos estágios cordiformes e cordiformes tardios (0,36 a 0,56 mm de comprimento), porém no T4 foram visualizados embriões em estágio de torpedo (0,63 a 0,90 mm) e maduro (0,94 a 2,04 mm) (Tab. 3), considerados aptos para germinar. Vale ressaltar que em todos os períodos de estratificação notou-se a predominância de embriões nos estágios cordiforme ou cordiforme tardio.

No estágio embrionário cotiledonar (Fig. 2A-B), observado na testemunha, T1 e T2, os embriões apresentaram início da diferenciação dos primórdios cotiledonares (Pco) e os tecidos meristemáticos formados pela protoderme e meristema fundamental, sem nítida visualização do procâmbio (Fig. 2A). Nessa fase, as células da cavidade digestora (Cd) envolvem todo o embrião (Fig. 2A), estando mais degradadas próximo aos primórdios cotiledonares. As células do endosperma possuem numerosos corpúsculos com conteúdo lipoproteico (Fig. 2B).

Nos embriões em estágio cordiforme (Fig. 2C-I) observados na testemunha e em todos os tratamentos de estratificação, os primórdios cotiledonares já estão mais diferenciados em relação ao estágio cotiledonar (Fig. 2C-D, F). Nesse estágio, observou-se a região do pró-meristema (centro quiescente) e os tecidos meristemáticos (protoderme, meristema fundamental e procâmbio) (Fig. 2C-G), sendo que as células do procâmbio são longas e estreitas (Fig. 2G) e estendem-se até a porção central do embrião (Fig. 2D-F). Nessa fase, também se observou a presença do suspensor (Fig. 2E-F) ainda ligado ao embrião e à cavidade digestora envolvendo todo o embrião e com algumas células degradadas (asterisco)

(Fig. 2H). As células do endosperma, localizadas próximas ao embrião, possuem corpúsculos lipoproteicos (Fig. 2I).

O estágio cordiforme tardio (Fig. 3A-I), também encontrado na testemunha e em todos os tratamentos, foi caracterizado pelo tamanho (0,42 a 0,56 mm), quantidade de células e do volume celular (Fig. 3A-C) em relação ao cordiforme. Nessa fase, observou-se maior delimitação dos tecidos meristemáticos com protoderme (Fig. 3A-C) recobrando o embrião, meristema fundamental na porção cortical, apresentando células com grânulos proteicos e o procâmbio localizado na região mediana, com células longas e estreitas que se estendem até os cotilédones (Fig. 3B-C, E, G). Na região dos cotilédones notam-se células meristemáticas em divisão, sem diferenciação do meristema apical caulinar (Fig. 3B). O suspensor foi observado em alguns embriões (Fig. 3B-D). Na porção subapical radicular evidenciou-se a região do pró-meristema (Pm) e início de diferenciação da coifa (Fig. 3E-F). As células da cavidade digestora envolvem o embrião, sendo observadas células em degradação e degradadas (Fig. 3A-E, H). No endosperma, notou-se a presença de muitos corpúsculos lipoproteicos no interior das células (Fig. 3H-I).

Os embriões no estágio de torpedo possuem entre 0,64 e 0,94 mm de comprimento, sendo mais alongados que o cordiforme tardio e apresentam o eixo embrionário e cotilédones bem desenvolvidos. O procâmbio está com diferenciação mais pronunciada dos tecidos meristemáticos, a coifa está evidente sem a presença do suspensor, também há degradação de células na cavidade digestora e no endosperma tem a presença de corpúsculos lipoproteicos (Fig. 4A-C).

Nos embriões maduros (Fig. 4D-I) (2,02 a 2,04mm) o eixo embrionário (hipocótilo-radícula) apresenta-se definido (Fig. 4A) com zonas meristemáticas e coifa evidentes e bem delimitadas (Fig. 4E), sendo mais alongados que o torpedo e com células maiores e mais vacuolizadas que os estágios anteriores (Fig. 4E-H). Na região do procâmbio é possível visualizar a diferenciação dos elementos condutores (Fig. 4F). A cavidade digestora

apresenta muitas células degradadas (Fig. 4H) e no endosperma os corpúsculos lipoproteicos estão em menor quantidade quando comparados aos estágios embrionários anteriores, com alguns aglutinados (Fig. 4H-I).

#### *Germinação das sementes durante a estratificação*

Não houve diferença estatística para a porcentagem de germinação entre os tempos de estratificação, somente entre os tratamentos de estratificação (Tab. 4). A germinação iniciou aos 120 dias de estratificação, não sendo verificada a presença de sementes germinadas antes desse período para nenhum dos tratamentos. O tratamento T4 (15,4%) diferiu dos demais cuja porcentagem de germinação variou de 0 e 0,13%, com média de 3,1% (Tab. 5).

#### *Teste de germinação após a estratificação*

Na Tabela 3 observa-se que não houve interação entre o tratamento e o tempo de estratificação para a germinação a 25 °C. Somente houve diferença significativa para o tratamento de estratificação. A análise estatística mostrou que o tratamento T4 se destacou nos dois testes de germinação (Teste 1 e Teste 2), apresentando os maiores valores quando comparado aos demais tratamentos (Tab. 6). Para a testemunha e tratamento T1 não foi contabilizada nenhuma semente germinada para os dois períodos de estratificação, já para o tratamento T3 somente após seis meses de estratificação (Teste 2) foi verificado 1,3% de germinação. Para o tratamento T2 foi verificada germinação nos dois períodos (150 e 180 dias de estratificação), porém em ambos a porcentagem de germinação foi inferior a 1%. O tratamento T4 apresentou germinação média de 17,7%.

#### *Teste de tetrazólio*

Para as três variáveis analisadas no teste de tetrazólio houve interação entre o tratamento e o tempo de estratificação (Tab. 4). As sementes apresentaram viabilidade inicial de 38%. Na Tabela 6 é possível verificar que a quantidade de sementes não íntegras ao final do Teste 1 foi maior para o tratamento T4 (100%). Já a testemunha apresentou o menor valor (69,25%) e ao final do Teste 2, o tratamento T1 apresentou a menor porcentagem (89,5%) e novamente o T4 apresentou o maior valor (99%). Com relação ao tempo de estratificação (150 e 180 dias), nenhum dos tratamentos diferiu estatisticamente, exceto pela testemunha que no Teste 2 apresentou maior porcentagem de sementes não íntegras.

Para a variável porcentagem de sementes viáveis, no Teste 1 a testemunha apresentou maior porcentagem (22%), já os tratamentos T4 e T3 apresentaram os menores valores (0 e 3,25% respectivamente). No teste 2, novamente o tratamento T4 apresentou o menor valor (0,75%), mas não diferiu estatisticamente do tratamento T2 (3,5%) e este último não diferiu dos demais. A porcentagem média de sementes viáveis ao final do período experimental foi de 8,9% para o Teste 1 e 5,1% para o Teste 2 (Tab. 7). Já entre os tempos de estratificação (150 e 180 dias), a testemunha e o tratamento T2 diferiram estatisticamente com maior porcentagem de sementes viáveis no Teste 1 (Tab. 7).

Com relação à porcentagem de sementes não viáveis, após a realização do teste de tetrazólio, no Teste 1 a testemunha apresentou a maior porcentagem (8,75%) e os demais tratamentos não diferiram estatisticamente. Já no Teste 2, o tratamento T1 apresentou maior valor para esta variável. Já entre os dois períodos de estratificação (150 e 180 dias), a testemunha e os tratamentos T1 e T3 diferiram estatisticamente. A testemunha apresentou maior porcentagem de sementes não viáveis no Teste 1, já os tratamentos T1 e T3 apresentaram maiores valores no Teste 2.

## **Discussão**

O tratamento T4 apresentou valores superiores de germinação tanto na estratificação como nos testes de germinação (Teste 1 e Teste 2). Esses resultados indicam que o adubo de liberação controlada influenciou positivamente na superação da dormência de sementes de *I. paraguariensis* por meio da indução do desenvolvimento embrionário e, dessa forma, superando a dormência morfológica, já que somente neste tratamento verificou-se embriões em estágio maduro após 150 dias de estratificação.

O adubo utilizado, somente no tratamento T4 possui a vantagem de disponibilizar nutrientes de forma progressiva ao longo de cinco a seis meses. Dessa forma, os nutrientes, principalmente o nitrato, vão sendo disponibilizados ao longo de todo o período de estratificação, o que possivelmente auxiliou no processo de desenvolvimento embrionário, já que o mesmo possui 8,6% de nitrogênio na forma amoniacal e 7,4% na forma nítrica.

A ação do nitrato sobre a superação da dormência de sementes é devida, provavelmente, ao fato de afetar o metabolismo do ácido abscísico (ABA) (Alboresi *et al.* 2005; Yan & Chen 2020). Esse processo ocorre quando o nitrato é convertido em nitrito pela enzima nitrato redutase e, por meio de outras enzimas pode ser transformado em óxido nítrico (ON), aminoácidos e outros compostos nitrogenados (Bewley *et al.* 2013). O ON é considerado um importante sinalizador no processo germinativo por meio da transcrição de enzimas chaves, fundamentais para a síntese de giberelinas (GA), aumentando os níveis de GAs que, conseqüentemente, atuam na redução dos níveis de ABA (Bethke *et al.* 2007). Giberelina é um elemento chave na redução da dormência e indução da germinação, já que na maioria das espécies a germinação é regulada por estes dois hormônios antagonistas, ABA e GA (Yan *et al.* 2014; Duermeier *et al.* 2018).

O nitrato é considerado capaz de estimular a germinação mesmo estando presente em baixas concentrações, como verificado em *Arabidopsis*, em que 0,1 mM foram suficientes para superação de dormência (Alboresi *et al.* 2005). No entanto, a concentração requerida pode variar entre as espécies, podendo algumas requererem concentrações maiores que

outras. Este nutriente é encontrado com facilidade na maioria dos solos e, juntamente com a luz e temperaturas alternadas são sinalizadores de profundidade em banco de sementes, pois quanto mais próximas as sementes da superfície do solo, maior a disponibilidade de luz, nitrato, etileno e temperaturas alternadas (Yan & Chen 2020).

A estratificação de sementes dormentes é indicada para a superação da dormência morfofisiológica, pois o contato da semente com um substrato úmido reduz a influência dos inibidores de germinação devido a sua lixiviação (Bewley *et al.* 2013), sendo o que ocorre por exemplo no banco de sementes do solo (Baskin & Baskin 2014). Assim, supõe-se que ao longo do processo de estratificação das sementes de erva-mate ocorra a lixiviação dos inibidores da germinação (Mireski *et al.* 2019), fazendo com que a semente esteja apta a germinar. No presente estudo, embora verificada ocorrência de germinação no tratamento T2 e nos testes de germinação (Teste 1 e Teste 2) para o tratamento T2 e T3, a porcentagem foi baixa.

De acordo com os dados das análises estruturais aqui realizadas, essa baixa germinação pode ser ocasionada pela ausência de embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento, como torpedo e maduro. Dessa forma, mesmo a estratificação auxiliando na remoção de inibidores, sem o desenvolvimento do embrião até o estágio maduro não ocorre o processo de germinação. Este fato pode ter contribuído para aumentar a porcentagem de sementes deterioradas e não viáveis observado no teste de tetrazólio (Tab. 7).

Para muitas espécies, a exposição das sementes a temperaturas elevadas seguidas de baixas, simulando temperaturas de verão e inverno, auxiliam na superação da dormência, porém cada espécie tem requerimentos de condições específicas (Baskin & Baskin 2014). As sementes de erva-mate são dispersas durante o verão-outono e germinam, de forma natural, somente na primavera-verão seguinte (Galíndez *et al.* 2018), quando as condições ambientais estiverem adequadas (Bewley *et al.* 2013; Finch-Savage & Footitt 2017). Assim,



nessa espécie os embriões imaturos possuem parte do outono e todo período de inverno para se desenvolver até o estágio maduro para germinar durante a primavera. Para espécies que dispersam sementes no outono e apresentam dormência profunda, a sinalização e sensibilidade à ABA é mais importante que a quantidade de ABA (Finch-Savage & Footitt 2017).

Neste trabalho, o período de estratificação foi de março a setembro, desse modo, as sementes foram expostas tanto a temperaturas baixas quanto altas, com o encerramento do tratamento de estratificação no início da primavera. Para espécies de clima temperado ou subtropical, como é o caso da erva-mate, a dormência é superada lentamente durante o período de inverno, de modo a evitar a germinação durante períodos curtos de temperaturas um pouco mais elevadas, só estando aptas a germinar na primavera (Bewley *et al.* 2013). Isto foi verificado neste trabalho, já que embriões em estágios maduros só foram verificados após 150 dias (cinco meses) de estratificação.

A exposição das sementes a baixas temperaturas pode auxiliar na redução do conteúdo endógeno de ABA, e com isso promover o aumento dos níveis de giberelina e citocinina, que interagem de maneira sequencial para superar a dormência (Bewley *et al.* 2013). Este fato contribui para superar a dormência fisiológica, já a morfológica é superada durante os ciclos de temperaturas mais elevadas, o que favorece o desenvolvimento embrionário (Geneve 2003).

Uma característica comum dos sinais ambientais relacionados com a profundidade da dormência e sua superação é o efeito transcricional sobre a família de genes CYTOCHROME P450 707A (CYP707A) cujos membros catabolizam o ABA, sendo que o aumento na transcrição desses genes é promovido pelo óxido nítrico (Penfield 2017; Yan & Chen 2020). A queda correspondente nos níveis de ABA permite a síntese de GA e os eventos seguintes levam à germinação. Assim como as respostas a outros sinais ambientais, o nitrato interage no metabolismo hormonal das sementes (Penfield 2017). Além disso, para

a espécie *Sisymbrium officinale* o nitrato promoveu a expansão celular do embrião e induziu a ruptura da testa, o que acelera a absorção de água (Toorop 2015). Para as sementes de erva-mate, notou-se no tratamento T4 embriões maiores, com células apresentando maior expansão celular e tecidos em diferenciação, o que em consequência culmina na germinação, aliado a maior mobilização de reservas, principalmente proteínas. Além disso, o aumento nos níveis de GAs induz a síntese de enzimas hidrolíticas, as quais contribuem na ruptura do tegumento e endosperma por meio da mobilização de reservas que auxiliam no crescimento do embrião e na protrusão radicular.

As sementes de erva-mate entram em dormência ainda quando a semente está ligada a planta mãe, e o embrião está no estágio cordiforme, considerado imaturo (Heuser 1999). Em sementes recém-coletadas de erva-mate, foi observado que a maioria apresenta embrião no estágio cordiforme (70,24 %), seguido de cordiforme tardio (23,6 %) e menor percentual em torpedão (2,6 %) e maduro (0,96 %) (Niklas 1987). Para outras espécies do gênero *Ilex*, também foi observada baixa porcentagem de embriões maduros (<10%) (Tsang & Corlett 2005), sendo esta uma característica de espécies da família Aquifoliaceae (Baskin & Baskin 2014).

Em muitos casos, o endosperma da semente madura também está envolvido no controle da germinação, servindo principalmente como barreira no desenvolvimento radicular. Quando ocorre o estímulo à germinação, várias enzimas são ativadas, ocorre o enfraquecimento do endosperma micropilar fazendo com que a radícula consiga se expandir para tecidos adjacentes (Linkies *et al.* 2010). Nas sementes aqui estudadas, foi verificada diminuição na largura das células do endosperma micropilar a partir do estágio de torpedão, com aumento também da cavidade digestora.

A protrusão da raiz primária só ocorre após o embrião atingir o comprimento pré-determinado para a espécie e o endosperma micropilar ter sido suficientemente degradado (Bewley *et al.* 2013), características essas observadas nos embriões classificados neste

trabalho como maduros, com eixo hipocótilo-radícula definido, cavidade digestora com células degradadas e poucos corpúsculos proteicos nas células do endosperma. Estas variações foram observadas nos embriões em estágio de torpedo e maduro após 150 dias de estratificação para o tratamento T4. Para sementes que apresentaram embrião no estágio maduro observou-se que as proteínas do endosperma estão em menor quantidade e mais aglutinadas, pelo fato de que foram mobilizadas para serem utilizadas no desenvolvimento do embrião.

A presença de tegumento estreito e endocarpo lenhoso como observado nas imagens de microscopia eletrônica e de fotomicroscopia é tratada como característica comum em frutos drupóides, em que a função de proteção da semente é realizada pelo endocarpo (Souto & Oliveira 2005). Neste trabalho, foi possível observar a presença de várias camadas de células lignificadas no endocarpo dos pirênios, sendo esta característica destacada por alguns autores como a responsável por dificultar a entrada de água nas sementes de erva-mate (Grigoletti-Júnior *et al.* 1999), dificultar a expansão dos tecidos e, conseqüentemente, o crescimento do embrião (Dolce *et al.* 2010).

A ação de fungos saprófitos, sob condições naturais atua na decomposição do endocarpo dos pirênios da erva-mate favorecendo a germinação (Grigoletti-Júnior *et al.* 1999). Para os pirênios avaliados neste trabalho foi verificada a presença de fungos no endocarpo em todos os tratamentos de estratificação, porém não foi observada germinação em todos eles. A ação de fungos atuando na desestruturação das paredes celulares do endocarpo, pode favorecer a hidratação das sementes e facilitar a entrada de elementos químicos, como os nutrientes presentes no tratamento T4. Porém, somente a presença de hifas de fungos não influenciou diretamente o desenvolvimento embrionário e conseqüentemente não favoreceu a germinação.

A presença dos fungos pode levar ao apodrecimento e morte da semente (Souza *et al.* 2019), fato este evidenciado ao final do período experimental para os dois testes de

germinação (Teste 1 e 2), já que a porcentagem de sementes não íntegras (vazias + deterioradas) aumentou consideravelmente. Antes de iniciar a estratificação o lote apresentou 50% de sementes não íntegras, das quais somente 2% eram vazias. Dessa forma, o aumento ao longo do período de estratificação foi de sementes deterioradas, visto que durante o teste de tetrazólio em todos os tratamentos foi verificada a presença de sementes com endosperma gelatinoso, sem consistência firme, com alterações na coloração, muitas vezes amarelada ou escurecida. Também foi verificado aumento no número de embriões necrosados, com coloração enegrecida.

Como já ressaltado anteriormente, a estratificação auxilia na remoção de inibidores da germinação, porém para o desenvolvimento dos embriões é necessário determinado período. Frente ao aumento da quantidade de sementes deterioradas, provavelmente a superação fisiológica, por meio da remoção de substâncias que inibem a germinação, pode ter ocorrido antes da superação morfológica (embriões maduros), o que pode ter contribuído para a degradação e morte das sementes.

