



Micropropagação de Erva-Mate: Efeito de Diferentes Épocas do Ano no Estabelecimento *in vitro* de Segmentos Nodais

Felippe Correa da Rosa¹
Fabrício Augusto Hansel²
Leonardo Ferreira Dutra³
Kenia Michele de Quadros⁴

Introdução

O gênero *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) é constituído por mais de 500 espécies, ocorrendo em regiões temperadas e tropicais do mundo, apresentando plantas decíduas e perenifólias. Várias espécies são economicamente importantes como a *Ilex paraguariensis* St. Hil., conhecida como erva-mate, muito cultivada no Sul do Brasil, no Nordeste da Argentina e Leste do Paraguai, e também no Uruguai. Suas folhas são empregadas no preparo de uma bebida estimulante, o “mate” (SANSBERRO et al., 2001).

A micropropagação de plantas tem se constituído na principal aplicação em nível comercial das técnicas de cultura de tecidos vegetais. Espécies lenhosas como a erva-mate têm sido propagadas via micropropagação devido ao seu interesse econômico. Em função disso, o potencial das técnicas de cultura de tecidos para o melhoramento do gênero *Ilex* spp. é extensivamente discutido, no qual o estabelecimento de segmentos nodais *in vitro* provenientes de várias fontes de material com diferentes origens e idades é um dos requerimentos básicos para o uso da técnica de micropropagação (SANSBERRO et al., 2001).

Em termos de propágulos obtidos de árvores adultas de erva-mate (acima de 10 anos de idade), até agora somente podem ser estabelecidos *in vitro* os segmentos nodais provenientes de plantas matrizes obtidas por meio de estaquia, as quais são mantidas em condições de casa de vegetação (WENDLING, 2004). Um dos problemas na micropropagação de erva-mate é a alta taxa de contaminação por fungos e bactérias, além da oxidação dos explantes na fase de estabelecimento (MROGINSKI et al., 1996). É conhecida a influência das épocas do ano no estabelecimento *in vitro* de uma determinada planta, seja em aspectos fisiológicos ou fitossanitários; por exemplo, baixa intensidade de luz pode ocasionar menor quantidade de substâncias de reserva dificultando o estabelecimento e temperaturas baixas que facilitam a superação da dormência (PIERIK, 1990). Com relação à erva-mate, Bernasconi et al. (1998) demonstraram que o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais depende da época do ano em que se extrai o explante da planta matriz. É marcante a taxa de contaminação por fungo e bactéria nas diferentes épocas de estabelecimento.

Considerando as singularidades das condições meteorológicas de uma determinada região, este trabalho

¹ Graduando de Engenharia Florestal, UFSM, Estagiário da *Embrapa Florestas*. felippe_florestal@yahoo.com.br

² Químico, Doutor, Analista da *Embrapa Florestas*. hansel@cnpf.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. leo@cnpf.embrapa.br

⁴ Graduanda de Engenharia Florestal, UFSM, Estagiária da *Embrapa Florestas*. kenia_m_quadros@yahoo.com.br

teve como objetivo avaliar o comportamento *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate, extraídos de planta matriz adulta em diferentes épocas do ano na Região Metropolitana de Curitiba.

Metodologia

O material vegetal constou de brotações de mudas oriundas de estaquia de árvores com 11 anos de idade, procedentes do Laboratório de Propagação de Plantas da *Embrapa Florestas*, Colombo, PR (25°25'S, 49°14'W). As mudas se encontravam em estufa e foram pulverizadas semanalmente com 1,0 g L⁻¹ de Fungitol azul® e 2 mL L⁻¹ de Derosal®.

Em agosto, setembro e dezembro de 2005 e março, abril e maio de 2006, brotações foram coletadas e imediatamente imersas em solução aquosa de ácido ascórbico (1%, m/v). Após coletados, no laboratório de cultura de tecidos da *Embrapa Florestas*, explantes de 1,0-1,5 cm de comprimento foram extraídos das brotações, e desinfestados em álcool (70%, 1 min.) e hipoclorito de sódio (5% + 5 gotas de tween-20/100 mL, 20 min.), seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada.

