

CALOGÊNESE *IN VITRO* A PARTIR DE FOLHAS DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Degenhardt-Goldbach, J.: Stachevski, T.w.²; Franciscon, L.³; Buss, S.4; Wendling, E⁵; Dutra, L.F.⁵ .

¹Pesquisador da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira km 111-Cl!P 83411-000, Colombo, PR juliana@cnpf.embrapa.com.br

²Aluna do curso de Biologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

³Analista, estatística da Embrapa Florestas

⁴Aluna de Graduação do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR

⁵Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado

Resumo

Este trabalho objetivou avaliar a indução *in vitro* de calogênese em folhas de erva mate. Inicialmente foi avaliada a calogênese em função do tamanho de folhas em meio Y4 MS, com 30 g/L de sacarose, 0,1 g/L de mio-inositol 1 mg/L BAP, 0,2 mg/L ANA e 7 g/L de agar. A seguir, folhas de plantas de 2 e 10 anos foram utilizadas para avaliar o efeito de fitorreguladores no mesmo meio anterior adicionado de: zeatina (0,5; 1,0 ou 2,0 mg/L); BAP (0,5; 1,0 ou 2,0 mg/L) ou 2iP (0,5; 1,0 ou 2,0 mg/L) combinados ou não com 1,0 mg/L de 2,4D. Observou-se que folhas de tamanho médio apresentaram menor porcentagem de necrose, mas não foram observados calos no meio testado. No segundo experimento, houve indução de calos em meios que continham a combinação de 2,4 D com zeatina ou 0,5 mg/L de 2ip, independentemente da idade das mudas.

Palavras-chave: organogênese; idade do explante; citocininas; auxinas

In vitro CALLOGENESIS OF YERBA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) LEAVES FROM GREENHOUSE PLANTS

Abstract

Was evaluated the *in vitro* callus induction on leaves ofyerba mate. In the first experiment, callus induction was evaluated regarding the size of leaves on Y4 MS medium with 30 g/L sucrose, 0.1 g/L myo-inositol 1 mg/L BAP, 0.2 mg/L NAA and 7 g/L agar. In the second experiment, leaves of 2 and 10 years plants were used to evaluate the effect of growth regulators in the same medium as before supplemented with: zeatin (0.5, 1.0 or 2.0 mg/L), BAP (0.5; 1.0 or 2.9 mg/L) or 2iP (0.5, 1.0 or 2.0 mg/L) combined or not with 1.0 mg/L 2,4 D. Leaves of average size showed a lower percentage of necrosis, but no regeneration was observed in the first experimento In the second experiment, was observed callus induction on media containing a combination of 2.4 D with zeatin or 0.5 mg/L 2ip, regardless the age of seedlings.

Keywords: organogenesis; explant age; cytokinins, auxins

Introdução

A erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) é nativa da Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária) e raramente encontrada em Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica). Suas folhas possuem um teor de cafeína não inferior ao do café, das quais se prepara o chimarrão, o tereré ou o chá mate. Nelas são encontradas também os taninos que dão o sabor adstringente desta bebida, além de alcalóides (Simões et al., 1998).

A multiplicação a partir de sementes é normalmente dificultada pela dormência em virtude da imaturidade do embrião, além de dormência tegumentar, devendo passar por um período de estratificação (Fowler & Sturion, 2000). Além disso, as sementes apresentam baixa qualidade genética e fisiológica (Sturion, 1988; Menna, 1995) e não são indicadas para iniciarem plantios, devido à alta variabilidade genética.

Técnicas de cultura de tecidos permitem diminuir o tempo de produção, auxiliam no melhoramento genético e podem ser consideradas ferramentas biotecnológicas para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas de interesse comercial. Estas técnicas também são muito utilizadas para a clonagem de espécies nativas e exóticas (Sado, 2009).