Períodos longos de dormência contribuem para a redução da qualidade das sementes (Yan & Chen 2020). O fato do tratamento T4 ter apresentado maior porcentagem de sementes não íntegras ao final do período experimental provavelmente se deve ao fato de que a maioria das sementes que estavam aptas a germinar (38% de viabilidade inicial pelo tetrazólio) germinaram durante o experimento (germinação na estratificação, Teste 1 e 2) e outras morreram, aumentando a porcentagem de sementes não íntegras.

O uso de  $\text{KNO}_3$  é amplamente recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (RAS) para ser utilizado na superação da dormência de uma ampla gama de espécies (Brasil 2009). Embora estudos realizados utilizando  $\text{KNO}_3$  na superação da dormência de sementes de *I. paraguariensis* durante a estratificação, com a associação de alternância de temperatura e luz obtiveram baixa taxa de germinação (4,2%) (Cuquel *et al.* 1994). No presente trabalho a utilização de adubo de liberação controlada favoreceu o fornecimento de nutrientes ao

longo do período experimental, principalmente nitrato, o que contribuiu positivamente para o desenvolvimento dos embriões e culminou na germinação. Porém, não se descarta a possibilidade de outros nutrientes presentes no adubo estarem envolvidos no processo de superação de dormência e germinação, já que as investigações científicas neste quesito são escassas.

Os dados aqui obtidos demonstraram maior ocorrência de embriões em estágio cordiforme tardio nos tratamentos T2 e T4, confirmando o efeito positivo da estratificação em areia. No tratamento T4 se confirmou a ação efetiva do adubo de liberação controlada no desenvolvimento embrionário em sementes de *Ilex paraguariensis*, através da observação de embriões em estágio de torpedo e maduros, fato também corroborado pela porcentagem de germinação.

Frente aos resultados obtidos no presente estudo é possível aliar substâncias químicas à estratificação, porém mais estudos são necessários, principalmente com relação ao beneficiamento de sementes, para aumentar a viabilidade do lote e posteriormente testar outras concentrações de fertilizante para verificar qual a dose favorece o maior desenvolvimento embrionário em um menor período de tempo. É importante também investigar o efeito dos nutrientes de forma isolada para saber qual a contribuição de cada um neste processo.

## **Conclusão**

Para as condições deste trabalho conclui-se que existe heterogeneidade no desenvolvimento embrionário em sementes nas mesmas condições de maturação. Além disso a redução do tempo para o desenvolvimento do embrião e a consequente germinação, parece depender de condições ambientais específicas, incluindo uma fonte de nutrientes ao longo do período.

## Referências

- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 28: 500-512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01292.x>.
- Baskin CC, Baskin JM. 2014. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. 2nd. Edn. San Diego, Elsevier.
- Batak I, Dević M, Gibal Z, Grubisic D, Poff KL, Konjevic R. 2002. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research* 12: 253-259. <https://doi.org/10.1079/SSR2002118>.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. 2013. *Seeds: physiology of development and germination*. 3rd ed. New York, Springer.
- Bethke PC, Libourel IG, Aoyama N, Chung YY, Still DW, Jones RL. 2007. The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology* 143: 1173-1188. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093435>
- Brasil. 2009. *Regras para análises de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, MAPA/SDA/ACS.
- Cardozo-Junior EL, Morand C. 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health e a review. *Journal of Functional Foods* 21: 440-454. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.010>.

- Catapan MIS. 1998. Influência da temperature, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.. Disertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Chen SY, Chien CT, Hidayati SN, Walck JL. 2014. Taiwanese montane *Sambucus chinensis* seeds require warm stratification contrasting with other congeneric temperate members. *Seed Science Research* 24: 217-228. doi:10.1017/S0960258514000130
- Chen SY, Chou SH, Tsai CC, *et al.* 2015. Effects of moist cold stratification on germination, plant growth regulators, metabolites and embryo ultrastructure in seeds of *Acer morrisonense* (Sapindaceae). *Plant Physiology and Biochemistry* 94: 165-73. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.004>.
- Climate. 2020. Dados climáticos para cidades mundiais. <http://pt.climate-data.org/>. 05 Ago. 2021.
- Coelho GC, Mariath JEA, Schenke LEP. 2002. Populational diversity on leaf morphology of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45: 47-51. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132002000100008>.
- Croge CP, Cuquel FL, Pinto PTM. 2021. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. *Scientia Agricola* 78: e20190259. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0259>
- Cuquel FL, Carvalho MLM de, Chamma HMCP. 1994. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. *Scientia Agricola* 51: 415-421. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161994000300006>.
- Dawidowicz-Grzegorzewska A, Lewak S. 1978. Anatomy, histology and cytology of dormant and stratified apple embryos. I. General observations and changes in the starch content during after ripening of seeds. *New Phytologist* 81: 99-103. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01608.x>

- Dolce NR, Mroginski LA, Rey HY. 2010. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St. -HiL. (Aquifoliaceae) seed germination. *Seed Science and Technology* 38: 441-448. <https://doi.org/10.15258/sst.2010.38.2.17>.
- Feder N, O'Brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-42. <https://doi.org/10.2307/2440500>.
- Duermeyer L, Khodapanahi E, Yan D, Krapp A, Rothstein S, Nambara E. 2018. Regulation of seed dormancy and germination by nitrate. *Seed Science Research* 28: 150-157. doi: <https://doi.org/10.1017/S096025851800020X>
- Finch-Savage WE, Footitt S. 2017. Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. *Journal of Experimental Botany* 68: 843-856. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw477>.
- Galíndez GCD, Bubillo R, Lindow-López L, Malagrina G, Ortega-Baes P, Baskin CC. 2018. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. *Seed Science Research* 28: 131-139. <https://doi.org/10.1017/S0960258518000132>.
- Geneve RL. 2003. Impact of temperature on seed dormancy. *HortScience* 38: 336-341. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.3.336>.
- Grigoletti JA, Zanon A, Auer CG, Fower JAP. 1999. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes, na emergência de plântulas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Boletim de Pesquisa Florestal* 9: 31-39.
- Grzesik M, Górnik K, Janas R, Lewandowki M, Romanowska-Duda Z, Duijn BV. 2017. High efficiency stratification of apple cultivar Ligol seed dormancy by phytohormones, heat shock and pulsed radio frequency. *Journal of Plant Physiology* 219: 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.09.007>.
- Heuser ED. 1999. Embriogênese em *Ilex paraguariensis* A St. Hil. aspectos do suspensor e endosperma. PhD Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.



- Heuser ED, Ferreira AG, Mariath JE de A. 1993. *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 29: 39-48.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book.
- Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G. 2010. The evolution of seeds. New Phytologist 186: 817-831. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03249.x>.
- Meneguetti JCB, Nóbrega LHP, Smanhotto A, Silveira JCM. 2004. Superação da dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) por estratificação. Revista Varia Scientia 4: 157-182.
- Mireski MC, Bühner C de B, Helm CV, et al. 2018. Polyphenols in yerba mate seeds: potential inhibitors of germination. Floresta 48: 593-600. <http://dx.doi.org/10.5380/rev.v48i4.57592>.
- Mireski MC, Guedes RS, Wendling I, Peña MLP, Medeiros AC de S. 2019. Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. Ciência Florestal 29: 1354-1362. <https://doi.org/10.5902/1980509824451>.
- Niklas CO. 1987. Estudios embriológicos y citológicos en la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Bonplandia 6: 45-56. <http://dx.doi.org/10.30972/bon.611504>.
- Penfield S. 2017. Seed dormancy and germination. Current Biology 27: 874-878. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.050>.
- Riachi LG, De Maria CAB. 2017. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. Journal of Functional Foods 38: 308-320. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.020>.
- Santos ECS, Bicca MA, Blum-Silva CH, et al. 2015. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. Neuroscience 292: 13-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.004>.

- Schaparini PS, Viecelli CA. 2011. Superação de dormência de sementes de erva mate. *Cultivando o Saber* 4: 163-170.
- Sobral M, Jarenkow JA, Brack P, Irgang B, Larocca J, Rodrigues RS. 2013. Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. São Carlos, Editora Rima.
- Souto LS, Oliveira DMT. 2005. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 28: 697-712. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000400005>.
- Souza AC de, Oliveira LM de, Souza GF, Schmidt SS, Liesch PP. 2020. Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. samples (Aquifoliaceae). *Floresta e Ambiente* 27: 1-4. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.096017>.
- Souza GF, Oliveira LM, Agostinetto L, Puchale LZ, Sá ACS. 2019. Efeito da estratificação em substrato esterilizado na qualidade sanitária de sementes de *Ilex paraguariensis*. *Ciência Florestal* 29: 1-9. doi: <https://doi.org/10.5902/1980509833194>.
- Toorop PE. 2015. Nitrate controls testa rupture and water content during release of physiological dormancy in seeds of *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. *Seed Science Research* 25: 138-146. <https://doi.org/10.1017/S0960258514000397>.
- Tsang ACW, Corlett RT. 2005. Reproductive biology of the *Ilex* species (Aquifoliaceae) in Hong Kong, China. *Canadian Journal of Botany* 83: 1645-1654. <https://doi.org/10.1139/b05-131>.
- Wendling I, Santin D. 2015. Propagação e nutrição de erva-mate. Brasília, Embrapa.
- Yan A, Chen Z. 2020. The control of seed dormancy and germination by temperature, light and nitrate. *The Botanical Review* 86: 39-75. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09220-4>.
- Yan D, Duermeyer L, Leoveanu C, Nambara E. 2014. The functions of the endosperm during seed germination. *Plant Cell Physiology* 55: 1521-1533. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu089>.

**Tabela 1.** Descrição dos tratamentos de estratificação de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil..

Tratamento	Siglas	Sementes em	Local	Desinfestação sementes	Substrato autoclavado
Testemunha	T	saco de papel	câmara fria	sim	Sim
Tratamento 1	T1	areia + saco algodão	enterrado	não	Não
Tratamento 2	T2	Areia	casa de vegetação	sim	Sim
Tratamento 3	T3	areia + Terra Nobre® + palha de milho	casa de vegetação	sim	Sim
Tratamento 4	T4	areia + Basacote Plus 6M®	casa de vegetação	sim	Sim

**Tabela 2.** Temperatura máxima (T máx), mínima (T mín) e média (T média) em °C e umidade relativa (UR) média (%) registrada na estação meteorológica da Univates em Lajeado – RS, entre março e setembro de 2018.

	T máxima (°C)	T mínima (°C)	T média (°C)	UR média (%)
Março	37,2	13,1	23,4	77
Abril	35,3	16,3	23,5	80
Mai	29,7	5,8	18,5	83
Junho	30,5	2,1	14,1	83
Julho	29,7	5,3	14,8	86
Agosto	30,3	4,2	14,9	79
Setembro	34,6	9,8	19,8	82
Média	32,5	8,1	18,4	81,4

**Tabela 3.** Estágios embrionários das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. submetidas a diferentes tratamentos de estratificação e da testemunha ao longo de 180 dias.

<b>Período (dias)</b>	<b>Cotiledonar</b>	<b>Cordiforme</b>	<b>Cordiforme tardio</b>	<b>Torpedo</b>	<b>Maduro</b>
<b>Testemunha (T)</b>					
0	-	+	-	-	-
30	-	+	+	-	-
60	+	-	-	-	-
90	-	+	-	-	-
120	-	+	-	-	-
150	-	+	-	-	-
180	-	+	-	-	-
<b>Tratamento 1 (T1)</b>					
30	-	+	+	-	-
60	+	-	-	-	-
90	-	+	+	-	-
120	-	+	-	-	-
150	-	+	-	-	-
180	-	+	-	-	-
<b>Tratamento 2 (T2)</b>					
30	-	+	+	-	-
60	-	+	-	-	-
90	-	-	+	-	-
120	-	+	-	-	-
150	+	-	+	-	-
180	-	+	+	-	-
<b>Tratamento 3 (T3)</b>					
30	-	+	-	-	-
60	-	+	-	-	-
90	-	+	+	-	-
120	-	+	-	-	-
150	-	+	-	-	-
180	-	+	+	-	-
<b>Tratamento 4 (T4)</b>					
30	-	+	-	-	-
60	-	+	+	-	-
90	-	+	+	-	-
120	-	+	+	-	-
150	-	+	+	+	+
180	-	+	+	-	+

-ausente; + presente.

**Tabela 4.** Porcentagem de germinação durante a estratificação, porcentagem de germinação a 25 °C, porcentagem de sementes de *Ilex paraguariensis* não íntegras, viáveis e não viáveis aos 180 dias de germinação.

Variáveis analisadas (%)	Tratamento de estratificação	Tempo de estratificação	Interação
	Valor p	Valor p	Valor p
Germinação durante a estratificação	<0,0001*	0,0825 <sup>ns</sup>	0,0825 <sup>ns</sup>
Germinação no a 25°C	<0,0001*	0,2682 <sup>ns</sup>	0,6604 <sup>ns</sup>
Não íntegras	<0,0001*	0,0101*	<0,0001*
Viáveis	<0,0001*	0,0034*	0,0004*
Não viáveis	<0,0001*	0,1250 <sup>ns</sup>	<0,0001*

Germinação durante a estratificação = germinação durante seis meses de estratificação na estufa.

Germinação a 25 °C = germinação durante seis meses à 25 °C no laboratório em germinador tipo Mangelsdorf.

Ns = não significativo; \*5% de significância pelo teste de LSD Fisher.

**Tabela 5.** Porcentagem média de germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação, nos diferentes tratamentos aos 120, 150 e 180 dias de estratificação.

Tratamento de estratificação	Tempo de estratificação			
	120 dias	150 dias	180 dias	Total
Testemunha	0	0	0	0 b
Tratamento 1 (T1)	0	0	0	0 b
Tratamento 2 (T2)	0	0	0,13	0,13 b
Tratamento 3 (T3)	0	0	0	0 b
Tratamento 4 (T4)	6,2	3,2	6,0	15,4 a
% Média de germinação	1,2 <sup>ns</sup>	0,6 <sup>ns</sup>	1,2 <sup>ns</sup>	3,1

ns = não significativo, médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de LSD Fisher a 5% de probabilidade de erro.

**Tabela 6.** Porcentagem de germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. no Teste 1 (150 dias de estratificação + 180 dias de germinação) e Teste 2 (180 dias de estratificação + 180 dias de germinação) nos diferentes tratamentos de estratificação.

Tratamento de estratificação	% Germinação Teste 1	% Germinação Teste 2
Testemunha	0 b	0 b
Tratamento 1 (T1)	0 b	0 b
Tratamento 2 (T2)	0,12 b	0,7 b
Tratamento 3 (T3)	0 b	1,3 b
Tratamento 4 (T4)	15,2 a	20,1 a
Média	3,1	4,4

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de LSD Fisher a 5% de probabilidade de erro.

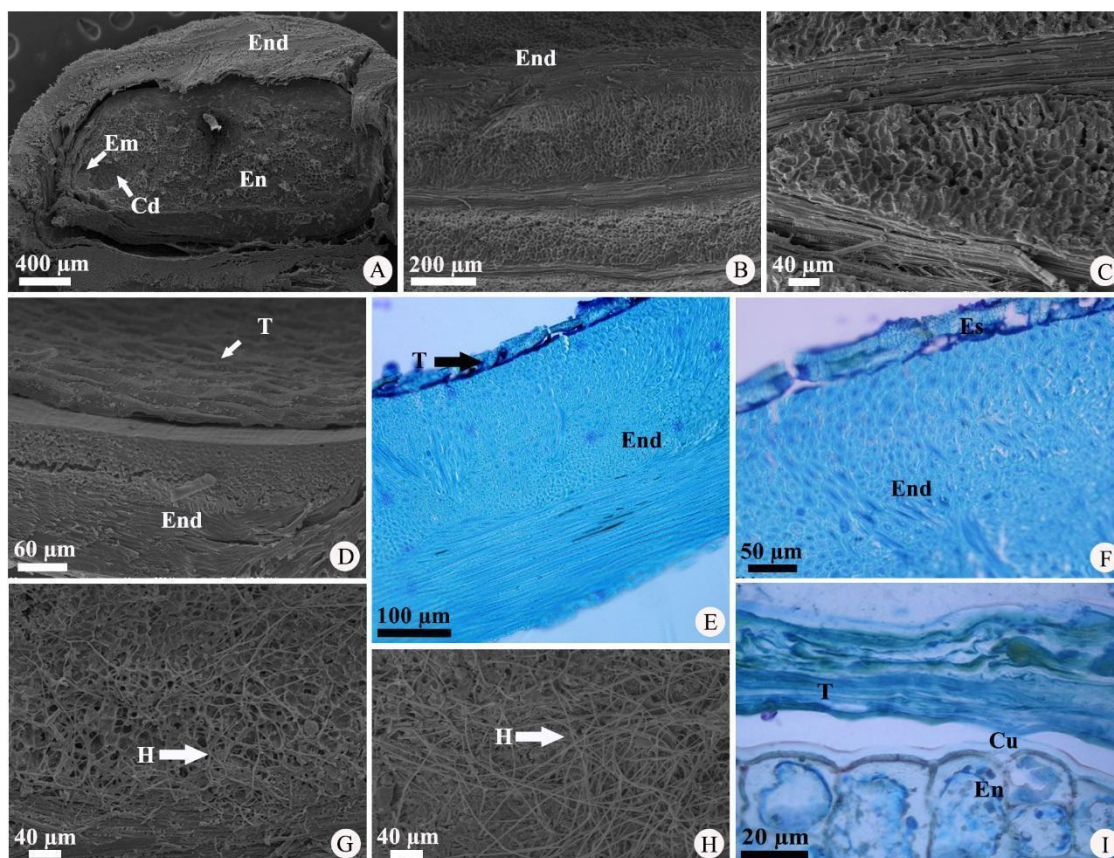
Germinação Teste 1 = aos 150 dias de estratificação das sementes + 180 dias de germinação.

Germinação Teste 2 = aos 180 dias de estratificação das sementes + 180 dias de germinação.

