

MICROPROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)¹

LUCIANE DE A. HÖRNER², LIZETE AUGUSTIN³, CARLOS A. FORCELINI⁴, MARCELO S. MIELKE⁵, MARILEI SUZIN⁶, NORIMAR D. DENARDIN⁷

RESUMO – Com o propósito de desenvolver um sistema para micropropagação da erva-mate, realizaram-se quatro experimentos: I) Observação de contaminantes fúngicos e bacterianos e desenvolvimento de explantes cultivados *in vitro*; II) Efeito da utilização de pré-tratamentos fúngicos (Mancozeb e Benomil) nas plantas matrizes e de combinações do fungicida (Benomil) e antibiótico (Rifampicina) no meio de cultura; III) Desenvolvimento dos explantes em meio de cultura, com diferentes dosagens de citocinina (BAP); IV) Subcultivo e enraizamento dos explantes em dois meios (ágar + IBA ou vermiculita + IBA). Inicialmente, identificaram-se os fungos *Alternaria* sp e *Colletotrichum* sp, que causaram a morte dos explantes; observou-se, também, a incidência de bactérias, as quais não interferiram no desenvolvimento dos mesmos. A utilização de pré-tratamentos fúngicos reduziu em 90% as contaminações iniciais *in vitro*. O uso de BAP (0,2 a 0,8 mg.L⁻¹) no meio de cultura não estimulou a brotação e o número de folhas. O meio de enraizamento contendo IBA e vermiculita mostrou-se mais eficiente na elongação do material e emissão de raízes.

Palavras-chave: micropropagação, cultura *in vitro*.

MICROPROPAGATION OF ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

ABSTRACT – The objective of this study was to develop a micropropagation protocol for maté, which included the following experiments: I) Exam of culture medium contamination by microorganisms and *in vitro* development of explants; II) Pre-treatment of donor plants with the fungicides mancozeb and benomyl, amendment of ANA culture medium with various levels of benomyl and rifampicin; III) Development of erva-mate explants in culture medium with different rates of cytokinin (BAP); IV) Mass propagation and root development of explants in two culture media (with agar + IBA or vermiculita + IBA). The fungi *Alternaria* sp. and *Colletotrichum* sp. were identified contaminating micropropagated explants and causing plant death. Bacteria were also found but they did not affect explant development. Pre-treatment of donor plants with fungicide reduced *in vitro* contamination by 90%. The use of 0.2 to 0.8 mg L⁻¹ BAP in the culture medium did not stimulate shoot formation and did not influence leaf number. The rooting medium with IBA and vermiculita was more efficient on elongation and subsequent root emission.

Key words: micropropagation ; *in vitro* culture

¹ Trabalho realizado nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal, Fitopatologia e Bacteriologia da FAMV/UPF, Universidade de Passo Fundo, Caixa Postal 311, 99001-970, Passo Fundo, RS, Brasil

² Acadêmica do curso de Agronomia/UPF, bolsista PIBIC/UPF-CNPq, no período de maio de 1999 a abril de 2000

³ Eng. Agr., MSc. em Fitotecnia, Profa. da FAMV/UPF, augusto@upf.tche.br

⁴ Eng. Agr., Dr. em Fitopatologia, Prof. da FAMV/UPF

⁵ Eng. Agr., Dr. em Fisiologia Vegetal, Prof. da FAMV/UPF, no período de agosto de 1998 a março de 2000

⁶ Eng. Agr., MSc. em Fitotecnia, Assistente de Laboratório, Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF

⁷ Bióloga, Dra. em Ciências do Solo, área de Microbiologia, Prof. do ICB e da FAMV/UPF

Recebido para publicação em 10-07-2001.

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma das espécies vegetais mais importantes para o Rio Grande do Sul, tanto sob o aspecto ambiental (árvore nativa) como sócio-econômico, sendo a base ou uma alternativa de produção em pequenas e grandes propriedades.

Sua exploração baseia-se no extrativismo, e a maior parte do mate produzido provém de ervais nativos ou de plantas cultivadas originadas de sementes colhidas nas matas, devastando recursos genéticos naturais. Sementes e mudas são de baixa qualidade genética e fisiológica, apresentando baixa produtividade, se comparadas ao potencial das plantas selecionadas e/ou melhoradas geneticamente. Nas propriedades é observada grande variabilidade genética na produção de mudas obtidas de sementes, que apresentam ainda embrião rudimentar e baixo índice de retomada do crescimento embrionário, dificultando seu estabelecimento (RESENDE et al., 1995 e 1997; FERREIRA, 1997; MROGINSKI et al., 1997a e b).

