

### 3.07- MICROPROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE: EFEITO DA DESINFESTAÇÃO NO ESTABELECIMENTO DE SEGMENTOS NODAIS

F. Correa da Rosa<sup>29</sup>; L. F. Dutra<sup>30</sup>; G. E. Brondani<sup>31</sup>; F. A. Hansel<sup>32</sup>

#### Resumo

Em função da dificuldade de propagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por via sexuada ou assexuada, a micropropagação é uma técnica que apresenta possibilidade de aplicação. Entretanto, em vista das dificuldades, principalmente com contaminações, ainda não se justificou técnica e economicamente. A eficiência de tratamentos para desinfestação de segmentos nodais de erva-mate foi testada. Os explantes foram coletados de brotações de minicepas cultivadas em sistema semi-hidropônico, procedentes de clones de material adulto, com 11 anos de idade, resgatados via estaquia. Testaram-se cinco tratamentos de assepsia, variando diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio. Sete dias após a introdução dos explantes *in vitro* verificou-se elevada taxa de contaminação por fungos e bactérias, além de uma menor taxa de oxidação nos explantes. O hipoclorito de sódio a 5%, com tempo de imersão de 20 minutos combinado com álcool (70%) por um minuto, proporcionou obtenção de até 15% de explantes sadios.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*, micropropagação, assepsia, segmento nodal, contaminação.

### MICROPROPAGATION OF ERVA MATE: EFFECT OF THE DISINFECTION IN THE ESTABLISHMENT OF NODAL SEGMENTS

#### Abstract

The propagation of mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) is very difficult by seeds and vegetative propagation such as cutting and minicutting. The micropropagation has been used successfully to produce of mate tree. However, when published methods of asepsis were used in our recent work problems with contamination was seen. The aim of this work is to compare different method of asepsis to the establishment of mate tree nodal segment. The explants of adult plant (11 years old) were collect from ministump grown in a semi-hydroponic system. After seven days of culture was verified a high taxes of contamination (fungi and bacteria) and a lower amount of oxidation in the explants. The best treatment tested was immersion in sodium hypochloride (5%, 20 min) combined with ethanol (70 %, 1 min), this treatment yielded 15% of healthy explants.

**Key- words:** *Ilex paraguariensis*, micropropagation, asepsis, nodal segment, contamination.

#### Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma espécie lenhosa, encontrada naturalmente no nordeste da Argentina, leste do Paraguai, Uruguai e sul do Brasil. Caracteriza-se por ser uma planta geralmente perenifólia, de importância econômica, muito cultivada nos três estados sulinos do Brasil, pelo uso de suas folhas no preparo de uma bebida estimulante conhecida como “mate” (Rey *et al.*, 2002).

A produção de mudas de erva-mate via sementes apresenta uma série de limitações e dificuldades, como baixa qualidade genética e fisiológica das sementes, dormência das sementes, longo tempo para estratificação, germinação demorada e desuniforme e em baixo percentual, além da dificuldade de obtenção de sementes com alto padrão genético (Wendling, 2004). Por outro lado, estudos visando desenvolver as técnicas de propagação vegetativa são escassos e os protocolos

<sup>29</sup> Acadêmico do Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Estagiário da *Embrapa Florestas* (felippe\_florestal@yahoo.com.br).

<sup>30</sup> Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da *Embrapa Florestas* – CNPF. Estrada da Ribeira Km 111, CEP 83411-000, Colombo (PR) (leo@cnpf.embrapa.br).

<sup>31</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, UFPR. CEP 80210-170, Curitiba (PR), Bolsista do CNPq (gebrondani@yahoo.com.br).

<sup>32</sup> Químico, Dr. Técnico de Nível Superior III da *Embrapa Florestas*. Estrada da Ribeira Km 111, CEP 83411-000, Colombo (PR) (hansel@cnpf.embrapa.br).

desenvolvidos até o momento se referem principalmente o material juvenil não selecionado. Entre as principais desvantagens da propagação vegetativa tem-se a dificuldade de obtenção de enraizamento em algumas matrizes e de enraizamento em plantas não-juvenis. Uma das possíveis causas da baixa percentagem de enraizamento de estacas de erva-mate oriundas de árvores adultas é a baixa juvenildade do ramo (Wendling e Souza, 2004).

Diante do exposto, a micropropagação é uma técnica de propagação com potencial para ser empregada. No entanto, há a necessidade de desenvolvimento de um protocolo específico de micropropagação que possibilite a obtenção de um grande número de indivíduos com genótipos selecionados a partir de poucas matrizes de erva-mate em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (Rey *et al.*, 1991). Entretanto, de acordo com Wendling (2004), o uso da micropropagação na produção comercial de mudas de espécies florestais ainda não se justificou técnica e economicamente, pela alta possibilidade de contaminação, alto custo, variação das condições de cultura entre e dentro de clones.