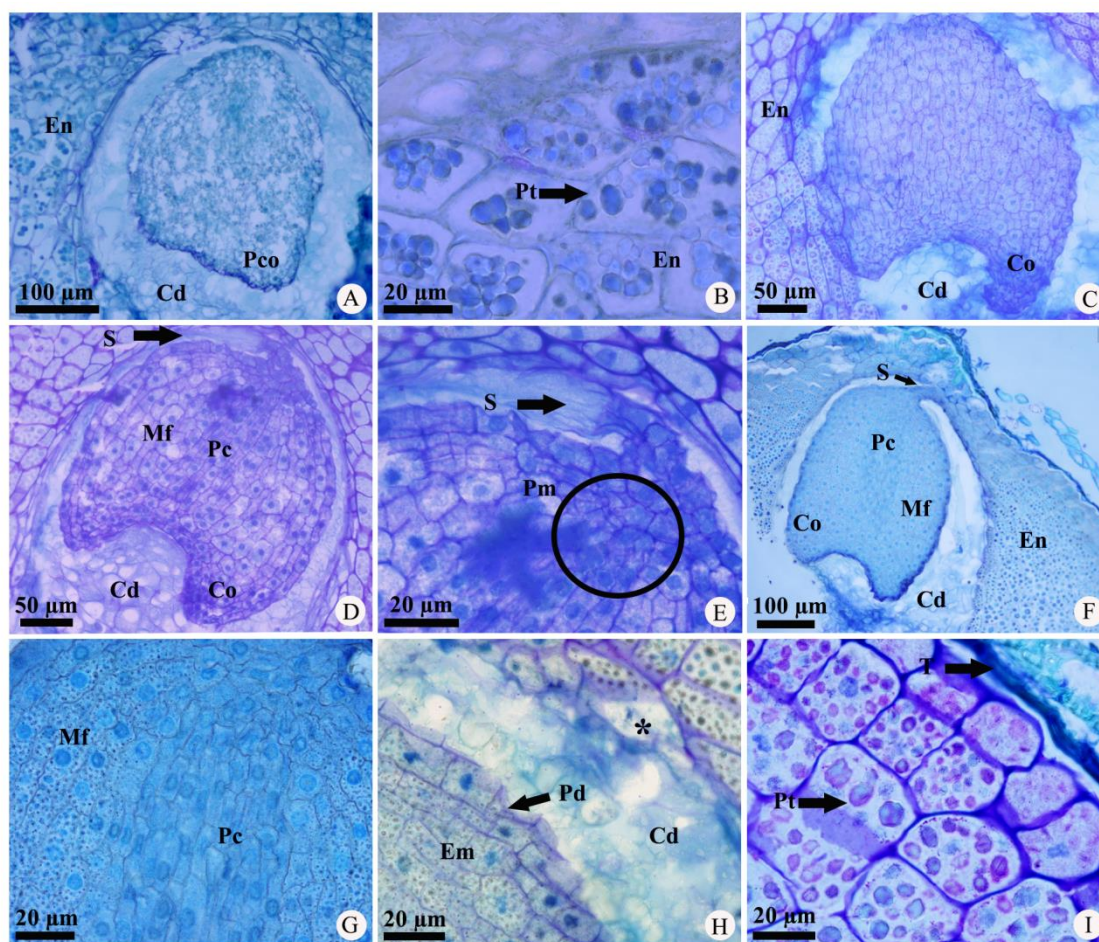
**Tabela 7.** Porcentagem de sementes não íntegras, viáveis e não viáveis de *Ilex paraguariensis* A. St.Hil. para o Teste 1 (150 dias de estratificação + 180 dias de germinação) e Teste 2 (180 dias de estratificação + 180 dias de germinação) com diferentes métodos de estratificação.

Tratamento estratificação	% Não íntegras		% Viáveis		% Não Viáveis	
	Teste 1	Teste 2	Teste 1	Teste 2	Teste 1	Teste 2
T	69,25 d B	90,50 b A	22,00 a A	7,75 a B	8,75 a A	1,75 b B
T1	90,50 bc A	89,50 c A	9,00 b A	6,25 a A	0,50 b B	4,25 a A
T2	89,75 c A	96,25 ab A	10,25 b A	3,50 ab B	0,00 b A	0,25 c A
T3	96,75 ab A	91,25 bc A	3,25 c A	7,25 a A	0,00 b B	1,50 b A
T4	100,00 a A	99,00 a A	0,00 c A	0,75 b A	0,00 b A	0,25 c A
Média	89,3	93,3	8,9	5,1	1,9	1,6

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de LSD Fisher, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

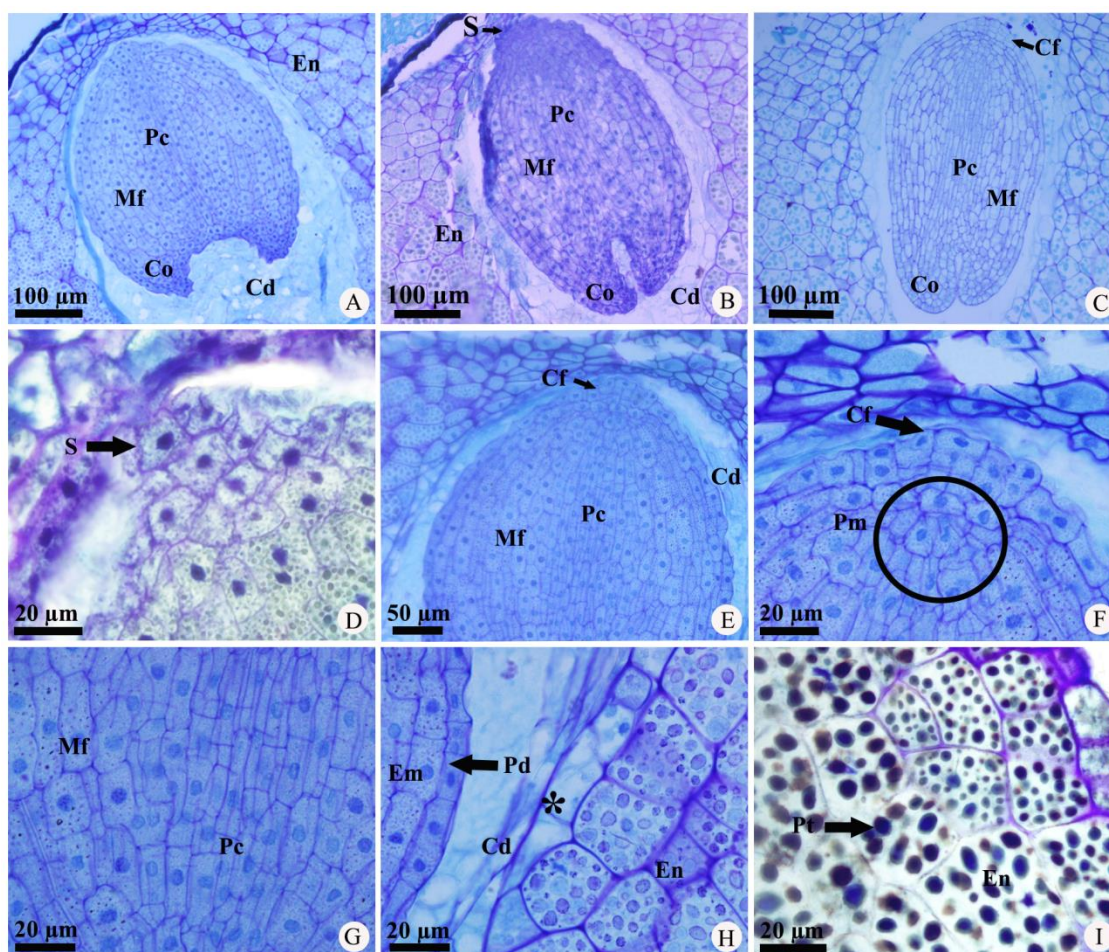


**Figura 1.** Eletromicroscopias (A-C, D, G-H) e fotomicrografias (E-F, I) de seções longitudinais de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação. **A.** Visão geral da semente (C - 150 dias). **B-C.** Endocarpo, visão geral e detalhe, respectivamente (C - 0 dia). **D.** Visão geral do endocarpo e tegumento (T4 - 120 dias). **E.** Visão geral do endocarpo (C - 0 dia). **F.** Detalhe do endocarpo (T3 - 180 dias). **G-H.** Detalhe do endocarpo com hifas de fungos. G. T3 - 60 dias. H. T4 - 180 dias. **I.** Detalhe do tegumento (T4 - 30 dias). (Cd = cavidade digestora, Cu = cutícula, Em = embrião, Em = endosperma, End = endocarpo, H = hifas de fungo, T = tegumento).

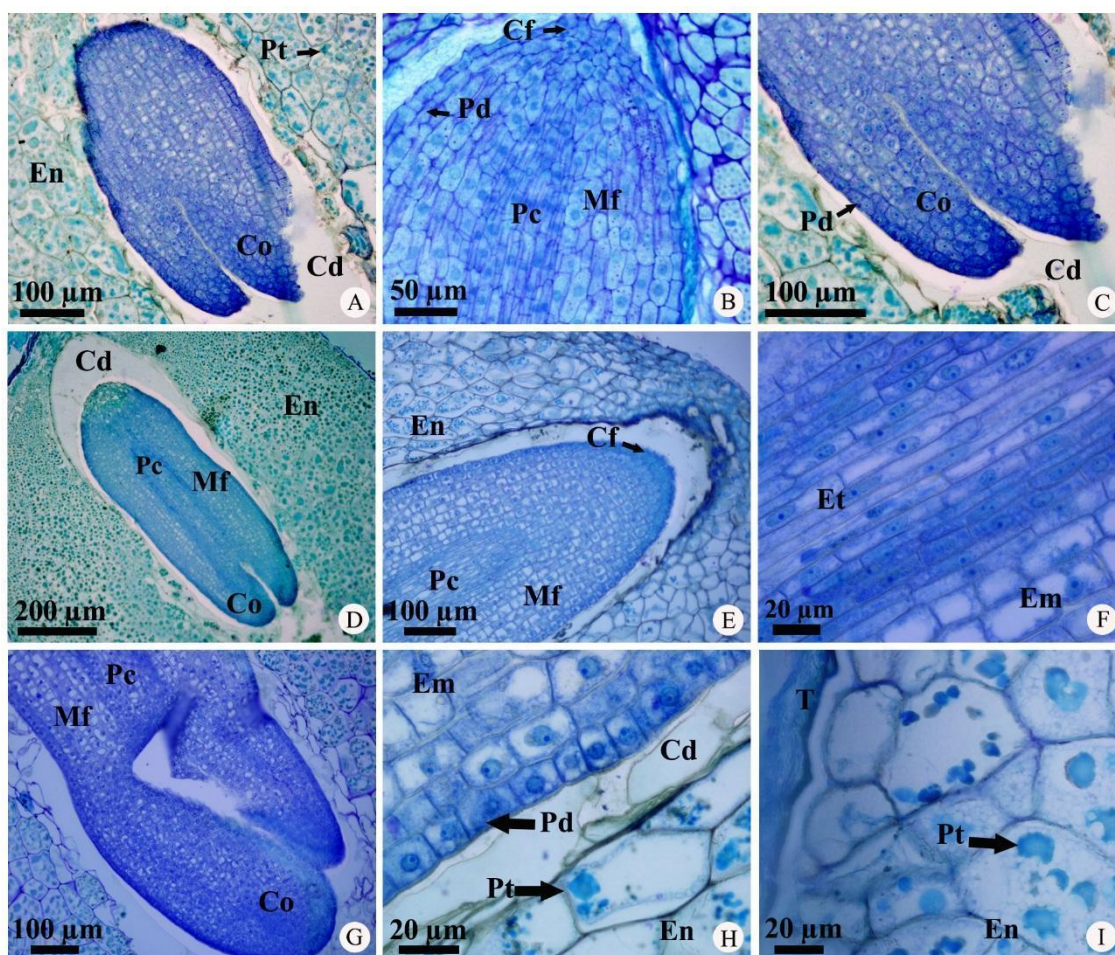


**Figura 2.** Fotomicrografias de secções longitudinais de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação, ilustrando embriões nos estágios cotiledonares. **A.** visão geral do embrião em estágio cotiledonar (T2- 150 dias). **B.** detalhe das células do endosperma (T2- 150 dias). **C.** visão geral do embrião em estágio cordiforme (T3- 120 dias). **D-E.** visão geral e detalhe de embrião, respectivamente, com destaque para o suspensor (T4 - 150 dias). **F.** visão geral do embrião com suspensor (T1- 90 dias). **G.** detalhe das células meristemáticas do procâmbio e meristema fundamental (T1- 90 dias). **H.** detalhe da cavidade digestora e células da protoderme (T3- 120 dias). **I.** detalhe das células do endosperma (T3- 120 dias). (Cd = cavidade digestora, Co = cotilédone, Em = embrião, En = endosperma, Mf = meristema fundamental, Pc = procâmbio, Pco = primórdio cotiledonar, Pd = protoderme, Pm = promeristema, Pt = proteína, S = suspensor, T = tegumento, \* = células em degradação).





**Figura 3.** Fotomicrografias de secções longitudinais de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação, ilustrando embriões no estágio cordiforme tardio nos tratamentos de estratificação T3 e T4. A-C. Visão geral do embrião. **A.** T3 aos 180 dias. **B.** T4 aos 150 dias. **C.** T3 aos 30 dias. **D.** detalhe do suspensor (T4 aos 150 dias). **E.** detalhe da região basal do embrião (T3 aos 180 dias). **F.** detalhe da coifa e pró-meristema (T3 aos 180 dias). **G.** detalhe das células do procâmbio e do meristema fundamental (T3-180 dias). **H.** Detalhe da cavidade digestora e das células da protoderme (T3 aos 180 dias). **I.** detalhe das células do endosperma (T4 aos 150 dias). (Cd=cavidade digestora, Cf=coifa, Co=cotilédone, Em=embrião, Em = endosperma, Mf = meristema fundamental, Pc = procâmbio, Pm = promeristema, Pd = protoderme, Pt = proteína, S = suspensor, \* = células em degradação).



**Figura 4.** Fotomicrografias de secções longitudinais das sementes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. durante a estratificação, ilustrando embriões no estágio de torpeda aos 150 dias e maduros aos 180 dias de estratificação para o tratamento T4. A. visão geral do embrião em estágio de torpeda. B. detalhe da região do eixo radicular do embrião. C. detalhe dos cotilédones. D. visão geral do embrião em estágio maduro. E. detalhe da região do eixo radicular do embrião. F. detalhe da região procambial com elementos traqueais em diferenciação. G. detalhe dos cotilédones. H. detalhe das células da protoderme e do endosperma. I. detalhe das células do endosperma. Cd=cavidade digestora; Cf=coifa; Co=cotilédone; Em=embrião; En=endosperma; Et=elementos traqueais, Mf=meristema fundamental; Pc=procâmbio; Pd=protoderme; Pt=proteína; T=tegumento.

## **8 CAPÍTULO 6**

### **Fertilizante de liberação controlada no crescimento de mudas de erva-mate\***

\*Artigo formatado conforme as normas da Revista Bosque.

## RESUMO

Para a obtenção de mudas de erva-mate de qualidade e plantas produtivas com alto padrão de matéria-prima é de suma importância a nutrição adequada das mudas nos viveiros. O manejo da adubação é um dos principais fatores que contribuem para a maior qualidade das mudas, sobrevivência e crescimento após o plantio no campo. Fertilizantes de liberação controlada de nutrientes podem ser utilizados como adubação de base na produção de mudas de erva-mate. O objetivo foi avaliar o crescimento e a qualidade de mudas de *Ilex paraguariensis* submetidas a doses de fertilizante de liberação controlada, de forma a definir a dose mais indicada para essa fase da cultura. Para todas as variáveis analisadas foi verificado efeito significativo do tratamento, indicando resposta positiva da espécie à adubação. Doses crescentes de fertilizante de liberação controlada proporcionaram aumentos na altura, diâmetro do coleto, relação altura e diâmetro do coleto, número de folhas, área foliar, massa seca da parte aérea, radicular e total, relação massa seca parte aérea e radicular, relação altura e massa seca parte aérea e índice de qualidade de Dickson, em comparação com as mudas de erva-mate não fertilizadas. Adubação de liberação controlada favorece o crescimento e a qualidade das mudas de erva-mate. Doses a partir de 6 g L<sup>-1</sup> de fertilizante Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4) podem ser utilizadas na adubação de base das mudas.

*Key words:* Basacote, *Ilex paraguariensis*, atributos morfológicos.

Controlled-release fertilizer on the growth of yerba mate seedlings

## SUMMARY

To obtain quality seedlings of yerba mate and productive plants with a raw-material high standard, it is necessary the adequate nutrition for the seedlings in the nurseries. Fertilization management is one of the key factors that contribute to the better quality of seedlings, survival, and growth after planting in the field. Controlled nutrient-release fertilizer can be used as base fertilizers in the production of yerba mate seedlings. The objective of this work was to evaluate the growth and quality of *Ilex paraguariensis* seedlings subjected to doses of controlled-release fertilizer, in order to define the most suitable dose for this stage of the crop. For all analyzed variables a significant treatment effect was observed, indicating a positive response of the species to fertilization. Increasing doses of controlled-release fertilizer provided increments in height, collar diameter, height and collar diameter ratio,

leaves number, leaf area, shoot, root and total dry mass, shoot and root dry mass ratio, height and shoot dry mass ratio and Dickson quality index, compared to unfertilized yerba mate seedlings. Controlled release fertilization promotes the growth and quality of yerba mate seedlings. Doses from 6 g L<sup>-1</sup> of Basacote® Mini 6M fertilizer (13-6-16 + 1.4) can be used in the base fertilization of the seedlings.

*Key words:* Basacote, *Ilex paraguariensis*, morphological attributes.

## INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Aquifoliaceae) conhecida como erva-mate é uma espécie arbórea, nativa no Brasil (Flora do Brasil 2020), com distribuição geográfica associada, em sua grande maioria, ao Domínio Atlântico, com caráter subtropical e temperado úmido (Silva *et al.* 2018). Além do uso tradicional na forma de bebidas como chimarrão e tererê, sua composição química tem potencial para ser utilizada em conservantes e suplementos alimentares, corantes, produtos de higiene e cosméticos (Croge *et al.* 2021).

Para a obtenção de mudas com qualidade genética, fisiológica e sanitária e, conseqüentemente, plantas produtivas com alto padrão de matéria-prima (Duarte *et al.* 2019), é de suma importância a nutrição adequada das mudas nos viveiros, pois o manejo da adubação de base ou de cobertura é um dos principais fatores que contribuem para a maior qualidade das mudas, sobrevivência e crescimento após o plantio no campo (Araújo *et al.* 2018). Porém, para a maioria das espécies nativas, as informações são escassas (Emer *et al.* 2020).