Através do cultivo *in vitro* é possível a obtenção de um grande número de indivíduos selecionados, geneticamente iguais, em um espaço físico e temporal pequeno. O sistema de micropropagação divide-se em três estágios, envolvendo a seleção da planta matriz e dos explantes, desinfestação e inoculação, multiplicação do material em subculturas e transferência de partes aéreas para um meio de enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Um dos grandes problemas da micropropagação de lenhosas é a contaminação *in vitro*, dificultando e, em certos casos, inviabilizando o processo. Segundo CARVALHO et al. (1990), entre os vários fatores que afetam a obtenção de plantas micropropagadas, destaca-se a contaminação do material vindo do campo. As gemas apicais e axilares do caule, que constituem os explantes utilizados nesta técnica, abrigam uma grande variedade de microflora endógena — fungos e bactérias que persistem após a desinfestação dos materiais em laboratório.

A concentração de hormônios no meio é fator determinante no crescimento e

desenvolvimento dos explantes. Estes podem mostrar-se totalmente dependentes da presença dos reguladores exógenos no meio, ou podem sintetizar as quantidades necessárias. As auxinas e citocininas são as mais empregadas e, no caso de espécies pouco cultivadas *in vitro*, como a erva-mate, devem-se testar diversas combinações destas para fazer seu ajuste no meio (CALDAS et al., 1998; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Em relação ao enraizamento das espécies lenhosas, ASSIS e TEIXEIRA (1998) citam que uma das limitações da micropropagação tem sido o enraizamento dos explantes no meio de cultura. Há uma grande dificuldade de isolar e caracterizar os fatores que controlam o processo devido à sua complexidade e grande interação existente entre eles.

Este trabalho teve por objetivo estudar as várias fases do processo de micropropagação de erva-mate, visando à obtenção de mudas uniformes e de alta qualidade, fator decisivo para o incremento da cultura na Região Sul do Brasil. Para isso, realizaram-se quatro experimentos, nos quais foram testadas formas de reduzir a contaminação *in vitro* por fungos e bactérias e formulações de meios de cultura para multiplicação e enraizamento dos explantes de erva-mate.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO I - OBSERVAÇÃO DOS FUNGOS CONTAMINANTES E DESENVOLVIMENTO DOS EXPLANTES DE ERVA-MATE CULTIVADOS *IN VITRO*

Este experimento objetivou o estudo dos fungos e bactérias que ocorreram no cultivo *in vitro* de erva-mate. Inicialmente, foram selecionadas oito plantas do viveiro de mudas da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV/UPF), em março e abril de 1998. Destas, foram coletados, em março, 56 segmentos uninodais de brotações jovens das quatro primeiras plantas e, em abril, 37 segmentos das restantes.

Os materiais passaram por uma desinfestação em laboratório, em câmara de fluxo laminar e sob condições assépticas, sendo lavados com álcool 70% e imersos por 15 minutos em uma

solução de 1,5% hipoclorito de sódio (50% do produto comercial). Posteriormente, foram enxaguados com água destilada e autoclavada para retirar os resíduos dos produtos utilizados. Em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio com meio de cultura conforme descrito por MROGINSKI et al. (1997b): ¼ de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), a um pH igual a 5,8 (em meio de isolamento), e mantidos em câmara de cultura com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro e temperatura em torno de 25°C.

O desenvolvimento dos explantes *in vitro* foi observado semanalmente, verificando-se, principalmente, as taxas de contaminação fúngica e/ou bacteriana. Para fins de identificação dos patógenos, em setembro de 1998 foram coletados mais 26 segmentos uninodais de plantas provenientes do viveiro (que passaram pelo mesmo processo anterior), observando-se quais patógenos tiveram maior incidência e promoveram maior infestação. Estes foram, posteriormente, isolados em meios específicos para seu desenvolvimento, e os fungos identificados em nível de gênero.

Os fungos contaminantes dos explantes foram cultivados em meio BDA (batata dextrose ágar) até formarem colônias puras, sendo sua identificação realizada através da observação das estruturas em microscópio. O trabalho com as bactérias constou do plaqueamento em meio GYCA ou CCDEL e do isolamento das três bactérias presentes nos explantes. Após, realizaram-se os testes de coloração de Gran, observação das células bacterianas em microscópio e teste de oxidase.