No caso de estabelecimento de explantes de plantas matrizes adultas diretamente *in vitro*, as únicas respostas que se obtêm, segundo diversos autores, são a oxidação e contaminação com fungos e bactérias, prejudicando o processo de formação de brotações. A micropropagação de erva-mate está limitada pela alta contaminação com fungos e/ou bactérias e pela rápida oxidação dos segmentos nodais utilizados como explantes (Rey e Mroginski, 1988), embora nos últimos anos tenha sido possível determinar um adequado meio de cultivo para o estabelecimento *in vitro* e um apropriado tipo de fonte de explantes (Rey *et al.*, 1991; Bernasconi *et al.*, 1996; Mroginski *et al.*, 1996; Mroginski *et al.*, 1997; Sansberro *et al.*, 1999; Sansberro *et al.*, 2002).

Na fase de desinfestação a dificuldade maior reside em se obter material descontaminado, sem conduzi-lo à morte quando isolado. São determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta matriz para o sucesso dessa etapa de trabalho, principalmente no que se refere aos microorganismos endógenos. Em casa de vegetação, o controle de insetos e microorganismos é possível por meio de aplicações de fungicidas, bactericidas e inseticidas (Torres e Caldas, 1990). Em princípio, há quatro principais fontes de infecções: a própria planta (internamente e externamente), o meio nutritivo (insuficientemente esterilizado), o ar e o trabalho de laboratório. A mais importante dessas fontes de infecção é a própria planta, devendo o material vegetal ser bem desinfestado antes e durante o isolamento *in vitro* (Pierik, 1997).

O objetivo desse trabalho foi verificar qual a forma de assepsia mais eficiente na desinfestação de segmentos nodais, provenientes de material adulto de erva-mate propagado por estaquia convencional, visando o estabelecimento *in vitro*.

## Material e Métodos

Foram coletadas brotações de minicepas cultivadas em sistema semi-hidropônico, procedentes de clones de material adulto, resgatados via estaquia. As plantas matrizes ficaram acondicionadas em estufa onde receberam desinfestação prévia semanalmente com uma mistura de fungicidas (Fungitol® azul, 1 g L<sup>-1</sup> e Derosal®, 2 mL L<sup>-1</sup>).

Após a coleta dos ápices das brotações, estes foram imersos em solução de ácido ascórbico (1%) para prevenir o processo oxidativo. Em seguida foi realizada pré-assepsia dos explantes, onde foram retiradas as folhas e excessos de hastes, com um comprimento de 1,5 cm e um par de gemas, sendo os mesmos deixados sob água corrente durante 15 minutos. Imediatamente os explantes foram submetidos aos seguintes tratamentos de desinfestação: T0 (testemunha) - imersão em álcool (70%) por 1 minuto + 3 lavagens em água autoclavada; T1 - hipoclorito de sódio (5% de cloro ativo) por 10 minutos; T2 - hipoclorito de sódio por 20 minutos; T3 - hipoclorito de sódio por 10 minutos + hipoclorito de sódio por 10 minutos e; T4 - hipoclorito de sódio por 20 minutos + hipoclorito de sódio por 20 minutos. Todos os tratamentos de assepsia foram iniciados com imersão dos explantes em álcool (70%) por 1 minuto e entre as imersões com álcool e hipoclorito de sódio, foi realizada uma lavagem com água autoclavada. Ao final da assepsia foram realizadas três lavagens com água autoclavada.

Após os tratamentos de desinfestação os explantes foram introduzidos em meio de cultura composto pelos sais e vitaminas do meio ¼ MS, contendo 14 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8; seguido da adição de 6 g L<sup>-1</sup> de agar. O meio de cultura foi distribuído

em recipientes de vidro com 22 cm<sup>3</sup> contendo 10 mL de meio de cultura cada, sendo em seguida autoclavados a 120 °C, 1,5 kg cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos.

Depois de inoculados, os explantes foram mantidos em sala de incubação, sob fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C e intensidade luminosa de 85 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. Procedeu-se a avaliação da contaminação aos sete dias contados a partir da data de introdução, onde avaliaram-se as percentagens de contaminação dos explantes por fungos e bactérias, de oxidação e de explantes sadios.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições e quatro explantes por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância, tendo as médias sido discriminadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Os maiores percentuais obtidos no estabelecimento de segmentos nodais de erva-mate foram de fungos, bactérias e de oxidação (Tabela 1). O maior percentual de explantes sadios (15%), foi obtido com o tratamento T2.

Em valores absolutos, os menores percentuais de ocorrência de fungos e bactérias foram obtidos no tratamento T4, entretanto com o maior percentual de oxidação e ausência de explantes sadios. Este resultado provavelmente pode ser explicado devido ao maior tempo de imersão em hipoclorito de sódio, com redução na contaminação, mas com elevada oxidação.