O setor produtivo da erva-mate ainda carece de informações básicas, principalmente no que diz respeito à produção de mudas. Além disso, alguns trabalhos ainda utilizam solo como substrato no cultivo em recipientes (Schaffer *et al.* 2015, Zavistanovicz *et al.* 2017). Cada vez mais são estudadas fontes alternativas como substratos à base de lodo de esgoto e resíduo de carvão (Gabira *et al.* 2020b), misturas de fibra de coco e subprodutos industriais, incluindo os oriundos de resíduos do processamento de erva-mate (Gabira *et al.* 2020a).

Contudo, o suprimento de elementos minerais se faz necessário, pois na maioria dos casos, o substrato não apresenta os nutrientes em quantidades adequadas para um bom desenvolvimento das mudas. O uso de fertilizantes de liberação controlada é considerado uma alternativa como fonte de nutrientes para espécies florestais produzidas em viveiros, pois induzem rápido crescimento inicial e apresentam menores perdas das mudas após o plantio no campo (Araújo *et al.* 2019).

Os fertilizantes de liberação controlada disponibilizam os nutrientes de forma gradual às plantas por meio de mecanismos de difusão controlada, apresentam baixas perdas por lixiviação e reduzem a salinização do ambiente nos viveiros. O uso adequado desses fertilizantes apresenta maiores benefícios agronômicos e ambientais em comparação com as práticas de fertilização convencional (Shaviv 2000).

Na produção de mudas de erva-mate, a utilização desse tipo de fertilizante ainda é incipiente. Zavistanovicz *et al.* (2017) utilizaram 6 g L<sup>-1</sup> de Osmocote® 15-09-12 e verificaram desempenho similar quando comparado à adubação convencional com 0,7 g L<sup>-1</sup> de ureia, 8,0 g L<sup>-1</sup> de superfosfato simples e 0,4 g L<sup>-1</sup> cloreto de potássio. Gortari *et al.* (2020) recomendam adicionar 3 kg m<sup>-3</sup> de Plantacote® Plus 6M ao substrato casca de pinus compostada para a produção de mudas de erva-mate propagadas por sementes e estacas.

A qualidade das mudas produzidas em viveiro pode ser avaliada por atributos morfológicos facilmente mensuráveis como altura, diâmetro do coleto e número de folhas, sendo avaliações não destrutivas que podem ser obtidas ao longo do tempo. Também podem ser utilizados métodos destrutivos como: matéria seca, área foliar, comprimento e volume de raiz (Landis *et al.* 2010; Araújo *et al.* 2018). Por meio dos dados dos atributos morfológicos é possível calcular índices como a relação da altura e diâmetro do coleto, relação da altura e massa seca da parte aérea, relação massa seca da parte aérea e massa seca radicular e índice de qualidade de Dickson (Dickson *et al.* 1960, Gomes *et al.* 2002).

Assim, a hipótese do trabalho é de que a utilização de fertilizantes de liberação controlada de nutrientes pode ser utilizada como adubação de base na produção de mudas de erva-mate. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o crescimento e a qualidade de mudas de *I. paraguariensis* submetidas a doses de fertilizante de liberação controlada, de forma a definir a dose mais indicada para essa fase da cultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de erva-mate coletadas em janeiro de 2018 em Arvorezinha, RS (28° 50' 56" S 52° 14' 14" W) foram colocadas para estratificar por seis meses em bandejas de polietileno brancas (192 x 116 x 64 mm) com areia acrescida de 4,0 g L<sup>-1</sup> de adubo de liberação controlada Basacote Plus 6M® (16-8-12 + 2). Após, as mudas foram semeadas em tubetes cônicos de polipropileno, com capacidade de 110 cm<sup>3</sup>, contendo substrato comercial à base de turfa de *Sphagnum* (Tabela 1) e diferentes tratamentos de adubação. Em cada tubete foram semeadas cinco sementes.

Para os tratamentos de adubação utilizou-se fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4), com granulometria de 1,0 a 2,5 mm e duração efetiva de 6 meses (Tabela 1). Utilizaram-se as dosagens: zero (testemunha), 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 g L<sup>-1</sup>, incorporadas ao substrato antes do preenchimento dos tubetes. Não foi realizada adubação de cobertura e a irrigação foi por aspersão, com vazão de 8 a 20 mm dia<sup>-1</sup>, conforme a necessidade das plantas observada por monitoramento por no mínimo três vezes por semana. O experimento foi mantido em casa de vegetação e as bandejas com os tubetes foram cobertos com tela de sombreamento preta com interceptação luminosa de 50%, disposta 50 cm acima da parte superior das bandejas, durante sete meses, sendo retirada nos últimos 30 dias de cultivo.

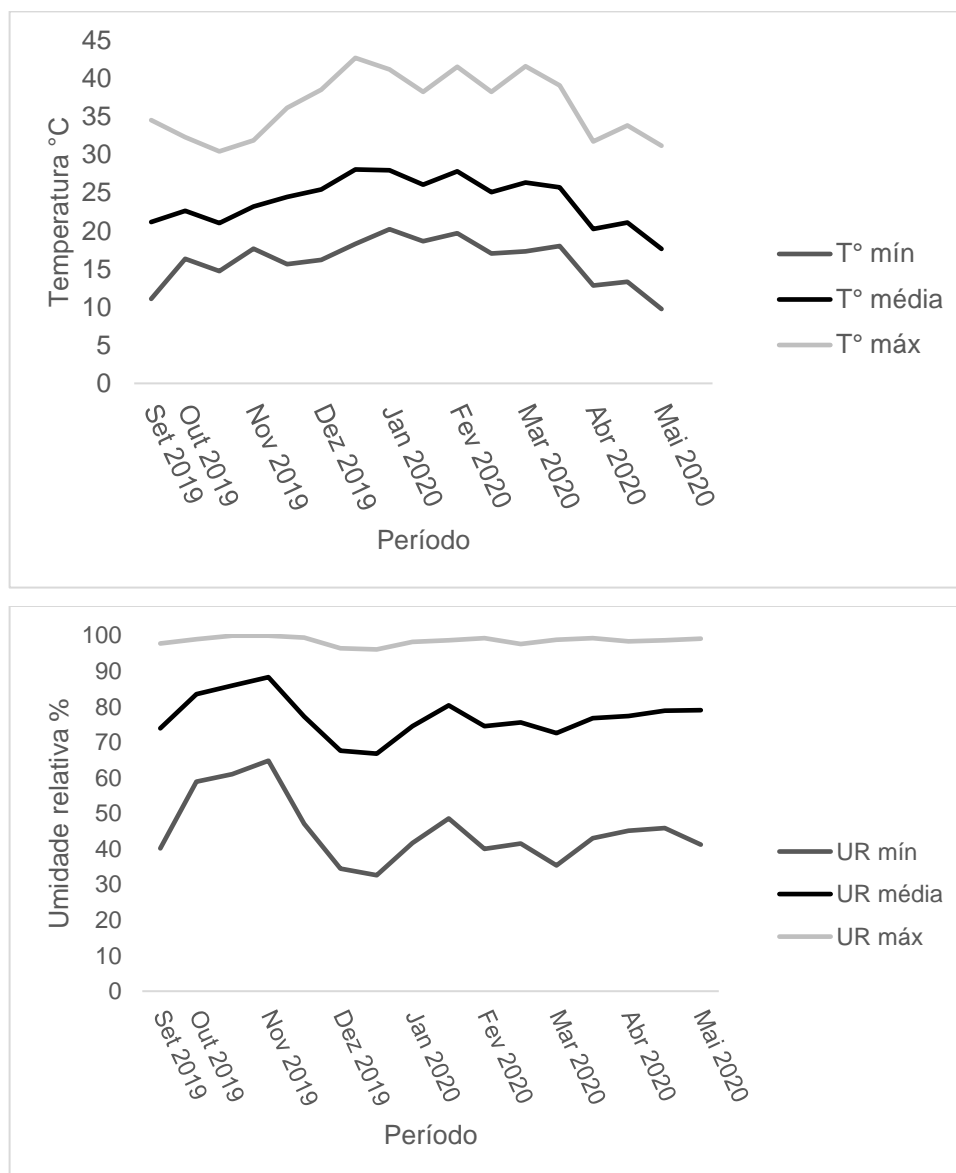
**Tabela 1** Características químicas do fertilizante de liberação controlada e características físicas e químicas do substrato comercial utilizado na produção de mudas de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.).

Basacote® Mini 6M (13-6-16 +1,4)		Substrato comercial	
N (%)	13 total*	Características físicas	
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	6	DS (kg m <sup>-3</sup> )	135,76
K <sub>2</sub> O (%)	16	PT (%)	77,84
S (%)	10	EA (%)	21,24
B (%)	0,02	AFD (%)	16,82
Cu (%)	0,05	AT (%)	3,43
Fe (%)	0,26	AR (%)	36,35
Mn (%)	0,06	Características químicas	
Mo (%)	0,015	CE	0,1 mS cm <sup>-1</sup>
Zn (%)	0,02	pH	6,01

\*8% de N na forma amoniacal e 5% de N na forma nítrica; DS=densidade seca; PT=porosidade total; EA=espaço de aeração; AFD=água facilmente disponível; AT=água tamponante; AR=água remanescente; CE=condutividade elétrica obtida em solução 1:5 (v/v); pH=determinado em água, diluição 1:5 (v/v).

O período de estratificação foi de março a setembro de 2019 e a produção de mudas foi de setembro de 2019 a maio de 2020. A temperatura mínima (T° mín), média (T° média) e máxima (T° máx), umidade relativa mínima (UR mín), média (UR média) e máxima (UR

máx) durante o período do desenvolvimento das mudas foram monitoradas utilizando um datalogger AK174 Akso® (Figura 1).



**Figura 1** Temperatura e umidade relativa (%) mínimas, médias e máximas durante o período do desenvolvimento das mudas de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.).

Após oito meses de cultivo, foram obtidos os dados de altura das mudas (H) (cm) (distância do coleto até a gema apical) com o uso de uma régua milimetrada; diâmetro do coleto (DC) (mm) mensurado com paquímetro digital (0,01 mm); número de folhas (NF); área foliar (AF) (cm<sup>2</sup>) a partir da separação das folhas do caule e da sua disposição sobre uma superfície escura para tomada de imagem fotográfica, seguido de análise pelo programa ImageJ (cm<sup>2</sup>) (Zavistanovicz *et al.* 2017; Araújo *et al.* 2018). Para a obtenção dos dados de massa seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR) (g), a parte aérea foi separada do



sistema radicular, seguido de lavagem das raízes em água corrente para retirada do excesso de substrato. Em seguida, foram acondicionados separadamente em sacos de papel para secagem em estufa a 65 °C até atingir peso constante. Posteriormente foram pesados em balança analítica (0,00001 g). A massa seca total (MST) foi obtida pela soma da massa seca da parte aérea e do sistema radicular (g).

A seguir foram calculadas a relação da altura da parte aérea (cm) e do diâmetro do coleto (mm) (RHDC) (Dickson *et al.* 1960), a relação entre a altura e a massa seca da parte aérea (RHMSPA) e a relação da massa seca da parte aérea e radicular (RMSPAR), dividindo os valores entre si. (Gomes *et al.* 2002).

O Índice de Qualidade de Dickson (IQD) (Dickson *et al.* 1960) foi calculado pela fórmula 1:

$$IQD = \frac{PMST}{\frac{H}{DC} + \frac{PMSPA}{PMSR}} \quad [1]$$

Em que:

PMST – Peso Massa Seca Total (g)

H – Altura da parte aérea (cm)

DC – Diâmetro do Coleto (mm)

PMSPA – Peso Massa Seca Parte Aérea (g)

PMSR – Peso Massa Seca Raízes (g)

Além disso, foi calculado o custo de produção de 1000 mudas para as diferentes doses de fertilizante, considerando somente o custo do fertilizante em dólar (cotação julho/2021).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições, com nove mudas em cada repetição. Os dados de H, DC, RHDC, NF, AF, MSPA, MSR, MST, RMSPAR, RHMSPA e IQD foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando verificada significância, as médias foram analisadas por regressão pelo software SigmaPlot 11.0. Os dados de AF, MSPA, MSR, MST e IQD não atenderam o pressuposto da normalidade, sendo transformados para  $\log \frac{x}{10}$ . O mesmo aconteceu com a RHMSPA, que foi transformada para  $\sqrt{x} + 10$ , porém os resultados são apresentados em seus valores absolutos.

## RESULTADOS

Para todas as variáveis analisadas foi verificado efeito significado dos tratamentos, indicando resposta positiva da espécie à adubação. Doses crescentes de fertilizante de liberação controlada proporcionaram aumentos na H, DC, RHDC, NF, AF, MSPA, MSR,

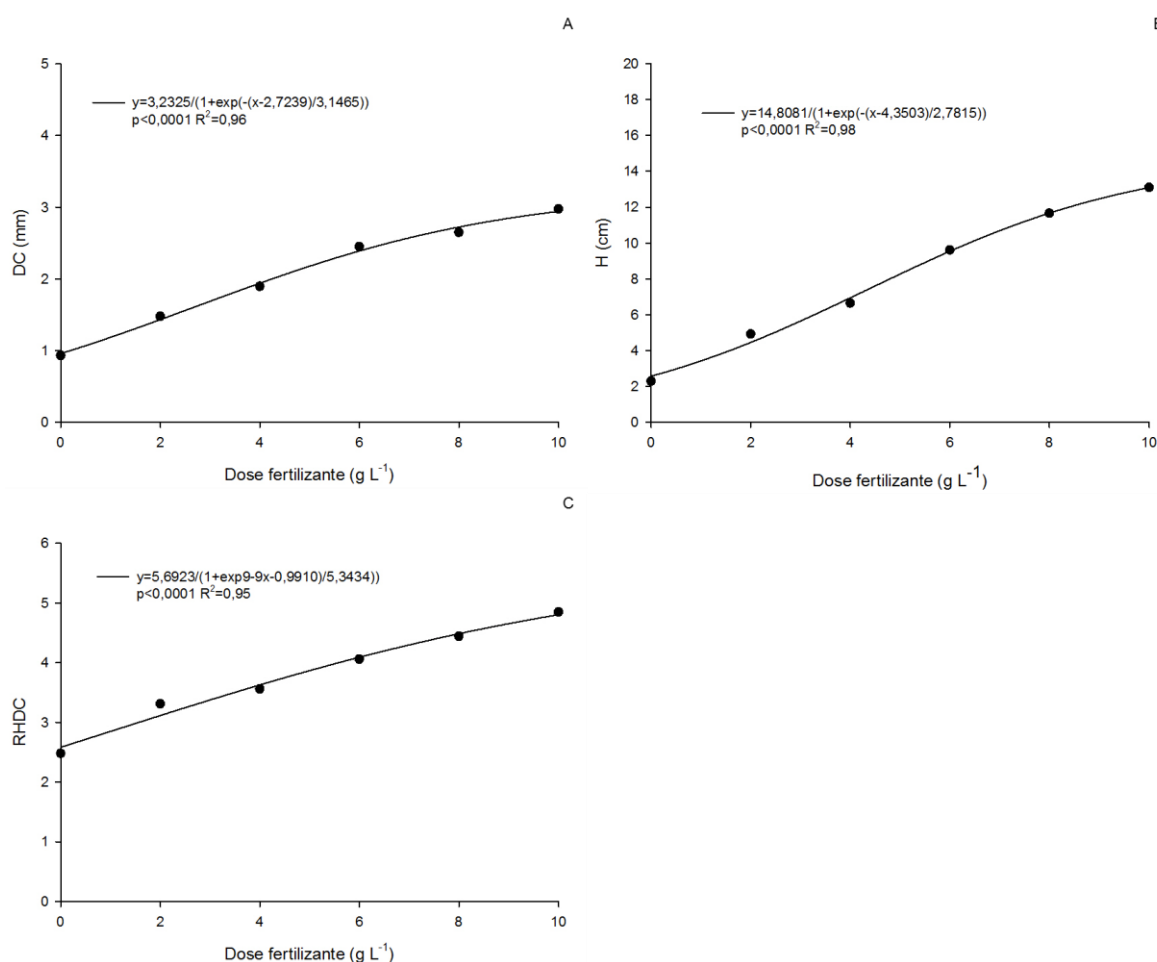
MST, RMSPAR, RHMSPA e IQD em comparação com as mudas de erva-mate não fertilizadas (Tabela 2).

**Tabela 2** Análise de variância do desenvolvimento de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) adubadas com diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4).

Variáveis	p valor	CV (%)	Média geral	Transformado para
H (cm)	<0,001	11,09	8,04	-
DC (mm)	<0,001	11,54	2,06	-
RHDC	<0,001	6,90	3,71	-
NF	<0,001	12,66	7,58	-
AF (cm <sup>2</sup> )	<0,001	14,28	59,14	log(x/10)
MSPA (g)	<0,001	5,87	0,48	log(x/10)
MSR (g)	<0,001	6,45	0,21	log(x/10)
MST (g)	<0,001	6,39	0,69	log(x/10)
RMSPAR	<0,001	15,57	1,95	-
RHMSPA	<0,001	7,74	57,82	raiz(x+10)
IQD	<0,001	4,96	0,11	log(x/10)

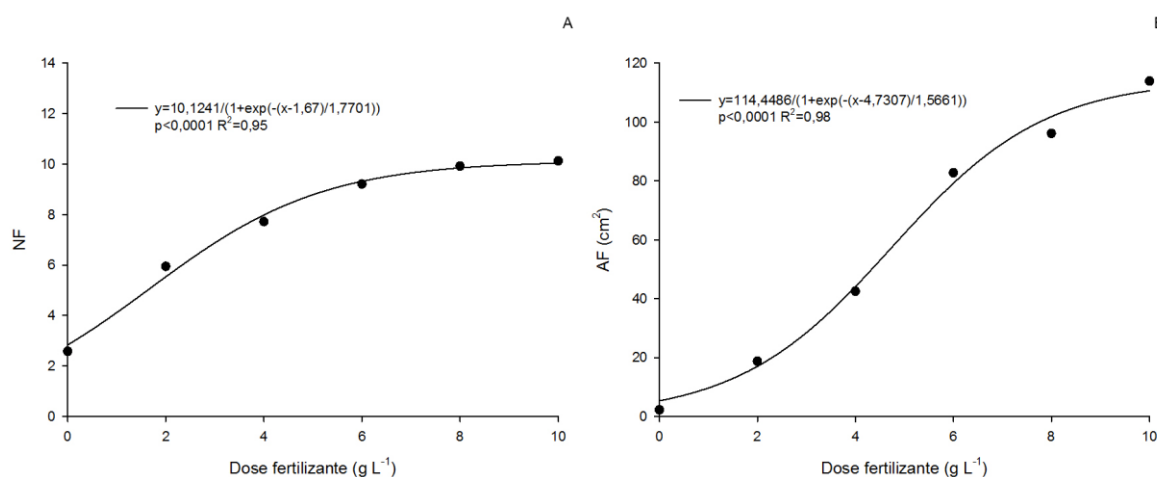
CV=coeficiente de variação; H=altura; DC=diâmetro do coleto; RHDC=relação altura e diâmetro do coleto; NF=número de folhas; AF=área foliar; MSPA=massa seca da parte aérea; MSR=massa seca radicular; MST=massa seca total; RMSPAR=relação massa seca da parte aérea e radicular; RHMSPA=relação altura e massa seca da parte aérea; IQD=Índice de Qualidade de Dickson.