EXPERIMENTO II - UTILIZAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTO NAS PLANTAS DOADORAS DE EXPLANTES E USO DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE FUNGICIDA E ANTIBIÓTICO NO MEIO DE CULTURA

Este experimento iniciou em dezembro de 1998 com a separação de 50 mudas de erva-mate produzidas no viveiro, com idade aproximada de um ano e meio. Estas passaram por um pré-tratamento constituído de cinco pulverizações com

fungicidas protetores e sistêmicos em intervalos de 15 dias. As pulverizações foram feitas com mancozeb (2 g.L⁻¹) e benomil (1 g.L⁻¹), alternadamente, entre dezembro de 1998 e fevereiro de 1999.

Após 20 dias da última pulverização, foram coletados 50 segmentos uninodais (um de cada planta, 5 cm abaixo do ápice). O material passou pelo processo habitual de desinfestação descrito anteriormente.

Posteriormente, os segmentos com uma gema axilar foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura ¼ MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, sendo estes submetidos a 10 combinações de fungicida e antibiótico adicionados ao meio, em cinco repetições, constituindo 50 unidades experimentais. As combinações foram as seguintes:

- T1: 0 mg.L⁻¹ benomil + 0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T2: 1,0 mg.L⁻¹ benomil + 10,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T3: 1,0 mg.L⁻¹ benomil + 25,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T4: 1,0 mg.L⁻¹ benomil + 50,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T5: 5,0 mg.L⁻¹ benomil + 10,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T6: 5,0 mg.L⁻¹ benomil + 25,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T7: 5,0 mg.L⁻¹ benomil + 50,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T8: 10,0 mg.L⁻¹ benomil + 10,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T9: 10,0 mg.L⁻¹ benomil + 25,0 mg.L⁻¹ rifampicin
- T10: 10,0 mg.L⁻¹ benomil + 50,0 mg.L⁻¹ rifampicin

Foram realizadas avaliações a cada dois dias (desenvolvimento dos explantes até 70 dias após inoculados), levando-se em conta as taxas de contaminação dos explantes, a proliferação de células cambiais, a oxidação do meio pela liberação de compostos fenólicos e o comportamento do material contaminado em meio de cultura.

EXPERIMENTO III – DESENVOLVIMENTO DOS EXPLANTES DE ERVA-MATE INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES DOSAGENS DE CITOCININA (BAP)

Os segmentos uninodais que apresentavam parte aérea desenvolvida (uma brotação) e ausência de contaminação, foram transferidos do meio de cultura inicial (¼ MS contendo 0,1 mg.L⁻¹ de ANA)

para meios contendo diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina). Este experimento teve o objetivo de determinar uma dosagem eficiente que induzisse à formação de maior número de brotações, as quais pudessem ser repicadas após sua elongação, permitindo a multiplicação dos materiais micropropagados.

O experimento consistiu em cinco tratamentos (0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹ de BAP), com três repetições, totalizando 15 unidades experimentais.

As avaliações foram realizadas, a cada dois dias (do desenvolvimento até 34 dias após a inoculação), em relação ao número de folhas emitidas, número de brotações nos diferentes tratamentos (doses de BAP) e comportamento dos explantes *in vitro* (observando-se a proliferação de células cambiais, elongação das brotações e formação de calos ou engrossamento do caule).

EXPERIMENTO IV – SUBCULTIVO E ENRAIZAMENTO DOS EXPLANTES EM DOIS MEIOS (ÁGAR+ IBA OU VERMICULITA + IBA)

Em janeiro de 2000, foram feitos o subcultivo e a inoculação do material não-contaminado obtido nos experimentos anteriores, apresentando parte aérea totalmente desenvolvida e alongada. Os explantes foram transferidos para dois tipos de meios de enraizamento a fim de observar em qual deles o processo seria mais eficiente.

Os meios de enraizamento foram denominados: Meio 1, composto por ¼ MS, com 30 g.L⁻¹ de Sacarose + 7 g.L⁻¹ de ágar + 1 mg.L⁻¹ de IBA (ácido indolbutírico); e Meio 2, composto por ¼ MS com 30 g.L⁻¹ de Sacarose + 1 mg.L⁻¹ de IBA + vermiculita previamente esterilizada.