Realizado o processo de assepsia, os segmentos nodais foram inoculados em frascos de vidro (8 cm x 2 cm de diâmetro interno) contendo 10 mL do meio ¼ MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 14 g L⁻¹ de sacarose, solidificado em 7 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa de 85 mmol m⁻² s⁻¹. A avaliação do cultivo *in vitro* dos explantes foi feita após 30 dias de cultivo com base na porcentagem de contaminação por bactérias, fungos, explantes oxidados e sadios.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições contendo cinco explantes por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Resultados e Discussão

A produção de explantes sadios foi significativamente superior em agosto (57%), quando comparado aos demais meses testados, nos quais as taxas de sobrevivência não foram superiores a 25% (Tabela 1). A maior taxa de contaminação por fungos ocorreu no mês de maio (60%), não diferindo significativamente dos meses de setembro e dezembro. Nos meses de março, abril e agosto ocorreram as menores contaminações por fungos. Já para

contaminação por bactérias a maior incidência ocorreu no mês de abril (70%), enquanto que os meses de agosto e maio apresentaram os menores índices de contaminação bacteriana, com 5% e 15%, respectivamente. Quanto à oxidação, esta foi maior no mês de março (30%), superior significativamente aos demais meses testados, nos quais esta não ultrapassou os 13%.

Tabela 1: Efeito das diferentes épocas do ano no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Ilex paraguariensis* obtidos de mudas produzidas por estaquia.

Época do ano	Fungos	Bactérias	Oxidados	Sadios
%				
2005				
Agosto (inverno)	25 ^B	5 ^C	13 ^B	57 ^A
Setembro (inverno/primavera)	40 ^A	40 ^B	10 ^B	10 ^B
Dezembro (verão)	50 ^A	45 ^B	0 ^B	5 ^B
2006				
Março (verão)	20 ^B	35 ^B	30 ^A	15 ^B
Abril (verão/outono)	25 ^B	70 ^A	5 ^B	5 ^B
Maió (outono)	60 ^A	15 ^C	0 ^B	25 ^B

Médias com letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05).

Aparentemente não houve nenhuma relação da época do ano com a contaminação por fungos. O mês de março (verão) não apresentou nenhuma diferença significativa quando comparado com o mês de agosto (inverno), 20% e 25%, respectivamente. O mesmo não foi visto na contaminação por bactérias, no qual os meses de agosto (inverno) e maio (outono), foram diferentes dos demais. O mês de abril (verão/outono) apresentou alta taxa de contaminação por bactéria (70%), isso pode estar associado à alta temperatura média mensal que ficou em torno de 21 °C (Figura 1). Com respeito à oxidação dos explantes, essa se mostrou dentro dos limites aceitáveis na maioria dos meses do ano, inferior a 13%, conforme demonstrado no trabalho de Mroginski et al. (1997). Entretanto, o mês de março apresentou uma taxa significativa de oxidação (30%), que pode estar relacionada à estação do ano (verão), onde as temperaturas médias anuais mais altas poderiam estar favorecendo uma maior atividade fisiológica na planta matriz, ocasionando assim uma maior produção de compostos fenólicos quando introduzidos *in vitro*.

Conforme mostrado (Tabela 1), o mês de agosto (inverno) foi o mais adequado para extração e estabelecimento de segmentos nodais com uma taxa de 57% de indivíduos sadios. Esses resultados apresentaram-se contrários aos divulgados por Bernasconi et al. (1998), no qual os meses

para melhor introdução *in vitro* foram os de janeiro e fevereiro (verão). Isto pode estar associado com a quantidade de microorganismos contaminantes presentes nos explantes de forma endógena nas diferentes épocas do ano. Na Figura 1, é apresentada uma relação da umidade relativa e temperatura média para a Região Metropolitana de Curitiba (SIMEPAR, 2006), em associação com as épocas de introdução dos explantes *in vitro*. O mês de melhor resultado (agosto) apresentou a menor temperatura média (13,9 °C) e umidade relativa (72,5%), o que poderia estar dificultando o desenvolvimento de microorganismos nos tecidos da planta, já que a atmosfera se apresentou fria e seca nesta época, característica típica do inverno desta região. A baixa percentagem de indivíduos sadios nos meses de março (verão) e abril (verão/outono) pode estar associada às características climáticas da região, meses quentes e úmidos (Figura 1).