**Tabela 1.** Percentagens de ocorrência de fungo, bactéria, oxidação e explantes sadios após 7 dias de inoculação de segmentos nodais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em meio de cultura ¼ MS.

| Tratamento | Fungo     | Bactéria | %         |         |
|------------|-----------|----------|-----------|---------|
|            |           |          | Oxidação  | Sadios  |
| T0         | 35,0 Aa   | 35,0 Aa  | 25,0 Ab   | 5,0 Aab |
| T1         | 15,0 Bab  | 20,0 Ba  | 65,0 Aab  | 0,0 Bb  |
| T2         | 10,0 Bab  | 45,0 Aa  | 30,0 ABab | 15,0 Ba |
| T3         | 15,0 BCab | 30,0 Ba  | 55,0 Aab  | 0,0 Cb  |
| T4         | 5,0 Bb    | 15,0 Ba  | 80,0 Aa   | 0,0 Bb  |

Médias seguidas de uma mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Embora com diferença significativa somente no tratamento T2, os percentuais de contaminação bacteriana tenderam a ser maiores do que de contaminação fúngica. Esta resposta é semelhante à encontrada por Zaniolo e Zanette (2002).

Pode-se perceber que os tratamentos aplicados aos explantes não foram eficientes para controlar a ocorrência de fungos, exceto o tratamento T4, e de bactérias. Além disso, houve tendência de aumento nas taxas de oxidação com o incremento do tempo de imersão em hipoclorito de sódio.

Os resultados obtidos estão de acordo com a observação de Rey e Mroginski (1988), para os quais a micropropagação de erva-mate está limitada pela alta contaminação com fungos e/ou bactérias e pela oxidação dos segmentos nodais utilizados como explantes. Entretanto, como vários autores têm relatado sucesso no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de erva-mate, recomenda-se a continuidade dos trabalhos visando estabelecer tratamentos de desinfestação eficientes dos explantes.

Há que se considerar, também, que dos vários fatores que interferem nos diferentes resultados de estabelecimento e resposta morfológica *in vitro* de erva-mate, deve-se considerar o genótipo. Sansberro *et al.* (2001), em trabalho com regeneração *in vitro* de sete espécies do gênero *Ilex*, obtiveram percentuais de escurecimento (oxidação) dos explantes entre 0 e 23%, e de contaminação por bactérias e fungos entre 20 e 96%. Bernasconi *et al.* (1998) também obtiveram resultados semelhantes a estes, em experimento com cinco clones de erva-mate.

## Conclusões

É elevada a ocorrência de contaminações por fungos e bactérias, bem como oxidação dos explantes de erva-mate.

O tratamento 2 (álcool (70%) por 1 minuto + hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos) propiciou maior percentual de explante sadios.

Maiores tempos de imersão em hipoclorito de sódio proporcionam menores percentuais de contaminação por fungos e bactérias, mas elevada oxidação e ausência de explantes sadios.

### Referências Bibliográficas

- Bernasconi, N. K.; Mroginski, L. A.; Sansberro, P. A.; Rey, H. Y. Micropropagación de la yerba-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del tipo de explante en el establecimiento *in vitro*. *Phyton*. 58:23-31, 1996.
- 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*. 62(1/2):95-99, 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*. 59:161-170, 1996.
- Mroginski, L. A.; Sansberro, P.; Rey, H.; Collavino, M. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) estado actual y perspectivas. Anais. Congresso Sul-Americano da Erva-Mate. Curitiba, p. 141-151, 1997. (Documentos 33).
- Pierik, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 89 p., 1997.
- Rey, H. Y.; Mroginski, L. A. Regeneración de plantas de Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo *in vitro* de ápices caulinares y segmentos nodales. *Phyton*. 48:139-145, 1988.
- Rey, H. Y.; Burtnik, O. J.; Sansberro, P. A.; Mroginski, L. A. Medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantes de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Turrialba*. 41(3): 306-310, 1991.
- Rey, H. Y.; Sansberro, P. A.; Collavino, M. M.; Daviña, J. R.; González, A. M.; Mroginski, L. A. Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Euphytica*. 123: 49-56, 2002.
- Sansberro, P.A.; Rey, H. Y.; Mroginski, L. A.; Collavino, M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *In vitro Cellular Development Biology-Plant*. 35:401-402, 1999.
- Sansberro, P. A.; Rey, H. Y.; Mroginski, L. A.; Kryvenski, M. A. Plant regeneration from *Ilex* spp. (Aquifoliaceae) *in vitro*. *Biocell*. 25(2): 139-146, 2001.
- Sansberro, P. A.; Mroginski, L. A.; Masciarelli, O. A.; Bottini, R. Shoot growth in *Ilex paraguariensis* plants grown under varying photosynthetically active radiation is affected through gibberellin levels. *Plant Growth Regulation*, 38:231-236, 2002.
- Torres, A. C.; Caldas, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA – CNPH, p. 99-169, 1990.
- Wendling, I. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras. Colombo – Embrapa Florestas, 2004. 46 p. (Documentos 91).
- Wendling, I.; Souza, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. Anais. 3º Congresso Sul-Brasileiro da Erva-mate. 2004. 9p.
- Zaniolo, S.R.; Zanette, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria*, Curitiba – UFPR, v.2, n.1-2, p. 31-36, 2002.