Cada explante foi subcultivado inoculando-se os segmentos nos dois tipos de meio de enraizamento. Foram feitas avaliações periódicas para observar o desenvolvimento do material e a emissão de raízes nos Meios 1 e 2 e determinar qual o mais indicado para o processo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPERIMENTO I

Desenvolvimento dos explantes e contaminação *in vitro*

Os explantes inoculados na primeira e segunda tentativas de micropropagação (realizadas em março e abril de 1998), ao final de 1 semana apresentaram 50,7 % e 49,6 % de contaminação, respectivamente, que inviabilizou a técnica nas condições em que foi conduzida. As avaliações prosseguiram até 16 semanas após as inoculações, e a contaminação foi crescente.

O material vegetal inoculado em setembro de 1998 também foi avaliado semanalmente. As taxas de contaminação podem ser verificadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Porcentagem de contaminação e desenvolvimento em explantes uninodais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivados *in vitro*

Data inoculação	CF*(%)	CB*(%)	TC*(%)	EE*(%)	TP*(%)	ENC(%)
Março/98	37,5	23,2	50,7	12,5	73,2	26,8
Abril/98	32,4	16,2	49,6	10,8	59,4	70,5
Setembro/98	57,7	23,1	80,8	0	80,8	19,8

*CF= Contaminação fúngica; CB= Contaminação bacteriana; TC= Total de contaminação; EE= Explantes enegrecidos; TP= Total de perdas; ENC= Explantes não contaminados

Os fungos isolados em meio BDA foram identificados através da observação das estruturas dos mesmos em microscópio. Foi possível identificar os patógenos como sendo do gênero *Alternaria* sp e também duas espécies de *Colletotrichum* sp.

A grande contaminação observada neste experimento mostra que os microorganismos são a

causa mais importante das perdas no processo de micropropagação de erva-mate, concordando com o relato de MROGINSKI et al. (1997a). É importante salientar que os fungos causaram maiores danos quando comparados com as bactérias, pois impediram o desenvolvimento dos explantes, provocando sua morte, enquanto que as bactérias raramente o fizeram, pois os explantes contamina-

dos brotaram normalmente e emitiram folhas nas condições oferecidas. As bactérias encontradas possuíam como características: serem gran negativas e aeróbicas e possuem formatos celulares variados (células circulares, alongadas, em bastonetes, arredondadas em disposição de "colar" ou dispersas uma a uma).

EXPERIMENTO II

Percentual de contaminação obtido após tratamentos químicos nas plantas doadoras e no meio de cultura

Não houve influência das combinações de fungicida e antibiótico adicionadas ao meio de cultura sobre a taxa de contaminação fúngica e/ou bacteriana *in vitro*, indicando que os pré-tratamentos realizados com fungicidas nas plantas doadoras foram eficientes na controle dos fitopatógenos endógenos. Isto é reforçado pela própria análise visual do experimento, no qual a testemunha, sem nenhum tratamento químico no meio, não apresentou contaminação significativa. Estes resultados mostram que as combinações de produtos (benomyl e rifampicin) associados ao meio de cultura não foram responsáveis pela não-contaminação dos explantes, sendo sua utilização dispensada nas condições em que o experimento foi conduzido.

A taxa geral de contaminação observada (10%) pode ser considerada excelente se comparada com os elevados índices de contaminação observados no experimento 1. Desta, 8% do material sofreu a incidência de fungos, e apenas 2% de bactérias.

Os materiais micropropagados neste experimento passaram pelo pré-tratamento com fungicidas, ainda no viveiro, durante os meses de janeiro e fevereiro. Esse período caracterizou-se por ter sido seco, com pouca chuva, contribuindo, assim, com a falta de condições favoráveis ao desenvolvimento de patógenos. Além disto, estes foram coletados e inoculados no início de março (mês ainda quente e seco no ano de 1999).

O baixo percentual de contaminação deste experimento pode ser explicado principalmente pela eficiência da utilização dos pré-tratamentos nas mudas doadoras de explantes. PANICK (1995) cita a necessidade de aplicar fungicidas nos talos

das plantas-mãe, antes da coleta do material, para reduzir as contaminações *in vitro*. Este resultado também deve ser associado à época do ano em que foi conduzido o experimento, a qual se caracterizou por um período seco e quente. Segundo MROGINSKI et al. (1997b), a época de cultivo que apresenta os melhores resultados e a menor taxa de contaminação são os meses quentes (janeiro e fevereiro).