As mudas sem adubação apresentaram menor altura (2,3 cm) e à medida que foi aumentada a dose do fertilizante foi verificado um incremento para esta variável, sendo observada a maior altura (13,1 cm) na maior concentração do fertilizante (10 g L<sup>-1</sup>) (Figura 2A). Comportamento similar foi observado para o diâmetro do coleto, sendo que as mudas apresentaram 2,98 mm de diâmetro na maior concentração (10 g L<sup>-1</sup>) contra 0,93 mm da testemunha (0 g L<sup>-1</sup>) (Figura 2B). Para a RHDC foi observada variação de 2,5 a 4,8 para a testemunha e a máxima concentração do fertilizante, respectivamente (Figura 2C).



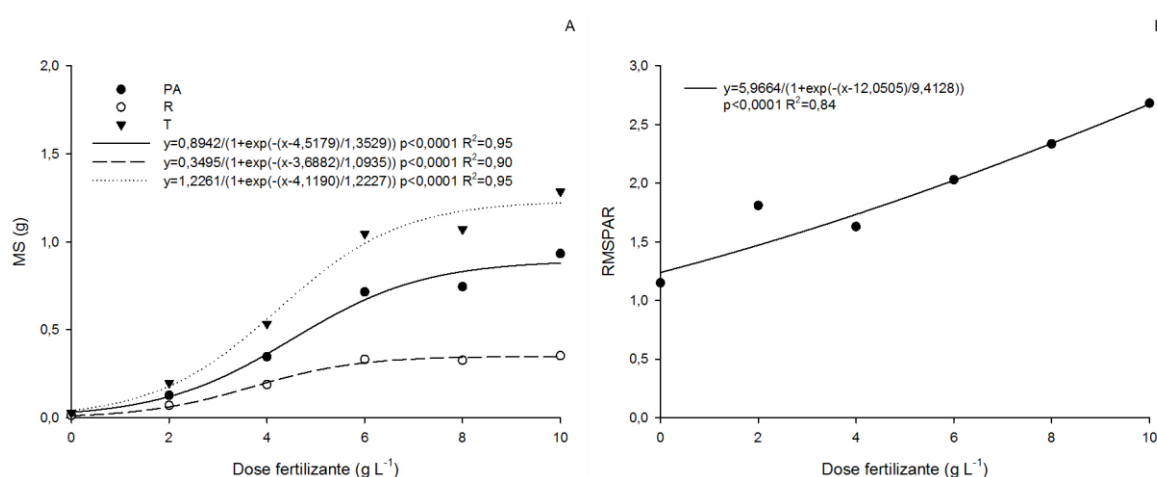
**Figura 2** Altura (H) (cm) (A), diâmetro do coleto (DC) (mm) (B) e relação altura e diâmetro do coleto (RHDC) de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) adubadas com diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4).

Para o número de folhas, o tratamento sem aplicação de adubo resultou em 2,6 folhas por planta, à medida que a dose do fertilizante aumentou houve incremento desta variável. Com 6 g L<sup>-1</sup> de fertilizante, as plantas apresentaram 9,2 folhas e 10,1 folhas com 10 g L<sup>-1</sup>, indicando uma estabilização para esta variável a partir de 6 g L<sup>-1</sup> (Figura 3A). Para a área foliar, à medida que as plantas possuíam mais folhas, estas se apresentaram maiores. Na testemunha, as mudas apresentaram 2,2 cm<sup>2</sup> de área foliar, com 4 g L<sup>-1</sup> apresentaram 42,5 cm<sup>2</sup>, e com 6 g L<sup>-1</sup> houve um incremento de 105% (82,7 cm<sup>2</sup>). Na maior concentração do fertilizante, as mudas apresentaram a maior área foliar (113,9 cm<sup>2</sup>) (Figura 3B).



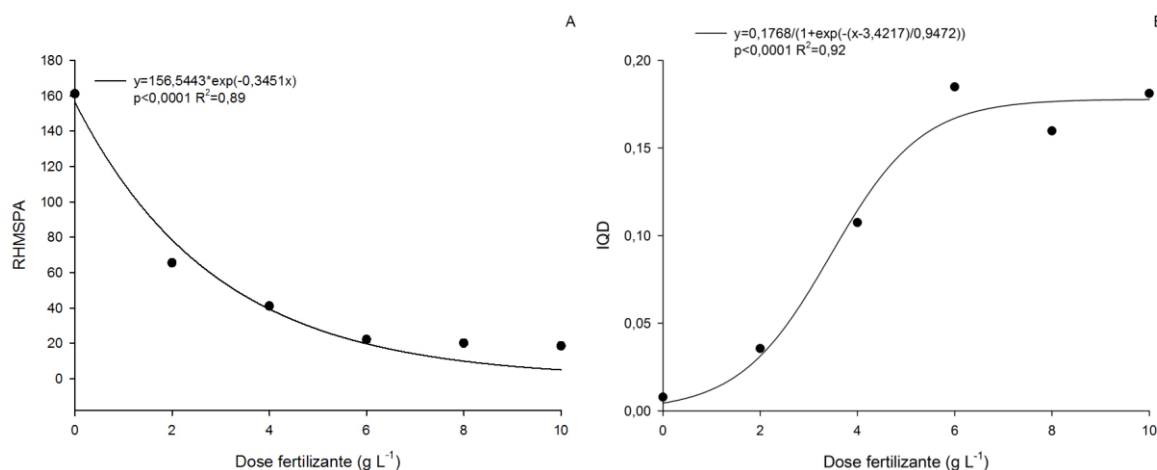
**Figura 3** Número de folhas (NF) (A) e área foliar (AF) (cm<sup>2</sup>) (B) de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) adubadas com diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4).

A massa seca da parte aérea, radicular e total apresentaram comportamento similar, com menor acúmulo de massa seca na testemunha. A partir de 6 g L<sup>-1</sup> o acúmulo de massa seca da parte aérea, radicular e total aumentou consideravelmente quando comparado às concentrações inferiores (Figura 4A). Com 6 g L<sup>-1</sup>, as plantas apresentaram 0,72 g de MSPA, 0,33 g de MSR e 1,05 g de MST e com 10 g L<sup>-1</sup> de adubo, os valores foram 0,93 g, 0,35g e 1,28 g, respectivamente. A RMSPAR foi de 1,1 a 2,7 e, novamente o menor valor foi para o tratamento sem adubo e o maior para a máxima dose testada (10 g L<sup>-1</sup>) (Figura 4B). A partir de 6 g L<sup>-1</sup> a relação foi maior que 2,0.



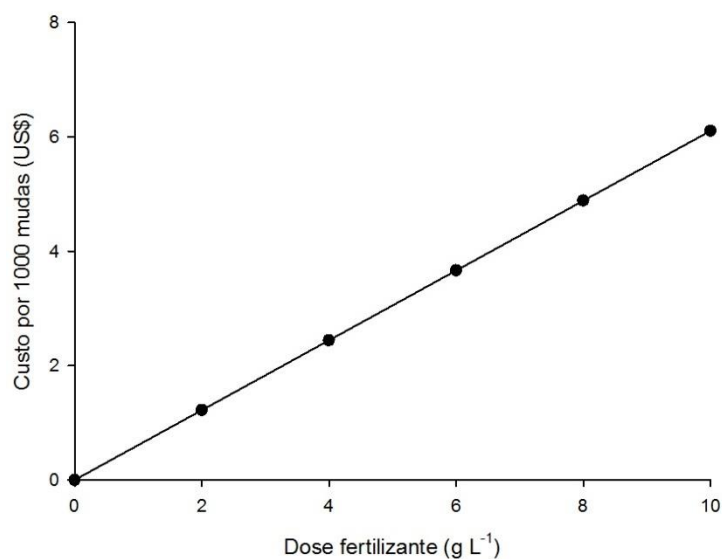
**Figura 4** Massa seca da parte aérea (MSPA), radicular (MSR) e total (MST) (g) (A) e relação entre massa seca da parte aérea e massa seca radicular (RMSPAR) (B) de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) adubadas com diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4).

Para RHMSPA foi verificado que quanto maior a concentração do adubo, menor foi a relação entre as duas variáveis (Figura 5A). Para o tratamento sem adubo esta relação foi de 161,2 e com 10 g L<sup>-1</sup> de Basacote o valor foi de 18,5. O índice de qualidade de Dickson aumentou com as doses de adubo, contudo nas doses acima de 6 g L<sup>-1</sup> este aumento foi menos significativo com tendência à estabilização (Figura 5B).



**Figura 5** Relação altura e massa seca da parte aérea (RHMSPA) (A) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) adubadas com diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4).

O custo de produção de mudas é outra variável que deve ser considerada. No caso do presente estudo, o custo das mudas de erva-mate aumentou com a dose de adubo. Assim, 1000 mudas produzidas em tubete com volume de 110 cm<sup>3</sup> e 2 g L<sup>-1</sup> de adubo custaram US\$1,22, aumentando progressivamente conforme a dose até o valor de US\$6,11 para 10 g L<sup>-1</sup> (Figura 6). Para este valor, foi considerado apenas o preço de US\$5,48 por quilo do fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4), preço médio praticado em julho de 2021.



**Figura 6** Custo em dólar\* por 1000 mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) produzidas com diferentes doses do fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4). \*US\$1,00=R\$5,1564 cotação de julho/2021.

## DISCUSSÃO

Os parâmetros morfológicos como H, DC, NF, MSPA, MSR e MST, avaliados neste trabalho, são os mais utilizados para determinar o padrão de qualidade de mudas e os resultados são de fácil compreensão por parte dos viveiristas (Gomes *et al.* 2002). De posse desses resultados, caso as mudas não apresentem crescimento satisfatório, o viveirista consegue intervir no manejo, alterando alguns fatores que podem estar comprometendo o desempenho, como adubação, irrigação, densidade de mudas e intensidade luminosa.

Para a classificação e seleção das mudas, a altura é um dos parâmetros mais utilizados (Gomes *et al.* 2002) que, juntamente com o diâmetro do coleto, são análises não destrutivas e fáceis de serem mensuradas (Gomes *et al.* 2002, Araújo *et al.* 2018, Araújo *et al.* 2020). Além disso, são as características morfológicas mais importantes e mais utilizadas na avaliação da qualidade das mudas. O diâmetro do coleto é um bom indicador que pode ser correlacionado com o desenvolvimento das mudas a campo (Landis *et al.* 2010).

Com relação à altura, Cabreira *et al.* (2021) verificaram que mudas de *Inga laurina* (Sw.) Willd sem fertilização apresentaram a menor altura média. Para o diâmetro do coleto, mudas de *Melanoxylon brauna* Schott (Gibson *et al.* 2019) apresentaram comportamento linear crescente com o uso de fertilizante Basacote Mini 6M (13-6-16) quando comparado à

mudas sem adubação, demonstrando o potencial das mudas em responder à fertilização de liberação controlada, como verificado no presente trabalho.

A altura das plantas está diretamente relacionada ao manejo no viveiro, contudo, se analisada isoladamente pode não ser um bom indicativo de qualidade das mudas (Araújo *et al.* 2018). Assim, a análise da relação da altura com o diâmetro do coleto (RHDC) é uma forma simples de visualizar o equilíbrio entre o desenvolvimento e a firmeza da parte aérea, sendo sinônimo de robustez (Landis *et al.* 2010). Neste estudo foi observado que a partir de  $6 \text{ g L}^{-1}$  esta relação é de 4,1, indicando que, a partir desta concentração, as mudas apresentam maior robustez, com equilíbrio da parte aérea (Figura 2C).

O número de folhas e a área foliar estão diretamente relacionadas à capacidade fisiológica das mudas com reflexos na produtividade, já que estas atuam na interceptação da energia luminosa utilizada em processos metabólicos que a convertem em energia química por meio da síntese de compostos carbônicos (Araújo *et al.* 2018). No presente estudo, à medida que foi aumentado a dose do fertilizante, aumentou o número de folhas, porém a partir de  $6 \text{ g L}^{-1}$  ocorre uma estabilização para esta variável. Para a área foliar não foi verificado este comportamento, pois na maior dose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) se observou incremento de 38% em comparação com a dose de  $6 \text{ g L}^{-1}$ . A massa seca da parte aérea, radicular e total aumentou com as doses de adubo, com comportamento similar ao que foi observado para número de folhas, havendo uma estabilização a partir de  $6 \text{ g L}^{-1}$ .

Estes resultados podem estar atrelados ao manejo no viveiro, pois a partir de determinado acúmulo de massa seca e número de folhas houve estabilização dessas variáveis e as plantas, provavelmente em consequência da competição por luz, passaram a investir no aumento da área foliar. Maiores índices de área foliar são observados em maiores densidades de mudas como alternativa para incrementar a interceptação solar (Trautenmüller *et al.* 2017). No presente trabalho, as mudas não foram espaçadas e, à medida que foram crescendo, ocorreu incremento na área foliar, havendo estagnação no número de folhas e da massa seca a partir de  $6 \text{ g L}^{-1}$ . É esperado que as plantas tenham plasticidade quando crescem em ambientes com diferentes recursos (água, luz e/ou nutrientes), o que auxilia na manutenção da estabilidade de características fisiológicas, como acúmulo de massa seca (Olguim *et al.* 2020).

O adensamento das plantas pode causar sombreamento das folhas inferiores (Araújo *et al.* 2018), contudo para espécies clímax, como é o caso da erva-mate, que está ambientalmente adaptada a condições com nível alto de sombreamento, consegue se desenvolver em condições de dossel fechado com pouca luz (Poletto *et al.* 2010). Fato este que corrobora com os resultados observados neste estudo que demonstrou a habilidade da

espécie em investir no aumento da área foliar para ser mais eficiente na interceptação da radiação solar.

Silva *et al.* (2019) verificaram que doses crescentes de Osmocote Plus no cultivo de *Acacia mangium* contribuíram para aumentar a massa seca da parte aérea e radicular, com reflexos positivos no desenvolvimento das mudas. Para mudas de *Euterpe oleraceae*, a massa seca radicular aumentou com as doses do fertilizante Osmocote (Araújo *et al.* 2019).

A massa seca é consequência do processo fotossintético na planta, sendo o resultado da fotossíntese líquida, ou seja, descontados os gastos de manutenção da planta como respiração, fluorescência, entre outros (Araújo *et al.* 2018). De forma geral, o valor da massa seca da parte aérea é maior que o da massa seca radicular, assim a relação entre estes dois parâmetros (RMSPAR) é outro indicativo de qualidade de mudas (Araújo *et al.* 2018), sendo normalmente um bom indicador do desempenho das mudas a campo (Landis *et al.* 2010). O valor da RMSPAR está atrelado a fatores inerentes à espécie, como tamanho do recipiente e manejo do viveiro, com valores entre 1 a 3 (Araújo *et al.* 2018). Quanto maior a relação, maiores são as chances de as mudas suportarem períodos de seca no campo e melhor é a competição com as plantas daninhas (Matos *et al.* 2021).

A relação altura e massa seca da parte aérea (RHMSPA) é outro índice que apresenta contribuição relativa na qualidade das mudas (Gomes *et al.* 2002), sendo sinônimo de rusticidade (Dutra *et al.* 2016). Para este índice foi verificado que quanto maior a concentração do adubo, menor é a relação entre altura e massa seca da parte aérea (Figura 5A). Resultado semelhante foi observado para *Peltophorium dubium* no qual, à medida que aumentou a dose de Osmocote, houve incremento na rusticidade das mudas (Dutra *et al.* 2016).

O IQD é variável entre espécies e, de maneira geral, os dados disponíveis para espécies da Mata Atlântica ainda são escassos (Cabreira *et al.* 2021). Para *Inga laurina* houve aumento no IQD com as doses de fertilizante de liberação controlada (Cabreira *et al.* 2021), já para *Peltophorium dubium* não foi verificado efeito significativo do fertilizante Osmocote (Dutra *et al.* 2016). No presente trabalho houve uma estabilização do IQD a partir da dose de  $6 \text{ g L}^{-1}$ , apresentando comportamento similar ao que foi verificado para NF e MS, o que pode estar relacionado ao não espaçamento das mudas conforme foram se desenvolvendo. Efeito positivo da fertilização sobre a RHMSPA e IQD também foi observado para mudas de *Acacia mangium*, cultivadas com adubo de liberação controlada (Silva *et al.* 2019).

As doses de fertilizantes de liberação controlada são variáveis na produção de mudas de espécies nativas, pois estas apresentam diferentes necessidades nutricionais e, além disso, o tipo de substrato deve ser considerado (Cabreira *et al.* 2021). Isso foi evidenciado no



presente estudo, pois mesmo utilizando um substrato comercial contendo nutrientes na sua formulação, estes não foram suficientes para o crescimento das mudas de erva-mate. A adubação é uma prática essencial nos viveiros para o acúmulo de biomassa, pois deficiências nutricionais comprometem o metabolismo da planta e reduzem o crescimento das mudas (Zavistanovicz *et al.* 2017). Contudo, é de extrema importância a utilização de doses adequadas para evitar desperdício de recursos, além de evitar efeitos tóxicos causados pelo uso excessivo de fertilizantes minerais. De maneira geral, a adição de fertilizantes de liberação controlada para a produção de mudas de espécies florestais tem respostas positivas (Gibson *et al.* 2019). Mudas de *Cedrela fissilis* (Navroski *et al.* 2016), *Moringa oleifera* (Rosa *et al.* 2018) e *Euterpe oleraceae* (Araújo *et al.* 2019) apresentaram bom crescimento com adubação de base composta por fertilizante de liberação controlada. Mudas bem fertilizadas de *Inga laurina* apresentaram taxa de sobrevivência maior após 12 meses de plantio a campo (Cabreira *et al.* 2021), confirmando a importância de utilização de mudas bem nutridas.