A micropropagação de erva mate a partir da introdução de segmentos nodais vem sendo relatada na literatura (Zaniolo e Zanete 1999; Horbach, 2008; Cuquel, 1993, Sansberro et al., 2001; Rey et al., 1991) e representa um método importante de resgate de material adulto. No entanto, este método ainda apresenta várias lacunas, entre elas as altas taxas de contaminação na introdução, baixas taxas de multiplicação e bactérias endógenas que aparecem ao longo dos subcultivos. Portanto, outras técnicas de cultura de tecidos devem ser investigadas para avaliar a viabilidade da obtenção de métodos de propagação vegetativa mais eficientes para esta espécie.

Um aspecto importante da capacidade adaptativa dos vegetais é a competência de iniciar a divisão celular a partir de qualquer tecido e regenerar órgãos perdidos ou mesmo poder se diferenciar em qualquer célula especializada como resposta a um determinado estímulo (Huey et al. 2003).

A indução de calos em diferentes tecidos vegetais pode ocorrer inoculando-se explantes de qualquer parte da planta em meio de cultura com o estímulo de reguladores de crescimento ocorre a indução de crescimento, modificando o metabolismo celular. Nesse processo, a diferenciação e a especialização celular são revertidas e o explante dá início a um novo tecido composto por células meristemáticas não especializadas. Embora o calo continue desorganizado durante a multiplicação celular, alguns tipos de células especializadas podem ser formados ao acaso por meio de centros de morfogênese. Essas células especializadas são capazes de iniciar a formação de órgãos como raízes, brotos e embriões somáticos (George et al. 2008). Tecidos jovens meristemáticos são os mais indicados, mas é possível obter calogênese a partir de fragmentos já diferenciados (Loyola-Vargas & Vazquez-Flota 2006; George et al. 2008)..

A embriogênese somática é uma técnica de cultivo *in vitro* capaz de multiplicar clones elite. Essa técnica apresenta vantagens sobre as demais técnicas de micropropagação, como a capacidade de produzir grande número de embriões num espaço limitado e o desenvolvimento direto de plantas a partir de embriões individualizados (Guerra et. al., 1999). É um processo no qual células isoladas, ou um pequeno grupo de células somáticas, dão origem a embriões, num processo morfogenético que se aproxima da seqüência de eventos representativos da embriogênese zigótica. A indução e o controle da embriogênese somática são dependentes do genótipo da planta matriz, da fonte e idade do explante, e do tipo e concentração dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura (Guerra et al. 1999).

A micropropagação da erva mate através de embriogênese somática poderia fomentar programas de melhoramento genético e diminuir o risco de perda de material genético, a partir da conservação *in vitro*. Embriões somáticos já foram obtidos a partir de embriões imaturos, tanto de forma direta (sem a formação de calos), quanto de forma indireta (Rey et al., 2002). A calogênese é uma etapa para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a indução de calos em folhas de plantas de erva mate de dois ou dez anos mantidas em casa de vegetação de diferentes tamanhos e sob diferentes concentrações de fitorreguladores.

Material e métodos

1. Material vegetal

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Florestas, Colombo, PR. Foram utilizadas plantas matrizes cultivadas em minijardim clonal, em sistema semihidropônico, em casa de vegetação. Foram utilizadas plantas de dois anos, obtidas a partir de sementes, e plantas de 10 anos, originadas por estaquia de plantas a campo selecionadas pelo programa de melhoramento da erva mate da Embrapa Florestas.

2. Calogênese a partir de folhas

As folhas foram coletadas em solução de ácido ascórbico (0,5 g/L) e ácido cítrico (0,5 g/L). No laboratório foram inicialmente imersas em solução de álcool 70% por 1 minuto seguido de solução de

NaClO 2,5% por 20 minutos. Após tríplice lavagem com água bidestilada e autoclavada, as folhas foram cortadas com auxílio de bisturi no sentido longitudinal, e então colocadas em placas de petri com a face adaxial voltada para o meio de cultura, conforme os respectivos tratamentos. As folhas foram mantidas no escuro com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por duas semanas e então colocadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas.