Desenvolvimento dos explantes no decorrer de 70 dias após a inoculação

Foi observado que os explantes, 5 dias após a inoculação, apresentavam-se com as gemas bastante intumescidas; aos 12 dias, 50% destes haviam formado brotos, 14% já apresentavam os primórdios foliares, 34% ainda estavam com as gemas intumescidas, e uma das plantas (2%) havia enegrecido e provocado a morte da gema. O número de brotações aos 70 dias variou de 1 a 2, e foi verificada grande alongação da parte aérea.

Algumas plantas, aos 14 dias, apresentavam o início da proliferação de células cambiais na região superior do caule seccionado. Seu desenvolvimento foi progressivo, sendo que, aos 54 dias, essas células foram observadas em 86% dos explantes. Isto ocorre devido à tendência que as plantas lenhosas têm de cicatrizar o local seccionado através da multiplicação das células do câmbio, regenerando seu caule.

Foi observado um escurecimento do meio de cultura ao redor do explante (segmento nodal), próximo da região seccionada. Este escurecimento (oxidação) pode ter sido ocasionado pela liberação de compostos fenólicos do explante no meio de cultura. A presença desta oxidação foi observada 26 dias após a inoculação em 58% dos explantes; aos 70 dias, apenas a testemunha (T1) não se mostrou oxidada. Observou-se que a oxidação foi mais pronunciada nos tratamentos nos quais a dosagem do antibiótico rifampicin era mais elevada. MROGINSKI et al. (1997a) atribuem o enegrecimento dos explantes no cultivo *in vitro* à produção de produtos fenólicos e taninos nos tecidos das plantas lenhosas. Nos experimentos realizados, o escurecimento do meio de cultura não chegou a causar danos ao desenvolvimento dos explantes.

O comportamento dos explantes contaminados variou no decorrer do tempo, sendo que três dos cinco contaminados continuaram seu desenvolvimento normalmente. A contaminação tanto pelos agentes fúngicos como bacterianos iniciou na região do explante que estava em contato com o meio de cultura; nos casos em que os explantes contaminados continuaram a se desenvolver normalmente, as estruturas do fungo (micélio) permaneceram junto ao meio, não vindo a cobrir o caule nem a parte aérea da planta. MROGINSKI et al. (1997a) descrevem que, em um experimento onde foi empregado benomil associado ao meio de cultura nos segmentos contaminados com fungos, os micélios começaram a se desenvolver na zona de corte da região distal do explante que ficava junto do meio com fungicida, indicando que a contaminação iniciava-se do interior do explante, reforçando a idéia de que os contaminantes da erva-mate *in vitro* são microorganismos endógenos.

Não ocorreu fitotoxidez no material micropropagado, mesmo tendo-se empregado diferentes combinações de benomil e rifampicin associados ao meio de cultura; o desenvolvimento e a regeneração dos explantes foram normais e muito satisfatórios, demonstrando que os produtos químicos não tiveram efeito negativo sobre as plantas.

Comparando-se os resultados obtidos neste experimento com o alcançado no anterior, nota-se uma grande evolução no processo de micropropagação devido às técnicas empregadas na condução deste. Desta forma, pode-se dizer que o pré-tratamento com fungicida pode auxiliar na otimização da técnica de cultivo *in vitro*, viabilizando o processo de micropropagação da erva-mate.

EXPERIMENTO III

Número de folhas nos diferentes tratamentos

Não houve um aumento do número de folhas diretamente proporcional ao aumento do BAP, e esse aumento ocorreu aleatoriamente nos diferentes tratamentos. O fato de não ter ocorrido aumento proporcional às doses crescentes de BAP na emissão do número de folhas pode ser explicado

devido à ação dos hormônios endógenos da planta e do balanço hormonal que ainda não está bem definido para esta espécie lenhosa, além da grande variabilidade genética dos explantes, já que cada um deles provinha de uma planta distinta. Desta forma, recomenda-se a realização de novos experimentos, visando a maiores esclarecimentos na dosagem de citocininas no meio de multiplicação de erva-mate.