É fundamental que os parâmetros mensuráveis no viveiro tenham relação com o desempenho das mudas no campo, no entanto, estes estão atrelados à espécie, insumos e manejo. Outra dificuldade é o estabelecimento de padrões na avaliação destes atributos, uma vez que são utilizadas espécies exóticas (*Pinus* e *Eucalyptus*) como referência para o cultivo de nativas devido à limitação de pesquisas com espécies locais (Araújo *et al.* 2018).

A demanda de nutrientes é determinada por condições climáticas e pelo ritmo de crescimento da espécie. Mudas produzidas na primavera e no verão precisam de doses maiores de fertilizantes em relação às produzidas no outono e inverno, pois no período com temperaturas mais elevadas ocorre maior atividade metabólica (Araújo *et al.* 2018). Assim, os resultados deste trabalho estão atrelados às condições ambientais específicas do período de estudo.

Os resultados das variáveis analisadas neste trabalho validaram a hipótese de que o fertilizante de liberação controlada pode ser utilizado para a produção de mudas de erva-mate. (Figura 7). Assim, a partir da dose de 6 g L<sup>-1</sup> de Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4) foi verificado desenvolvimento satisfatório para a maioria dos caracteres morfológicos analisados neste trabalho, bem como para os índices obtidos a partir destas variáveis.



**Figura 7** Aspecto morfológico de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) produzidas com diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (Basacote® Mini 6M 13-6-16 + 1,4) após oito meses de cultivo.

Muitos são os avanços na silvicultura nativa, porém mais estudos são necessários para estabelecer as condições nutricionais ideais para cada espécie (Gibson *et al.* 2019). Mais pesquisas na área de produção de mudas de erva-mate devem ser realizadas levando em consideração diferentes substratos, tamanhos de tubetes, tipos e doses de fertilizantes, além de acompanhar e avaliar o desempenho destas mudas no campo, fornecendo subsídios a viveristas e produtores desta importante cadeia produtiva.

## CONCLUSÃO

Para as condições deste estudo, doses de  $6 \text{ g L}^{-1}$  de fertilizante Basacote® Mini 6M (13-6-16 + 1,4) podem ser utilizadas na adubação de base de mudas de erva-mate.

## REFERÊNCIAS

- Araújo EF, EO Gonçalves, AR Santos, EL Gibson, MVW Caldeira, JEM Pezzopane. 2020. Controlled release fertilizer in the rooting and performance of clones of *Paratecoma peroba*. *Cerne* 26(2):202-211. DOI: <https://doi.org/10.1590/01047760202026022693>

- Araújo JM de, R de C Andrade Neto, JR de Oliveira, AMP Lunz, UO de Almeida. 2019. Shading and slow release fertilizer effects on the growth characteristics of açai seedlings (*Euterpe oleracea*). *Floresta e Ambiente* 26(3):31-39. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.001918>
- Araújo MM, MC Nawroski, LA Schon. 2018. Produção de sementes e mudas: um enfoque à silvicultura. Santa Maria, RS, Brazil. Editora UFSM. 448 p.
- Cabreira GV, PS dos S Leles, JM Alonso, AS de R Resende, WV Cabreira, TJSE Sousa. 2021. Controlled-release fertilizer and container volume to produce *Inga laurina* seedlings. *Floresta e Ambiente* 28(1):e20190057. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2019-0057>
- Croge CP, FL Cuquel, PTM Pintro. 2021. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. *Scientia Agricola* 78(5):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0259>
- Dickson A, AL Leaf, JF Hosner. 1960. Quality appraisal of White spruce and White pine seedling stock in nurseries. *Forestry Chronicle* 36(1):10-13. DOI: <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>
- Duarte MM, MC Mireski, A Oliszeski, I Wendling, CA Stuepp. 2019. Rooting of yerba mate cuttings with different lengths. *Revista Eletrônica Científica da UERGS* 5(1):05-11. DOI: <https://doi.org/10.21674/2448-0479.51.6-12>
- Dutra TR, MD Massad, MFQ Sarmiento, PS Matos, JC Oliveira. 2016. Fertilizante de liberação lenta no crescimento e qualidade de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*). *Floresta* 46(4):491-498. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v46i4.44570>
- Emer AA, MC Winhelmann, M Tedesco, CS Fior, G Schafer. 2020. Controlled release fertilizer used for the growth of *Campomanesia aurea* seedlings. *Ornamental Horticulture* 26(1):35-44. DOI: <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i1.2020>
- Flora do Brasil. 2020. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Accessed Set. 15. 2020. Available in <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>
- Gabira MM, JFP Gomes, D Kratz, I Wendling, CA Stuepp. 2020a. Industrial residues as substrate components for the production of *Ilex paraguariensis* seedlings. *Comunicata Scientiae* 11:e3215. DOI: <https://doi.org/10.14295/cs.v11i.3215>
- Gabira MM, LS Walter, GS Brito, CR Schneider, I Wendling, D Kratz. 2020b. Alternative substrates and containers for *Ilex paraguariensis* seedlings. *Acta Iguazu* 9(3):78-87. DOI: <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v9i4.25492>

- Gibson EL, EO Gonçalves, AR Santos, EF Araújo, MVW Caldeira. 2019. Controlled-release fertilizer on growth of *Melanoxylon brauna* Shott seedlings. *Floresta e Ambiente* 26(1):e20180418. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.041818>
- Gomes JM, L Couto, HG Leite, A Xavier, SLR Garcia. 2002. Parâmetros morfológicos na avaliação de qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore* 26(6):655-664. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622002000600002>
- Gortari F, WO Londero, P Rocha, F Niella. 2020. Growth and physiological responses of yerba mate seedlings and mini-cuttings under drought stress. *Cerne* 26(3):341-348. DOI: <https://doi.org/10.1590/01047760202026032740>
- Landis TD, RK Dumroese, DL Haase. 2010. The container tree nursery manual: seedling processing, storage, and outplanting. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture Forest Service. 200 p.
- Matos DCP de, FC Felix, MM Gabira, NS de Aguiar, LS Walter, ADF Matella, D Kratz. 2021. Controlled-release fertilizer in *Cordyline spectabilis* seedlings production, a potential species of the Asparagaceae Family. *Floresta e Ambiente* 28(2):e20200047. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2020-0047>
- Navroski MC, EL Tonett, MV Mazzo, T Frigotto, MO Pereira, LV Galvani. 2016. Procedência e adubação no crescimento inicial de mudas de cedro. *Pesquisa Florestal Brasileira* 36(85):17-24. DOI: <https://doi.org/10.4336/2016.pfb.36.85.966>
- Olguin FY, AP Moretti, M Pinazo, F Gortari, JV Bahima, C Graciano. 2020. Morphological and physiological plasticity in seedlings of *Araucaria angustifolia* and *Cabralea canjerana* is related to plant establishment performance in the rainforest. *Forest Ecology and Management* 460:117867. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117867>
- Poletto I, MFB Muniz, DE Ceconi, R Mezzomo, J Rodrigues. 2010. Influência da inoculação de *Fusarium* sp. e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva-mate. *Ciência Florestal* 20(3):513-521. DOI: <https://doi.org/10.5902/198050982065>
- Rosa TLM, RB Jordaim, RS Alexandre, CP Araújo, FG Gonçalves, JC Lopes. 2018. Controlled release fertilizer in the growth of *Moringa oleifera* Lam. seedlings. *Floresta* 48(3):303-310. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v48i3.50063>
- Schafer G, PVD de Souza, CS Fior. 2015. Um panorama das propriedades físicas e químicas de substratos utilizados em horticultura no sul do Brasil. *Ornamental Horticulture* 21(3):299-306. DOI: <https://doi.org/10.14295/oh.v21i3.735>

- Shaviv A. 2001. Advances in controlled release of fertilizers. *Advances in Agronomy* 71:1-49. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(01\)71011-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(01)71011-5)
- Silva LDD, APL Lima, SF de Lima, RC Silva, GF Paniago. 2019. Controlled-release fertilizer in the production and quality of *Acacia mangium* seedlings. *Floresta e Ambiente* 26(2):e02092017. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.020917>
- Silva MAF da, P Higuchi, AC da Silva. 2018. Impacto de mudanças climáticas sobre a distribuição geográfica potencial de *Ilex paraguariensis*. *Rodriguésia* 69(4):2069-2079. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869437>
- Trautenmüller JW, J Borella, M Minatti, S Costa Júnior, APF Woycikiewicz, R Balbinot, K Engel. 2017. Avaliação de plantas de *Cordia americana* em viveiro utilizando caracteres morfológicos. *BIOFIX Scientific Journal* 2(2):65-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/biofix.v2i2.55512>
- Zavistanovicz TC, MM Araujo, SC Aimi, R Flores, ÁLP Berghetti, G Deponti. 2017. Morphophysiological responses of *Ilex paraguariensis* seedlings to different substrates and fertilizations. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 21(2):111-115. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n2p111-115>

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora, na literatura há menção do uso do soprador para retirada de impurezas de sementes de erva-mate, não foram descritos resultados abordando o beneficiamento de sementes com o intuito de aumentar a viabilidade. Assim, por meio dos estudos realizados neste trabalho verificou-se que é possível aumentar a qualidade física e fisiológica dos lotes de sementes de erva-mate com o uso de fluxo de ar vertical, mesmo quando utilizadas sementes com diferentes características físicas.

Os resultados obtidos neste estudo comprovam a necessidade de averiguar a qualidade física e fisiológica dos lotes de sementes de erva-mate, os quais, de forma geral, confirmam a presença de grande quantidade de sementes vazias e deterioradas, o que contribui para reduzir a viabilidade inicial.

Também foi confirmada a ação benéfica de soluções aquosas neutra seguida de ácidas no pré-tratamento de sementes de erva-mate aliado a estratificação, bem como a influência positiva do uso de fertilizantes na estratificação sobre o desenvolvimento dos embriões e na germinação. Embora as taxas de germinação de erva-mate descritas na literatura são baixas, em geral inferiores à 20%. É importante ressaltar que se for considerado somente a porcentagem de sementes viáveis presentes nos lotes, a germinação em alguns casos é próxima de 100%.

De forma geral os viveiristas devem coletar sementes de plantas matrizes previamente selecionadas para a produção de mudas de erva-mate de qualidade. Realizar o beneficiamento das sementes para retirada de impurezas, sementes vazias e deterioradas. Os

lotes com alta viabilidade devem ser estratificados em areia com adição de fertilizante de liberação controlada, o que favorece a germinação mais uniforme e estabelecimento de mudas homogêneas, facilitando o manejo no viveiro. É de suma importância a tecnificação dos viveiristas para que possam produzir mudas de qualidade.

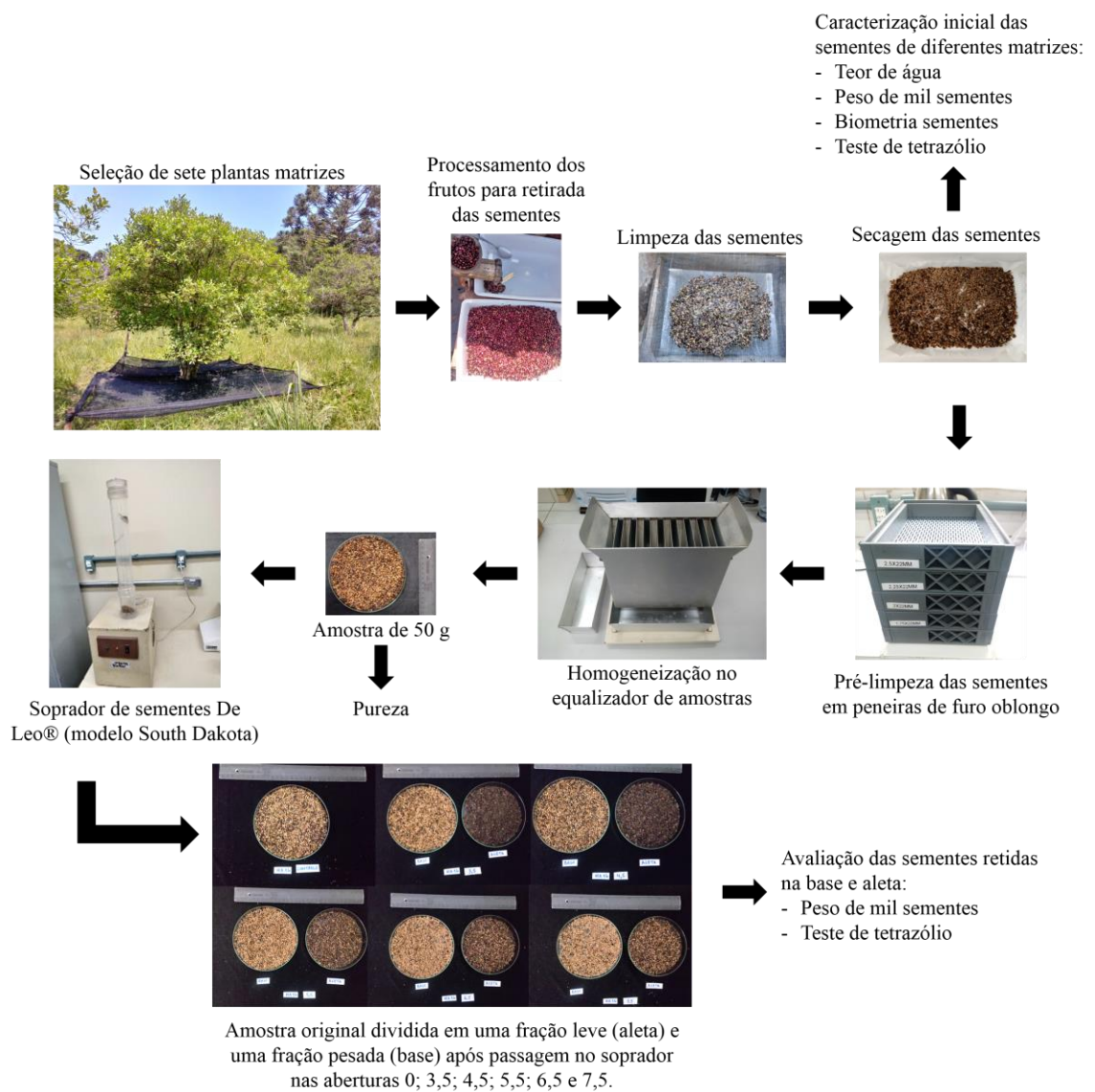
O uso de adubo de liberação controlada de nutrientes pode ser uma alternativa de adubação de base para a produção de mudas de erva-mate com qualidade, além de reduzir a perda de nutrientes por lixiviação, e, conseqüentemente, reduzir o custo e os impactos ambientais.

Como perspectivas futuras mais estudos devem ser realizados com o objetivo de identificar qual é o elemento mineral específico que favorece o desenvolvimento e crescimento embrionário durante a estratificação. Estudos também devem ser realizados com relação a ação das soluções aquosas acidificadas na superação da dormência com o intuito de explicar qual a ação deste tipo de tratamento sobre o metabolismo das sementes. Mais um ponto a ser investigado é o efeito da estratificação fria (5 °C), quente ( $\geq 15$  °C) e com alternância de temperatura sobre a mobilização das reservas, desenvolvimento embrionário e germinação.

A quantificação dos hormônios antagonistas no processo de dormência-germinação (ácido abscísico e ácido giberélico) também se faz necessário realizar. A mensuração inicial destes hormônios, bem como durante a estratificação, levará à identificação exata do momento em que ocorre a saída da dormência e início da germinação. Tal informação contribuirá para uma maior compreensão deste processo e poderá auxiliar na tomada de decisão de quando encerrar a estratificação e colocar as sementes para germinar. Com isso espera-se reduzir a porcentagem de sementes deterioradas durante a estratificação.

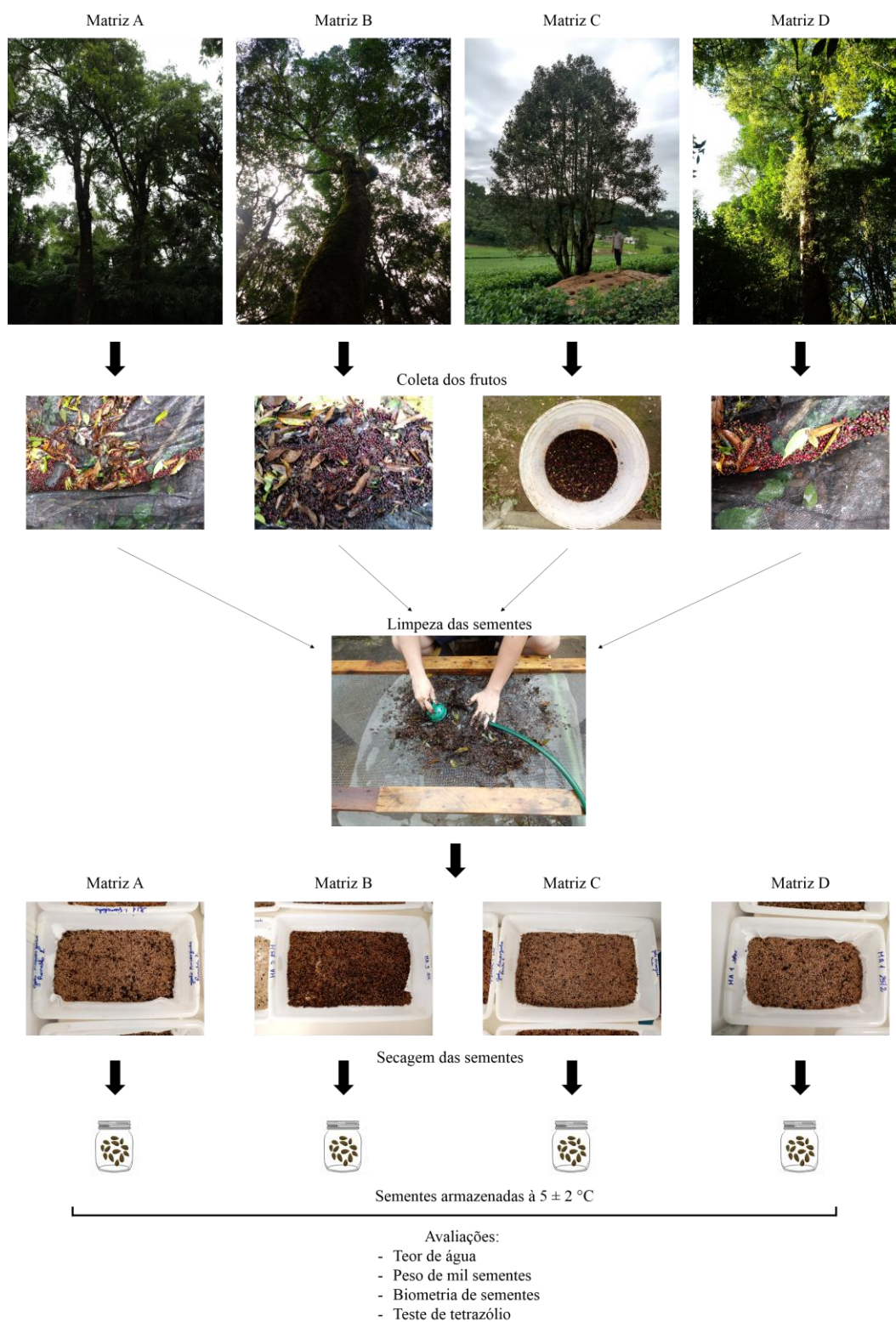
Por fim, são necessários estudos sobre apomixia já que há registros para outras espécies do gênero *Ilex*, bem como investigar as causas da formação de sementes sem embrião visível e possível autopolinização.