3. Influência do tamanho das folhas de erva mate na indução de calos

Folhas de plantas de 2 anos de idade de diferentes tamanhos foram utilizadas, sendo as pequenas correspondentes às duas folhas mais jovens das plantas (recém emitidas), folhas médias, as duas folhas a seguir e -folhas grandes, as 2 folhas logo abaixo destas. Foram utilizados 5 explantes por placa, com 5 placas por tratamento.

O meio de cultura utilizado foi o Y4 MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo 30 g L-I de sacarose, 0,1 mg L-I de mioinositol, 1 mg L-I de BAP (6-benzil aminopurina), 0,2 mg L-I de ANA (ácido naftalenoacético), e 7 g L-I de ágar. Após 15 dias foi avaliada a contaminação dos explantes por fungos ou bactérias, a formação de calos e a quantidade de explantes necrosados.

Os dados do experimento foram analisados por meio da análise de deviance. A distribuição de probabilidade usada foi a binomial, o modelo mediu os efeitos de tratamentos para as variáveis. As comparações entre os tratamentos foi feita através de contrastes ortogonais.

Efeito de fitorreguladores e da idade da planta matriz na calogênese *in vitro* de erva mate

Foram utilizadas plantas matrizes de 2 ou de 10 anos. Foram testados diferentes fitorreguladores e concentrações acrescidos ao meio Y4 MS contendo 30 g L-I de sacarose, 0,1 mg/L de mioinositol, e 7 g L-I de ágar, conforme os seguintes tratamentos:

TO- sem fitorreguladores; T1-zeatina 0,5 mg L-I; T2- zeatina 0,5 mg L-I+ 1 mg L-I 2,4 D (ácido diclorofenoxiacético); T3- zeatina 1,0 mg L-I; T4- zeatina 1,0 mg L-I+ 1 mg L-I2,4 D; T5- zeatina 2,0 mg L-I; T6- zeatina 2,0 mg L-I+ 1 mg L-I2,4 D; T7-BAP 0,5 mg L-I; T8- BAP 0,5 mg L-I+ 1 mg L-I2,4 D; T9- BAP 1,0 mg L-I; T10- BAP 1,0 mg L-I+ 1 mg L-I2,4 D; T11- BAP 2,0 mg L-I; T12- BAP 2,0 mg L-I+ 1 mg L-I2,4 D; T13-2ip (ô-ê-ô-dimetilamilalino-purina) 0,5 mg L-I; T14-2ip 0,5 mg L-I+ 1 mg L-I2,4 D; T15-2ip 1,0 mg L-I; T16-2ip 1,0 mg C¹ + 1 mg L-I2,4 D; T17-2ip 2,0 mg i.', T18-2ip 2,0 mg L-I+ 1 mgL⁻¹,2,4D.

Foram utilizadas 3 placas por tratamento, com 5 explantes por placa. Após 30 dias foi avaliada a presença de calos nos explantes.

Resultados e Discussão

1. Influência do tamanho das folhas de erva mate na indução de calos

Para avaliar a possibilidade de utilização de folhas de erva mate mantidas *in vitro* para indução de calos, folhas de diferentes tamanhos/idades foram utilizadas.

Foram avaliadas folhas de 3 tamanhos diferentes (Tabela 1). A porcentagem de explantes oxidados foi influenciada pelo tamanho das folhas. Folhas de tamanho médio apresentaram a menor porcentagem de oxidação, indicando que estas folhas devem ser preferidas para indução de calos para embriogênese somática ou organogênese. Normalmente, explantes mais jovens tendem a responder melhor aos tratamentos de indução de calos. No entanto, as folhas muito jovens demonstraram sofrer mais intensamente com a oxidação.

De acordo com a análise de contrastes ortogonais, a oxidação em folhas médias difere estatisticamente das pequenas e grandes quando avaliadas em conjunto, e de folhas grandes isoladamente. Com relação à contaminação por fungos, também houve diferença com relação ao tamanho das folhas utilizadas. As folhas grandes apresentaram menor contaminação por fungos em relação às demais, mas no entanto apresentaram 80% de oxidação.