Número de brotações nos diferentes tratamentos

O emprego de BAP foi utilizado no intuito de se conseguir a formação de maior número possível de brotos que pudessem, posteriormente, possibilitar o subcultivo do material. De acordo com CALDAS et al. (1998), o BAP induz à formação de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação. Uma variação no número de brotações emitidas foi observada nos diferentes tratamentos, o que pode ser atribuído à grande variabilidade genética do material micropropagado e também à ação da citocinina sobre todo o explante. Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), os fenômenos de proliferação de gemas axilares e de formação de gemas adventícias dificilmente podem ser controlados individualmente, pois devem-se à ação de citocinina do meio sobre todo o tecido do explante micropropagado. Além disso, as plantas lenhosas cultivadas *in vitro*, através de parte aérea e de gemas, apresentam maior capacidade de proliferação com o suceder de subculturas.

Comportamento dos explantes em meio de cultura $\frac{1}{4}$ MS + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e em meio $\frac{1}{4}$ MS + doses crescentes de BAP

Decorridos 33 dias após a inoculação inicial dos explantes em meio contendo ANA, a parte aérea de 93,3% dos explantes estava formada, tendo esta apenas uma brotação e não apresentando alongação. O início da segunda brotação foi verificado 3 dias após os explantes serem transferidos para os meios contendo BAP, em 33,3% do material. Ao final de 28 dias, 80% dos explantes haviam alongado a parte aérea, percentual este que perma-

neceu igual até a última avaliação feita aos 34 dias.

Foi observada também a presença de folhas arroxeadas em 66,7% dos explantes na última avaliação, demonstrando deficiência nutricional talvez pelo fato de o meio ser reduzido a ¼ do MS.

O aparecimento de células cambiais ocorreu ainda em meio contendo ANA, sendo que, aos 33 dias após a inoculação, foi possível observar a ocorrência das mesmas em 66,7% dos explantes. Estas células continuaram proliferando em meio com BAP, e, aos 17 dias, 13 plantas (86,7%) apresentaram a presença destas, não ocorrendo novos casos após este período.

A formação de calos na base inferior dos caules foi verificada após 17 dias de inoculação, em meio contendo ANA, em 7 dos 15 explantes micropropagados (46,7%). Os calos continuaram desenvolvendo-se após os explantes terem sido transferidos para o meio com BAP, não surgindo novos calos em outras plantas. Porém, algumas plantas que não tinham formado estes calos, após serem transferidas para meio com a citocinina, demonstraram engrossamento da parte inferior do caule seccionado, que, com o decorrer do tempo, provocou o aparecimento de fendas nos mesmos. Este engrossamento foi verificado a partir do 7º dia em meio com BAP, em outros explantes. Após este período, nenhuma outra planta apresentou as mesmas características.

De acordo com SKOOG e MILLER (1957) *apud* CALDAS et al. (1998), o crescimento de calo que ocorre em diferentes espécies pode ser: independente de auxina e citocinina, dependente de auxina, dependente de citocinina ou dependente de ambas. Estes são os reguladores de crescimento mais utilizados em cultura de tecidos, sendo que a disponibilidade e interação destes dois atuam na formação de raízes, parte aérea e calos em culturas de tecidos.

Neste experimento, a hipótese mais provável é de que a formação dos calos esteja associada à presença da auxina (ANA) no meio de cultura, já que os calos foram formados antes de os explantes

serem transferidos dos meios com BAP. Tampouco ocorreu oxidação nos meios de cultura.

EXPERIMENTO IV

Desenvolvimento *in vitro* dos explantes inoculados em Meio 1 e Meio 2

A partir das avaliações periódicas feitas após os subcultivos dos explantes nos dois diferentes meios, verificou-se que não houve contaminações no decorrer do desenvolvimento destes, porém houve perdas consideráveis de material por escurecimento progressivo e necrose dos segmentos. A taxa de perdas nos Meios 1 e 2 estão expressas na Tabela 2.

Foi observado que os explantes inoculados em meios de enraizamento regeneraram novamente a parte aérea, mais rapidamente, quando o tamanho do segmento repicado era maior; as perdas iniciais também foram constatadas nos explantes menores.

Comparando-se os dois tipos de meio empregados (com ágar e com vermiculita), verificou-se a maior eficiência do Meio 2, o qual permitiu um melhor e mais rápido desenvolvimento da parte aérea, bem como a sua elongação. Também neste meio, a perda de materiais devido à necrose de tecidos foi consideravelmente menor.