## 10 APÊNDICES

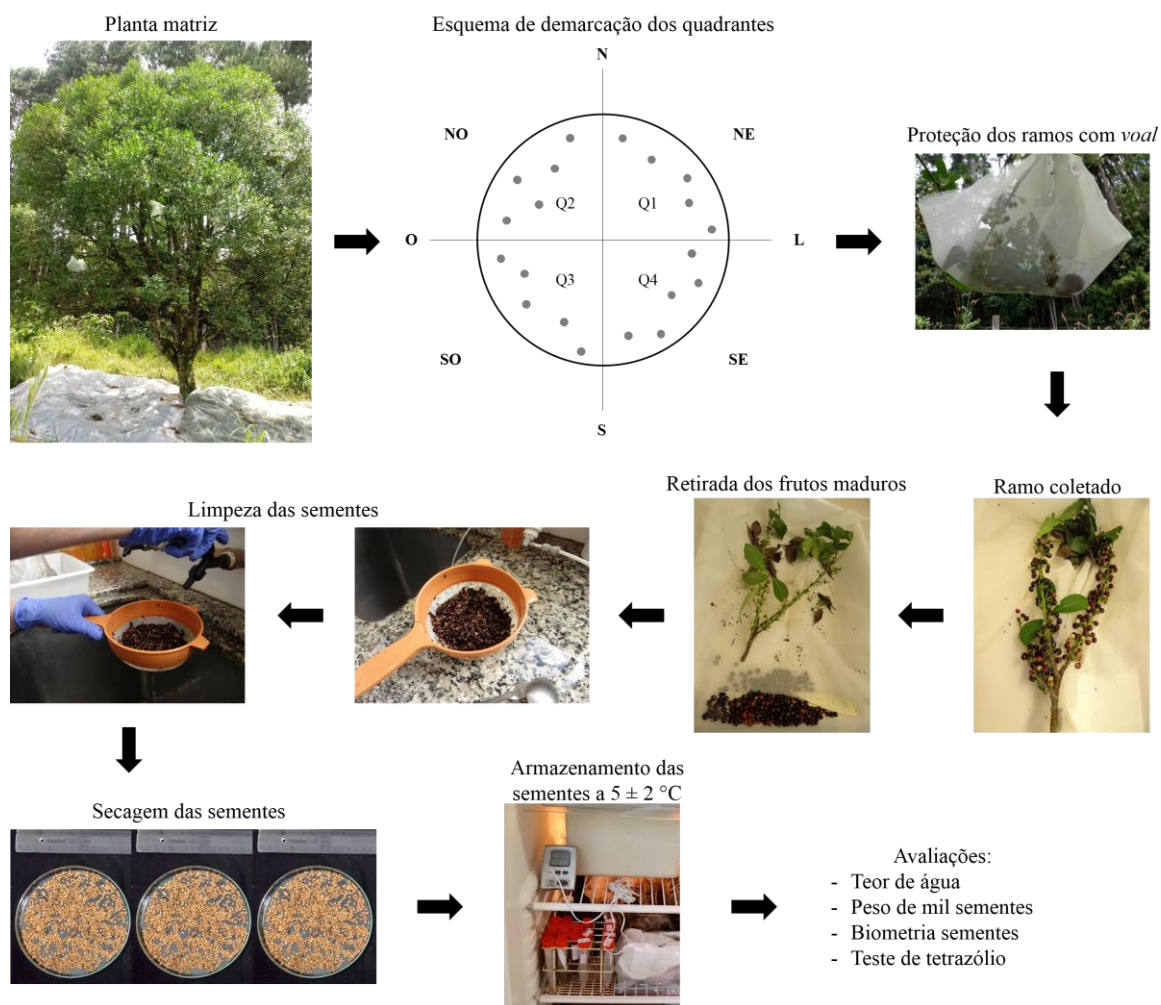


APÊNDICE 1. Capítulo 1 - Beneficiamento de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) através do fluxo de ar vertical. Porto Alegre, RS.

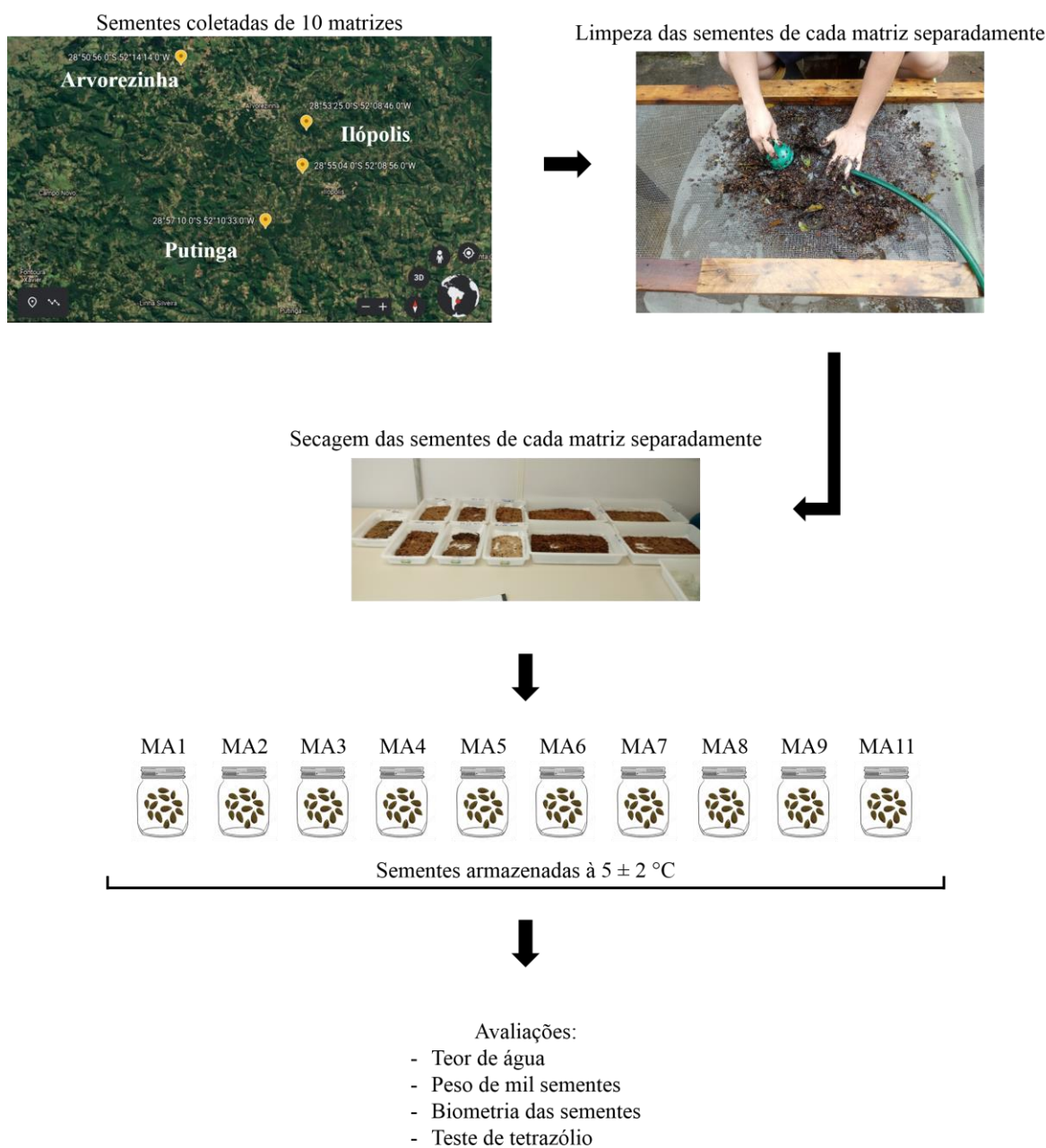




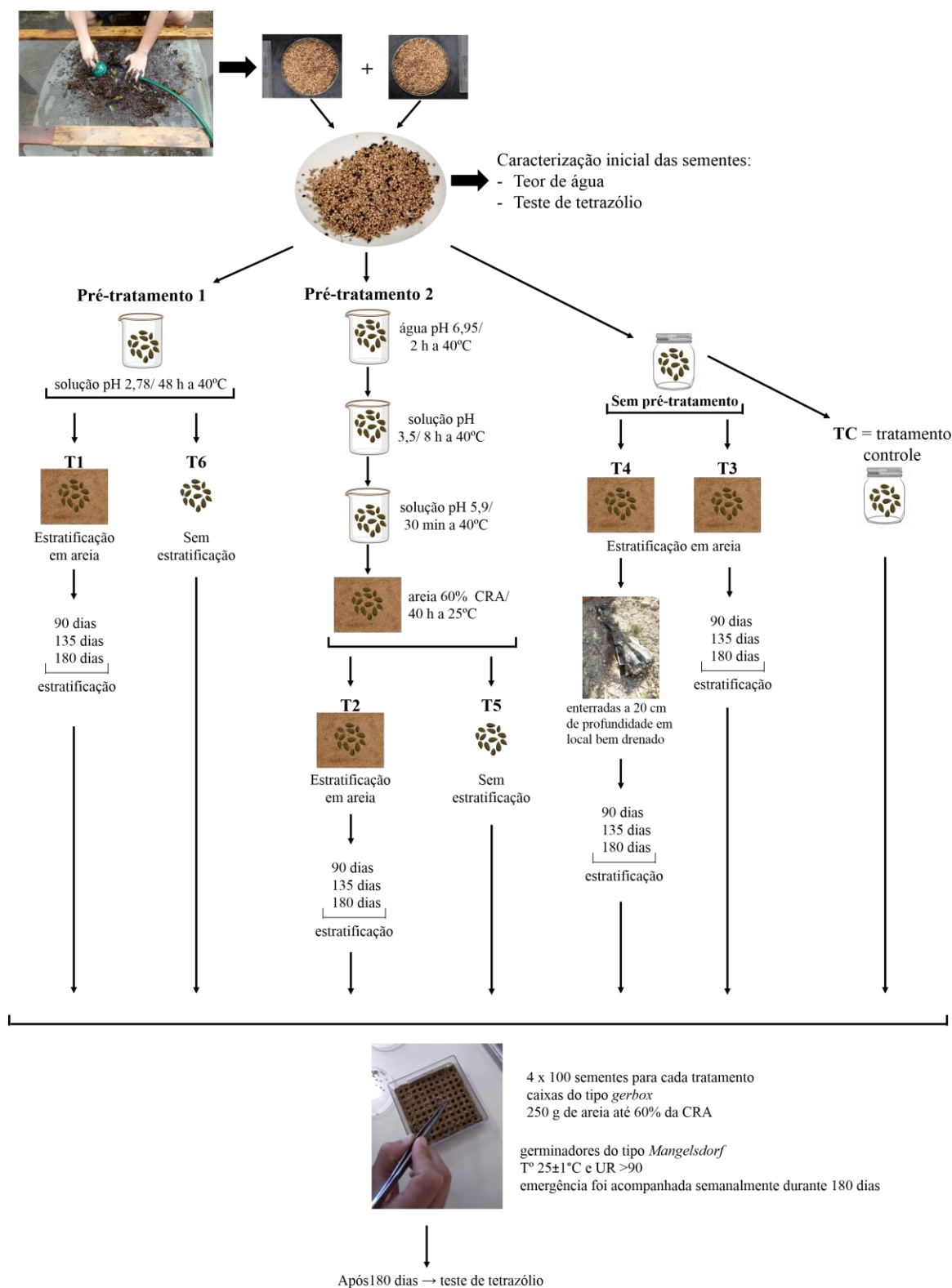
APÊNDICE 2. Capítulo 2 – Qualidade de sementes de erva-mate - Experimento 1: Frutos oriundos de quatro plantas matrizes: seleção das matrizes, coleta dos frutos, limpeza das sementes sobre peneira e água corrente, secagem das sementes e armazenamento em frascos de vidro tipo *snap cap* em ambiente com temperatura de  $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Porto Alegre, RS.



APÊNDICE 3. Capítulo 2 – Qualidade de sementes de erva-mate - Experimento 2: Frutos obtidos de diferentes quadrantes de uma planta matriz (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): seleção da matriz, demarcação dos quadrantes, ramos ensacados com tecido *voal*, coleta dos ramos, retirada dos frutos maduros, limpeza das sementes sobre peneira e água corrente, secagem das sementes e armazenamento em tubos tipo *falcon* em ambiente com temperatura de  $5 \pm 2$  °C. Porto Alegre, RS.

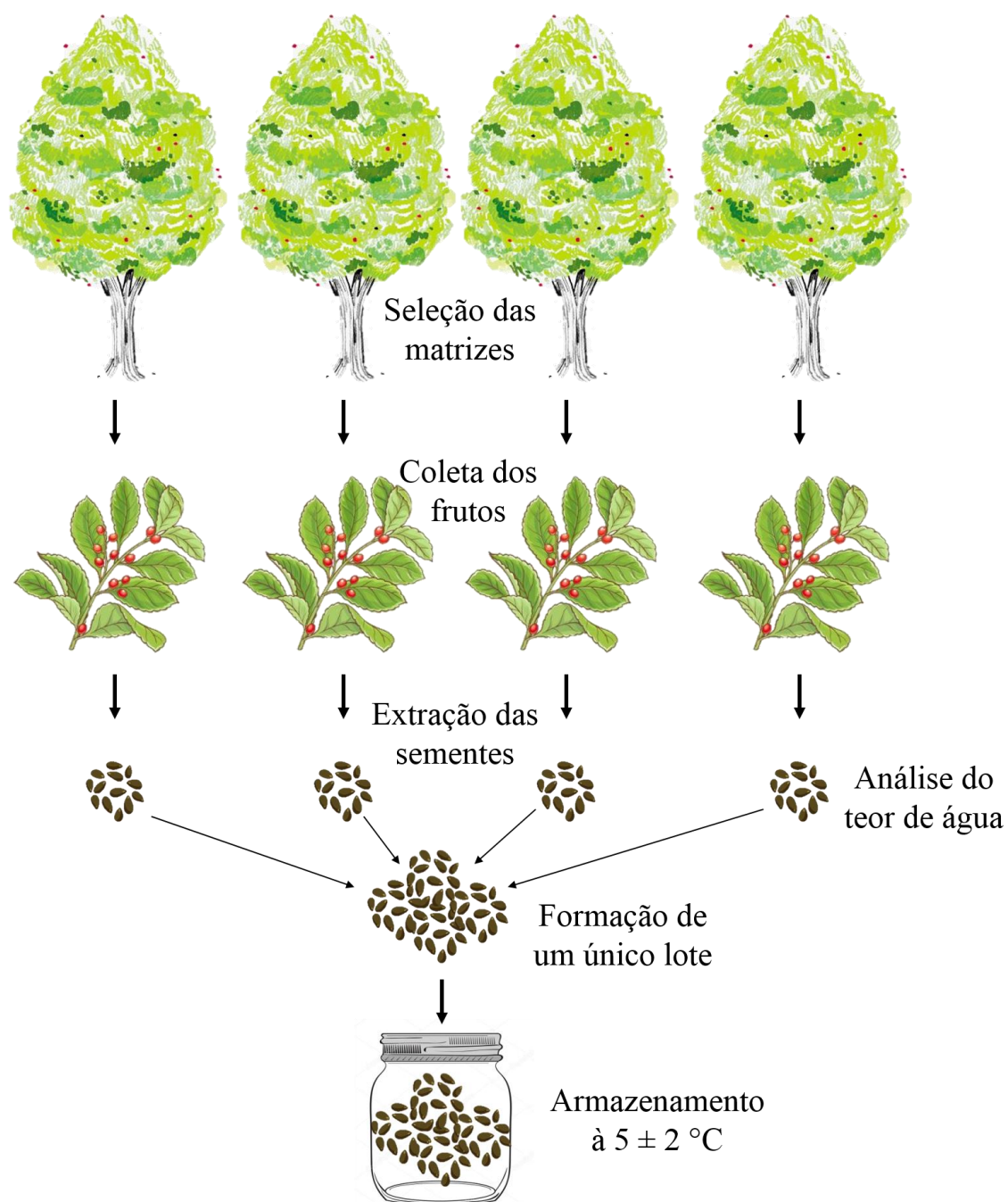


APÊNDICE 4. Capítulo 3 – Avaliação da qualidade de sementes de erva-mate oriundas de diferentes plantas matrizes: seleção e coleta de frutos de dez plantas matrizes localizadas nos municípios de Arvorezinha, Ilópolis e Putinga; limpeza das sementes em peneira e água corrente, secagem das sementes sobre papel absorvente em banda de laboratório, armazenamento das sementes em frascos de vidro tipo *snap cap* à  $5 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Porto Alegre, RS.