Não foi observada contaminação por bactérias. No meio avaliado, não houve formação de calos em nenhum dos tratamentos.

Tabela 1 – Porcentagem de explantes de erva mate de diferentes tamanhos contaminados com fungos ou bactérias, oxidados e com calos em meio ¼ MS acrescido de BAP e ANA.

| Tratamento | Fungos * | Bactérias | Oxidados * | Calos |
|---------------|------------|-----------|------------|-------|
| T1 - pequenas | 30,8±0,092 | 0 | 46,2±0,100 | 0 |
| T2 – médias | 42,9±0,095 | 0 | 21,4±0,079 | 0 |
| T3 - grandes | 7,7±0,053 | 0 | 80,8±0,079 | 0 |

* Variáveis com diferença estatística significativa entre os tratamentos

2. Efeito de fitorreguladores e da idade da planta matriz na calogênese *in vitro* de erva mate

Com relação aos fitorreguladores testados na indução de calos, na maioria dos tratamentos, a resposta de indução de calos foi independente da idade das plantas (Tab. 2). O 2,4D demonstrou ser indispensável para a indução de calos em combinação com a zeatina ou o 2ip.

Dentre as citocininas testadas, a zeatina foi a mais eficiente, quando combinada com o 2,4D. Em todas as concentrações testadas houve a formação de muitos calos friáveis. Na presença de zeatina sem a adição de auxina Rey et al. 2002 induziram a formação de calos embriogênicos a partir de embriões tratados previamente com colchicina, trifluralina ou oryzalina. A obtenção de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos de forma direta ou indireta foi possível também para *Ilex aquifolium*, *I Cornuta* e *I opaca* sem a adição de fitorreguladores (Hu & Sussex, 1971; Hu et al., 1978; Hu, 1989).

Em *Rosa hybrida*, a combinação de zeatina e 2,4D também possibilitou a formação de embriões somáticos (Burrell et al., 2006).

Em *Quercus suber*, a adição de 9 *IIM* de zeatina e 4,5 *IIM* de 2,4D possibilitaram a formação de embriões somáticos a partir de folhas de plantas de 60 anos de idade. Para esta espécie os autores também observaram pouca ou nenhuma formação de calos na presença de BAP e 2,4D (Pinto et al., 2002). Para esta espécie, a combinação de 4,5 mM de 2,4-D e 9.1 mM de zeatina foram ainda eficientes na indução de embriões somáticos a partir de folhas de plantas de 3 anos de idade (Pinto et al., 2001).

Na presença de 2ip houve a formação de alguns calos na menor concentração da citocinina, ou em folhas jovens, na presença de alta concentração, na ausência de 2,4D.

Para os tratamentos com BAP, houve a formação de calos apenas na ausência da auxina, e em concentrações diferentes para folhas de plantas jovens ou velhas. Folhas de plantas velhas exigiram maior concentração desse fitorregulador para a formação de calos. Estes resultados corroboram aqueles obtidos no primeiro experimento, onde BAP na presença de auxina não foi eficiente na indução de calos.

Tabela 2 - Formação de calos induzidos *in vitro* em folhas de erva mate de plantas de dois ou de- anos de idade (jovens e velhas, respectivamente) em meios de cultura contendo zeatina, BAP ou 2ip nas concentrações de 0,5; 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹ na presença ou ausência de 1 mg L⁻¹ de 2,4D.

| Tratamentos | Jovens | | Velhas | | Tratamentos | Jovens | | Velhas | |
|-------------|--------|---|--------|---|-------------|--------|---|--------|---|
| | P | A | P | A | | P | A | P | A |
| Controle | | X | | | T10 | | X | | X |
| T1 | | X | | | T11 | | X | X | |
| T2 | X | | X | | T12 | | X | | X |
| T3 | | X | | | T13 | | X | | X |
| T4 | X | | X | | T14 | X | | X | |
| T5 | | X | | | T15 | | X | | X |
| T6 | X | | X | | T16 | | X | | X |
| T7 | X | | | | T17 | X | | | X |
| T8 | | X | | | T18 | | X | | X |
| T9 | | X | | | | | | | |