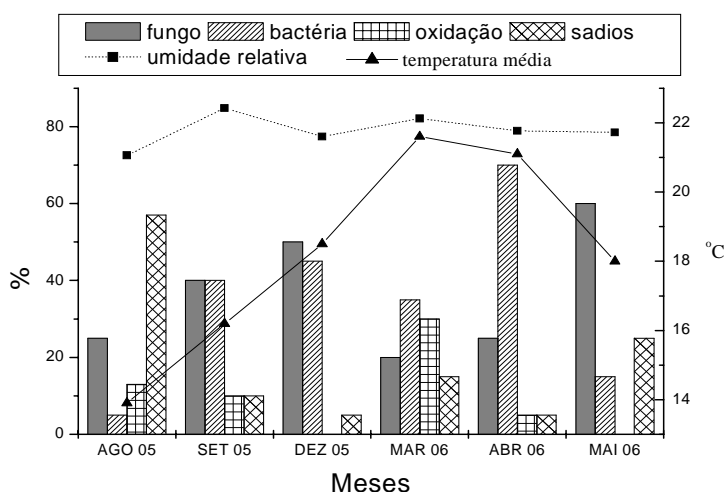


Figura 1: Efeito das épocas do ano na porcentagem de fungos, bactérias, oxidação e explantes sadios no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate, e sua relação com a umidade relativa (%) e temperatura média (°C) da Região Metropolitana de Curitiba.

Kowalski & Van Staden (1998) demonstraram para a espécie *Waburgia salutaris* o mesmo comportamento sazonal apresentado pela erva-mate, no qual a coleta do material nas plantas matrizes em meses de menor temperatura apresentou menores taxas de contaminação por bactéria. O efeito da temperatura no desenvolvimento de patógenos em plantas é bem conhecido; temperaturas do outono tardio, inverno e início de primavera estão geralmente abaixo do mínimo requerido para muitas bactérias (AGRIOS, 1978). Entretanto, existem algumas espécies de patógenos resistentes ao frio, mas se esse fosse o caso para a erva-mate, a distinção na incidência de bactérias no cultivo *in vitro* de materiais coletados de plantas matrizes no verão e inverno não seria perceptível (Figura 1).

Conclusões

Existiu influência da época do ano em que se realizou a extração das brotações para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate. Os explantes cultivados em agosto (inverno) apresentaram a maior taxa de sobrevivência (57%) e menor contaminação por bactéria (5%) em comparação com os explantes cultivados nas mesmas condições nos outros meses do ano testados.

Referências

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 2nd. ed. New York: Academic Press, 1978. 703 p.
- BERNASCONI, N. K.; MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. Micropropagación de la yerba-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del genotipo y de la época del año en el establecimiento *in vitro* de los explantes. **Phyton**, v. 2, n. 1/2, p. 95-99, 1998.
- KOWALSKI, B.; VAN STADEN, J. Cold treatment, as part of the process, improves explant decontamination. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 203-205, 1998.
- MROGINSKI, L. A.; BERNASCONI, N. K.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. Micropropagación de la yerba-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. **Phyton**, v. 9, p. 161-170, 1996.
- MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; REY, H.; COLLAVINO, M. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): estado actual y perspectivas. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE-SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais**. Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1997. p. 141-152. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 33).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant** v. 15, p. 473-497, 1962.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.
- SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; KRIVENKI, M. A. Plant regeneration from *Ilex* spp. (Aquifoliaceae) *in vitro*. **Biocell**, v. 25, n. 2, p. 139-146, 2001.
- SIMEPAR. **Monitoramento e previsão**. Disponível em: <<http://www.simepar.br/>>. Acesso em: 3 jul. 2006.

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

Comunicado Técnico, 163

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Endereço: Estrada da Ribeira km 111 - CP 319

Fone / Fax: (0***) 41 3675-5600

E-mail: sac@cnpf.embrapa.br

Para reclamações e sugestões *Fale com o*

Ouvidor: www.embrapa.br/ouvidoria

1ª edição

1ª impressão (2006): conforme demanda



Comitê de publicações

Presidente: *Luiz Roberto Graça*

Secretária-Executiva: *Elisabete Marques Oaida*

Membros: *Álvaro Figueredo dos Santos*

Edilson Batista de Oliveira / Honorino R. Rodigheri /

Ivar Wendling / Maria Augusta Doetzer Rosot / Patrícia

Póvoa de Mattos / Sandra Bos Mikich / Sérgio Ahrens

Expediente

Supervisor editorial: *Luiz Roberto Graça*

Revisão texto: *Mauro Marcelo Berté*

Normalização bibliográfica: *Elizabeth Câmara*

Trevisan / Lidia Woronkoff

Foto: *Kenia Michele de Quadros*

Editoração eletrônica: *Mauro Marcelo Berté*