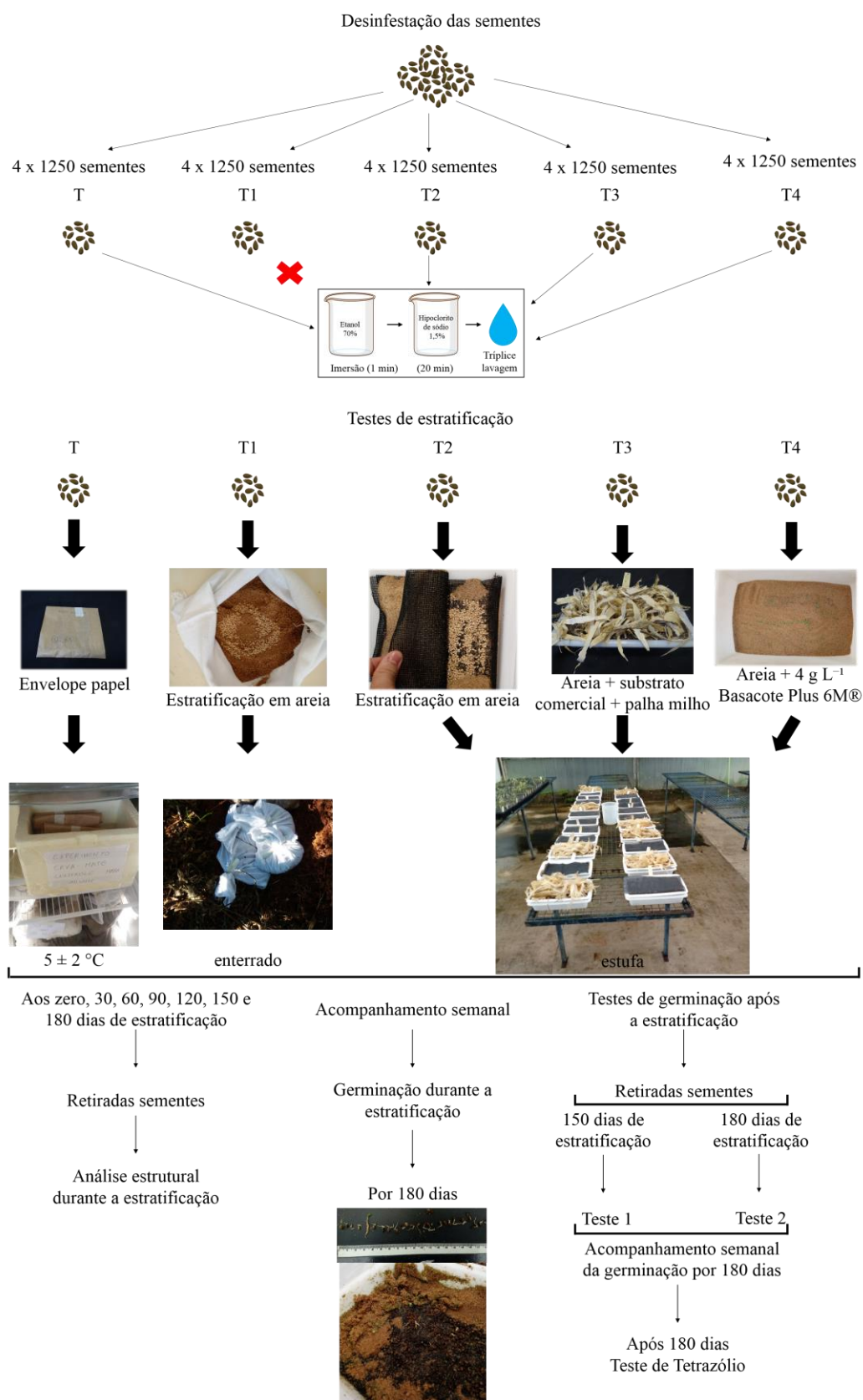


APÊNDICE 5. Capítulo 4 – Pré-tratamentos, estratificação e emergência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). Porto Alegre, RS.

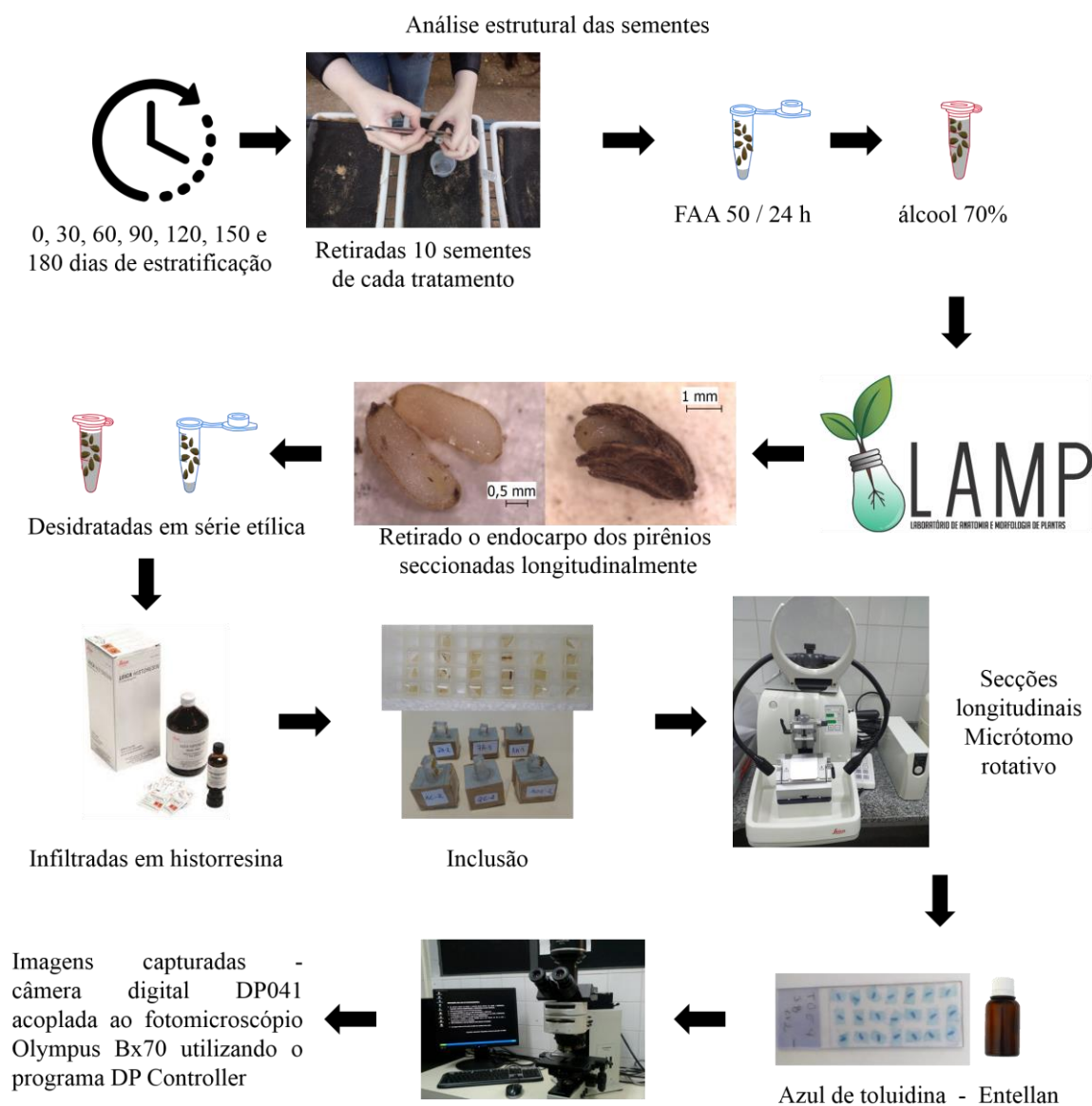
## Coleta e beneficiamento das sementes



APÊNDICE 6. Capítulo 5 – O desenvolvimento embrionário e a viabilidade das sementes afetam a germinação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): coleta e beneficiamento das sementes. Porto Alegre, RS.



APÊNDICE 7. Capítulo 5 – O desenvolvimento embrionário e a viabilidade das sementes afetam a germinação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): desinfestação das sementes e testes de estratificação. Porto Alegre, RS.

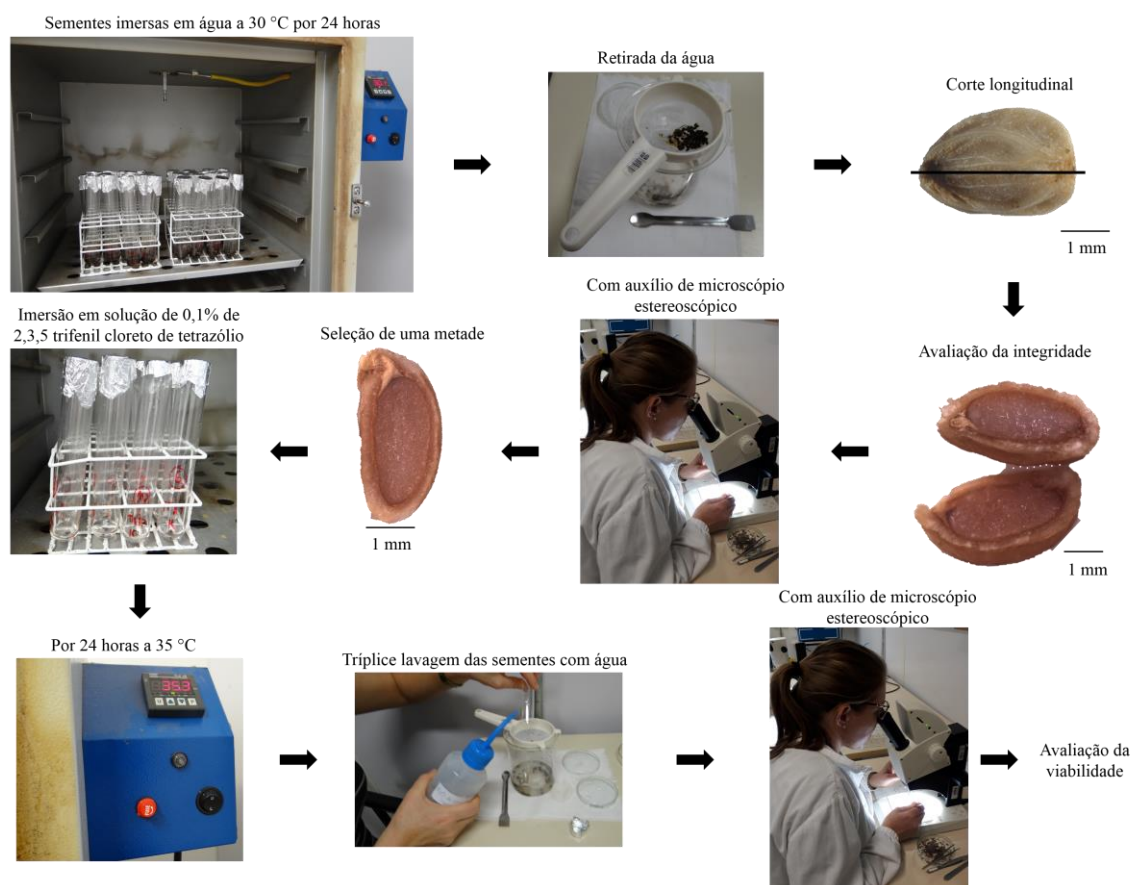


APÊNDICE 8. Capítulo 5 – O desenvolvimento embrionário e a viabilidade das sementes afetam a germinação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): análise estrutural das sementes de erva-mate. Porto Alegre, RS.

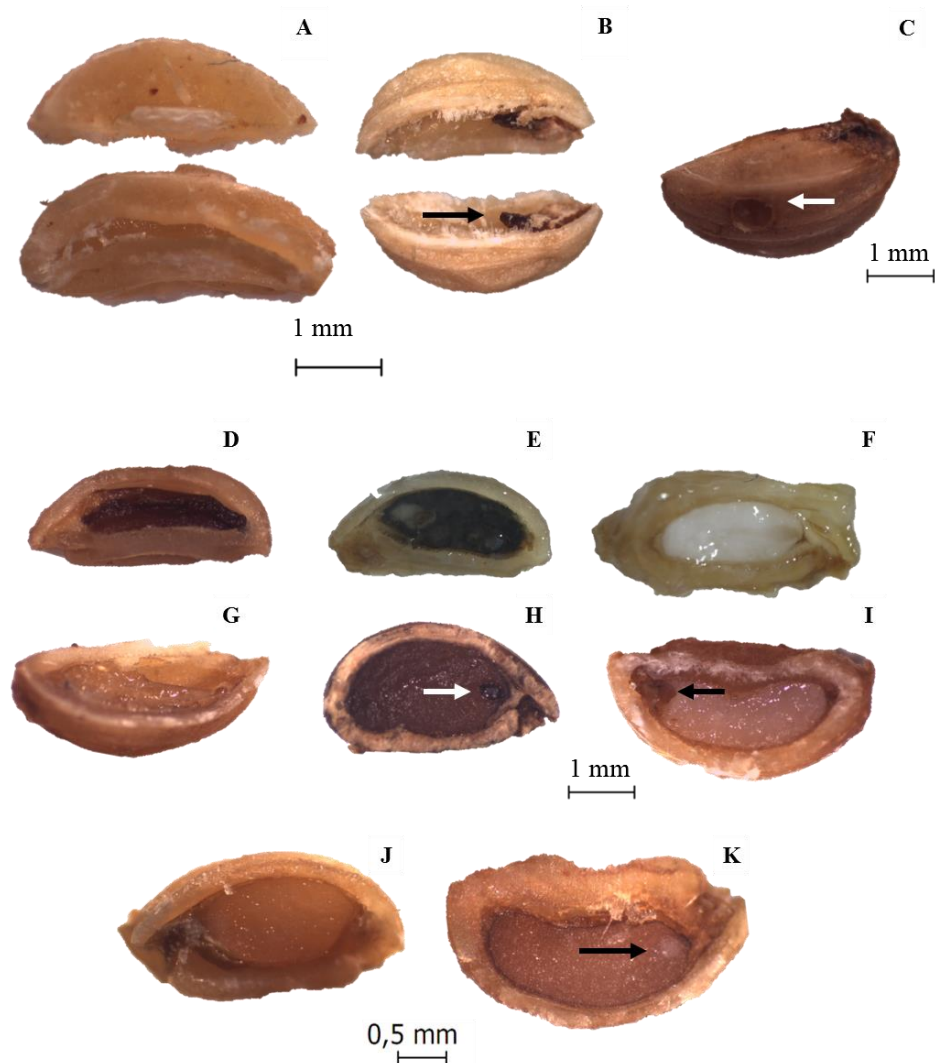


APÊNDICE 9. Capítulo 5 – O desenvolvimento embrionário e a viabilidade das sementes afetam a germinação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): testes de germinação após a estratificação das sementes de erva-mate. Porto Alegre, RS.





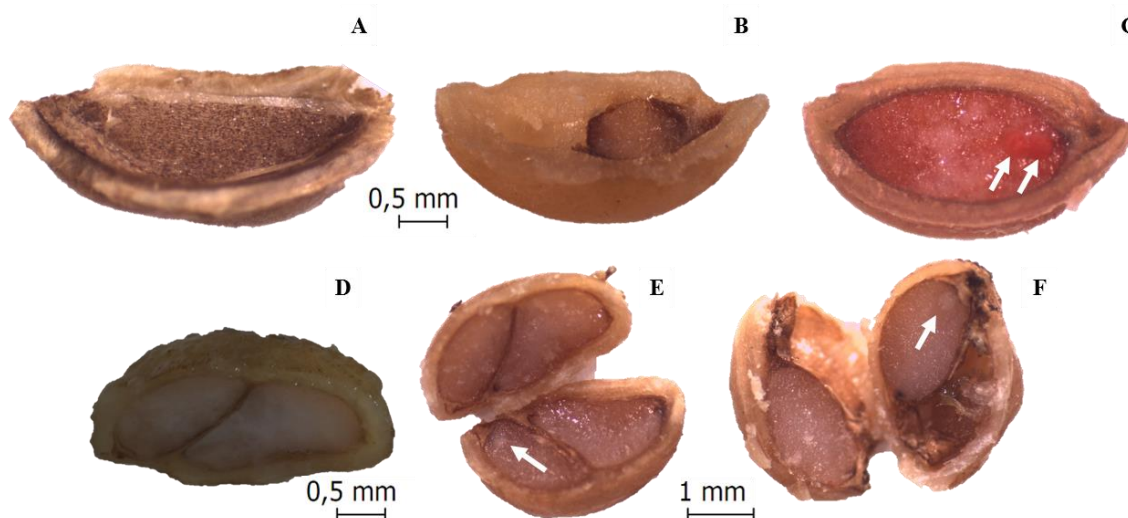
APÊNDICE 10. Teste de tetrazólio em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): sementes imersas em água ultrapurificada a 30 °C por 24 horas para facilitar o corte; retirada da água; realizado corte longitudinal com o auxílio de pinça e bisturi; avaliação visual da integridade das duas metades de cada semente com auxílio de microscópio estereoscópico; imersão de uma metade de cada semente íntegra em solução de 0,1% de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio por 24 horas a 35 °C, tríplice lavagem das sementes com água ultrapurificada e avaliação visual das sementes para determinar a viabilidade. Porto Alegre, RS.



APÊNDICE 11. Avaliação da integridade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.): **não íntegras** - vazia somente com o endocarpo (A); vazia contendo menos de 50% dos tecidos (seta preta) (B); predada com presença de orifício (seta preta) (C); deteriorada com endosperma ressecado (D); deteriorada com com tecido gelatinoso (E, F, G); deteriorada com endosperma e embrião escurecido (H); deteriorada com embrião degradado (seta preta) (I); e **íntegras** - endosperma de consistência firme sem embrião visível (J); endosperma de consistência firme e embrião visível (seta preta) (K). Porto Alegre, RS.



APÊNDICE 12. Determinação da viabilidade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) pela análise com sal de tetrazólio: **viável** - com endosperma firme e colorido, com embrião visível, sem danos e com consistência firme (A); **não viáveis** - endosperma colorido sem embrião visível (B); endosperma colorido e embrião não colorido (C); endosperma não colorido e embrião colorido (D); endosperma não colorido e embrião não colorido (E); endosperma não colorido sem embrião visível (F). Porto Alegre, RS.



APÊNDICE 13. Casos raros encontrados durante a avaliação da integridade e viabilidade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil): endocarpo e tegumento, sem endosperma e embrião (A); endosperma e embrião com a metade do tamanho do endocarpo (B); semente viável com dois embriões (C); pirênio com duas sementes (tegumento + endosperma) (D e E); pirênio com duas sementes, porém uma íntegra com embrião visível (seta branca) e outra degradada (F). Porto Alegre, RS.



**APÊNDICE 14. Capítulo 6 - Fertilizante de liberação controlada no crescimento de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil):** Limpeza das sementes, secagem das sementes, armazenamento em vidros tipo *snap cap* à  $5 \pm 2$  °C, estratificação em areia +  $4 \text{ g L}^{-1}$  de adubo de liberação controlada por seis meses, retirada das sementes da estratificação e lavagem do excesso de areia, sementeira de cinco sementes por tubete, bandejas mantidas cobertas com tela de sombreamento preta com interceptação luminosa de 50%, disposta 50 cm acima da parte superior das bandejas durante sete meses, mudas avaliadas após oito meses de cultivo. Porto Alegre, RS.