P - presença de calos; A - ausência de calos

Conclusões

- As folhas de tamanho médio foram as mais adequadas para indução de calogênese, por apresentarem as menores taxas de necrose;
- A combinação de zeatina e 2,4D foi a mais favorável para a formação de calos em folhas;
- Apesar da formação de calos, não foi encontrado o balanço hormonal propício ao desenvolvimento de embriões somáticos e, portanto, outros fitorreguladores devem ser avaliados.

Referências bibliográficas

- Burrell AM, Lineberger RD, Rathore KS, Byrne DH (2006) Genetic variation in somatic embryogenesis of rose. *HortScience*, 41:1165-1168.
- Cuquel, EL. 1993 -Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva mate- Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo- ACI . Agric . ,Piracicaba,51(3):415 - 421,set/dez .1993.
- Fowler, IA.P.; Sturion, IA. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. Brasília: EMBRAPA, 2000. p.1-5. (Comunicado Técnico, 45).
- George, E.E, Hall, M.A. & Klerk, GD. 2008. Plant propagation by tissue culture. Vol I, The Background. 3 ed. Springer, Dordrecht, pp.508.
- Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, IB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.c.; Caldas, L.S.; Buso, IA. **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília, SPI/Embrapa, v.2, 1999, p. 533-568.
- Horbach, M.A.-2008 Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire - Aquifoliaceae) Santa Maria, RS, Brasil.
- Huey, RB., Carlson, M., Crozier, L., Frazier, M., Hamilton, H., Harley, C; Hoang, A.; Kingsolver, IG 2003. Plant versus animals: do they deal with stress in different ways? *Integrative and Comparative Biology* 42: 415-423.
- Loyola-Vargas, v'M.; Vazquez-Flota, E 2006. Plant cell cultures protocols. 2 ed.Humana Press Inc. New Jersey, Totowa.
- Menna, A. B. Prôposta para ação extensionista na cultura da erva-mate. In: WINGE, H.(1995) Murashige, T. & Skoog, E 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-496.
- Pinto, G; Valentim, H.; Costa, A.; Castro, S.; Santos, C. (2002) Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* tree. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:569-572.
- Pinto, G; Amaral, R.; Santos, c.; Carnide, O. (2001) Somatic embryogenesis in calluses of leaves from three year old *Quercus suber* L. plants. In: De Loose, M.; Amancio, S., eds. Quality enhancement of plant production through tissue culture. Book of Abstracts. Second Meeting of the Cost 843 WG3, Carcavelos, Portugal;:4ü-4l.
- Rey, H.Y.; Sansberro, P.A.; Collavino, M.M.; Daviífa, IR; González, A.M.; Mroginski, L.A (2002) Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Euphytica* 123(1):49-56(8).
- Rey, H. Y; Burtnik, O.1.; Sansberro, P.A.; Mroginski, L.A. (1991) Medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Turríalba*, 41(3):306-310.
- Sado, M. 2009 Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva, São Paulo, Dissertacao, Biodiversidade vegetal e meio ambiente, São Paulo, 2009.
- Sansberro, P.A.; Mroginski, L.A.; Bottini, R (2001) *In vitro* morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with different gibberellins and Prohexadione-Ca. *Plant Growth Regulation*, 34(2):209-214.

- Simões, C. M. O., Schenkel, E.P., Gosmann, G, Mello, J. C. P., Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (Org). 1999. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: EdUFSC, 323-354 ..
- Sturion, IA. Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate. Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1988. IOp. (EMBRAPA-CNPF. Circular Técnica, 17)
- Zaniolo, S.R.; Zanette, F. (2001) Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. Scientia agraria, 2(1-2): 39-44.