A grande taxa de morte de segmentos, verificada ao final dos 160 dias após a inoculação, mostra-nos a necessidade da retirada dos explantes do meio para aclimatização e passagem para novo substrato, tão logo se verifique a presença de raízes nos mesmos.

Emissão de raízes em Meio 1 (ágar + IBA) e Meio 2 (vermiculite + IBA)

A emissão de raízes verificada nos diferentes meios no decorrer do desenvolvimento dos explantes está expressa na Tabela 3.

A Figura 1 mostra todas as etapas do processo de enraizamento *in vitro*.

TABELA 2 – Percentagem de explantes mortos de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Meio 1 e 2, aos 30, 60, 90, 120 e 160 dias após inoculação

Meio de enraizamento	Percentagem de explantes mortos				
	30	60	90	120	160 (dias)
Meio 1	49,2	69,8	77,8	80,9	98,4
Meio 2	16,5	16,5	20,3	20,3	96,2

TABELA 3 – Percentagem de enraizamento de explantes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Meio 1 e 2, aos 30, 60, 90 e 120 dias após inoculação

Meio de enraizamento	Percentagem de enraizamento			
	30	60	90	120 (dias)
Meio 1	0	9,5	9,5	9,5
Meio 2	0	2,5	22,8	22,8

Verificou-se que o Meio 2 foi mais eficaz para a regeneração de raízes dos explantes. Contudo, este percentual inicial de emissão é ainda muito baixo e necessita ser melhorado. Uma possível explicação para esta baixa emissão de raízes é dada por ASSIS e TEIXEIRA (1998). Eles relatam que o contato prolongado de culturas durante a etapa de multiplicação com os hormônios BAP e ANA pode

provocar a inibição do enraizamento devido ao efeito residual destes nos explantes, exigindo, assim, até seis subcultivos em meio contendo carvão ativado para que este efeito seja eliminado. Portanto, sugere-se que a realização de vários subcultivos dos explantes em meio de enraizamento com vermiculita também poderia eliminar os resíduos de ANA ou BAP que inibem a emissão de raízes.

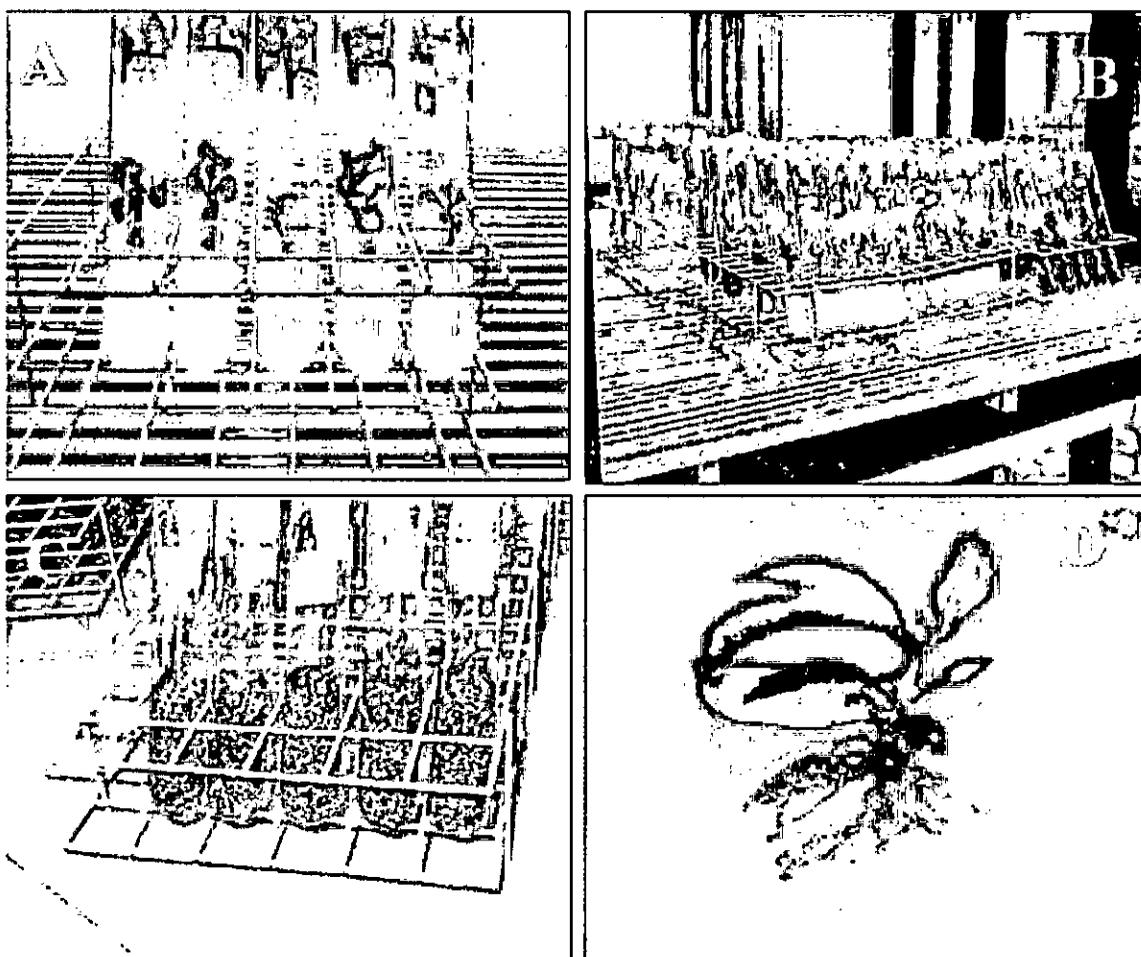


FIGURA 2 – Etapas do processo de enraizamento *in vitro* de erva-mate: A - Inoculação dos explantes em meio para indução de parte aérea; B - Desenvolvimento dos explantes; C - Enraizamento em meio com vermiculite (Meio 2); D - Enraizamento em meio com ágar (Meio 1)

CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

EXPERIMENTO I

- 1- Dentre os microorganismos contaminantes, os fungos apresentaram maior incidência e foram

mais limitantes ao desenvolvimento dos explantes que as bactérias;

- 2- Dos contaminantes fúngicos, os gêneros *Alternaria* sp e *Colletotrichum* sp apresentaram maior incidência.

EXPERIMENTO II

- 1- A utilização de pré-tratamentos nas plantas doadoras dos explantes reduziu, consideravelmente, a incidência de contaminação *in vitro*;
- 2- Não houve necessidade de utilização de fungicidas e antibióticos no meio de cultura, após a realização dos pré-tratamentos no viveiro.

EXPERIMENTO III

- 1- Não foi possível observar relação entre a utilização de doses de BAP e aumento do número de folhas e brotos.

EXPERIMENTO IV

- 1- O meio de enraizamento com vermiculita mostra-se mais eficiente para a emissão de raízes, alongação da parte aérea e menor perda por necrose.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao CNPq a bolsa de iniciação científica recebida no período de maio de 1999 a abril de 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, v.1. 1998. p. 275.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, v.1, 1998. p.102-106.
- CARVALHO, D. de.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. **Ciência Prática**, Lavras, v.14, n.1, p.97-106, jan/abr. 1990.
- FERREIRA, A.G. Estrutura e desenvolvimento da semente e embrião. In: I CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1., REUNIÃO TÉCNICA DO CONE-SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997. **Anais...** Curitiba: Embrapa, 1997. p.133-139. (Documento Embrapa, 33)
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, v.1, 1998. p.184-185.
- MROGINSKI, L.A.; BERNASCONI, N.K.; SANSBERRO, P.A.; REY, H.Y. (a) Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1., REUNIÃO TÉCNICA DO CONE-SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997. **Anais...** Curitiba: Embrapa, 1997. p.161-169. (Documento Embrapa, 33)
- MROGINSKI, L.A.; SANSBERRO, P.A.; REY, H.Y.; COLLAVINO, M. (b) 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. **Anais...** Curitiba: Embrapa, 1997. p.141-151. (Documento Embrapa, 33)
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.
- PANICK, B. Multiplicación Clonal de plantas elite de yerba mate mediante técnica de cultivo *in vitro*. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A. **Erva-Mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p.157-160.
- RESENDE, M.D.V. de.; STURION, J.A. MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)**. EMBRAPA-CNPQ, 1995. p.1-6. (Documento, n. 25).
- RESENDE, M.D.V. de; SIMEÃO, R.M.; STURION, J.A. Fundamentos de Genética de populações para conservação de Germoplasma da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1., REUNIÃO TÉCNICA DO CONE-SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997. **Anais...** Curitiba: Embrapa, 1997. p.173-207. (Documento Embrapa, 33)