

## Nota Científica

# Efeito do meio de cultura na calogênese *in vitro* a partir de folhas de erva-mate

Thamires Weigert Stachevski<sup>1</sup>, Luziane Franciscon<sup>2</sup>, Juliana Degenhardt Goldbach<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC/PR - Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, CEP 80215-901, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, km 111, CP 319, CEP 83411-000, Colombo, PR, Brasil

\*Autor correspondente:  
thamiresws@hotmail.com

### Termos para indexação:

Zeatina  
2,4-D  
Rizogênese  
Organogênese

### Index terms:

Zeatin  
2,4-D  
Rizogenesis  
Organogenesis

### Histórico do artigo:

Recebido em 04/10/2012  
Aprovado em 07/08/2013  
Publicado em 30/09/2013

doi: 10.4336/2013.pfb.33.75.441

**Resumo** - A organogênese é uma técnica pouco estudada na micropropagação de erva-mate. Este trabalho objetivou avaliar diferentes meios de cultura na calogênese *in vitro* e organogênese de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Foram coletadas folhas em plantas em casa-de-vegetação. Segmentos foliares foram colocados em meios de cultura ¼ MS, WPM ou JADS, contendo zeatina e 2,4-D. O meio MS foi mais eficiente na indução de calos. No meio WPM foi observada rizogênese. Nos meios testados não houve formação de brotações adventícias.

## Callus induction *in vitro* on leaves explants of *Ilex paraguariensis*

**Abstract** - Organogenesis is a technique rarely studied in the micro propagation of *Ilex paraguariensis*. This study evaluated different culture media on callus induction and *in vitro* organogenesis of this species. Leaves were collected from greenhouse grown plants. Leaves segments were placed on culture media ¼ MS, WPM or JADS, containing zeatin and 2,4-D. The MS medium was more efficient in callus inducing. Rooting was observed in the WPM medium. No buds were formed in any of the media evaluated.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é nativa na Argentina, Paraguai e Brasil, países em que ocorrem cerca de 80% de suas populações naturais (Heck & de Mejia, 2007). Suas folhas são usadas principalmente, para a obtenção de bebidas estimulantes, como o chimarrão. Recentemente, a espécie vem também despertando o interesse no mercado de produtos derivados, como cosméticos e farmacêuticos (Mosele, 2002).

Ainda existem lacunas no conhecimento para produção de mudas de erva-mate, uma vez que a reprodução sexual se depara com dormência das sementes, imaturidade do embrião, germinação

demorada, desuniforme e em baixo percentual (de 5% a 20 %). A propagação assexuada, por meio de estaquia ou enxertia, não tem protocolo estabelecido até o momento, apesar dos avanços obtidos (Quadros, 2009). Dentre os principais problemas, destaca-se os métodos de rejuvenescimento do material adulto (Wendling, 2004).

A micropropagação pode ser interessante para a propagação da erva-mate. No entanto, apesar dos esforços, ainda não foram desenvolvidos protocolos até o momento (Sansberro et al., 2000; Rosa et al., 2006). A contaminação do material durante o cultivo e baixas taxas de multiplicação *in vitro* são as principais limitações.

Outros métodos de cultura de tecidos, como a organogênese e a embriogênese somática, têm sido pouco explorados para a espécie (Rey et al., 2002). Vários fatores afetam a organogênese, como a idade e o tipo de explantes, as condições de cultivo e o meio de cultura.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes meios de cultura na calogênese e organogênese *in vitro* em segmentos foliares de plantas jovens de erva-mate.

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Transformação da Embrapa Florestas. Foram utilizadas plantas oriundas de Jaguariaíva, PR, e Barra Velha, SC, com aproximadamente 2 anos, mantidas em vasos em casas de vegetação, com irrigação por gotejamento. As mudas foram pulverizadas com 1 g L<sup>-1</sup> de fungicida tiofanato-metilico, por três dias consecutivos antes da coleta das folhas.

Para a coleta, o 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> pares de folhas mais jovens das plantas foram coletados e imediatamente imersos em solução de ácido ascórbico (a 0,5 g L<sup>-1</sup>) e ácido cítrico (a 0,5 g L<sup>-1</sup>). No laboratório, em capela de fluxo laminar, as mesmas foram imersas em solução de fungicida tiofanato-metilico a 1g L<sup>-1</sup> por 10 min, seguida de imersão em 0,05% de HgCl<sub>2</sub> por 5 min e 5% de NaClO por 20 min, sendo então lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. A seguir, as folhas foram cortadas no sentido longitudinal com o auxílio de bisturi e inoculadas com a face adaxial em placas de Petri com 20 mL de meio de cultura, contendo diferentes concentrações de macro e micronutrientes, conforme o tratamento (meios ¼ MS, WPM e JADS) (Correia et al., 1993). As formulações de macro e micronutrientes de meios de cultura mais utilizadas são o MS (Murashige & Skoog, 1962) e o WPM (Lloyd & Mccown, 1981). Todos os meios de cultura foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio inositol, 4,56 µM de zeatina, 4,52 µM de 2,4D e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que foi realizada a 120 °C a 1,2 atm durante 20 minutos.

Os explantes foram mantidos a 23 °C ± 2 °C no escuro em incubadora do tipo BOD e transferidos para meio fresco, de idêntica composição, a cada 30 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso. Cada tratamento foi constituído de 10 placas com 5 explantes.

Quarenta dias após o início dos experimentos foi avaliada a porcentagem e aspectos dos explantes que formaram calos. Os calos foram mantidos por mais seis meses em meios de idêntica composição, quando, então, foi avaliada a organogênese. A análise estatística da variável formação de calos foi realizada com uso dos modelos lineares generalizados pela análise de *deviance*, com distribuição de probabilidade binomial. A comparação entre os tratamentos foi realizada por contrastes ortogonais.

Houve formação de calos beges, compactos e com seções friáveis em todos os meios testados após 40 dias. O meio ¼ MS foi o mais efetivo na indução (82% de explantes formando calos). A comparação entre os tratamentos pela análise de *deviance* mostrou diferença significativa entre este meio e os meios JADS (64%) e WPM (57%), quando avaliados em conjunto (p<0,01). Não houve diferença entre os meios JADS e WPM (p<0,01).

O componente principal dos meios nutritivos é o nitrogênio, diretamente associado ao controle do crescimento, diferenciação e morfogênese. O meio WPM apresenta 50% da força iônica do meio MS, bem como elevado nível de S e baixos níveis de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e, embora seja bastante utilizado na promoção da calogênese e organogênese em espécies lenhosas (Glocke et al., 2006), no presente trabalho apresentou a menor formação de calos.

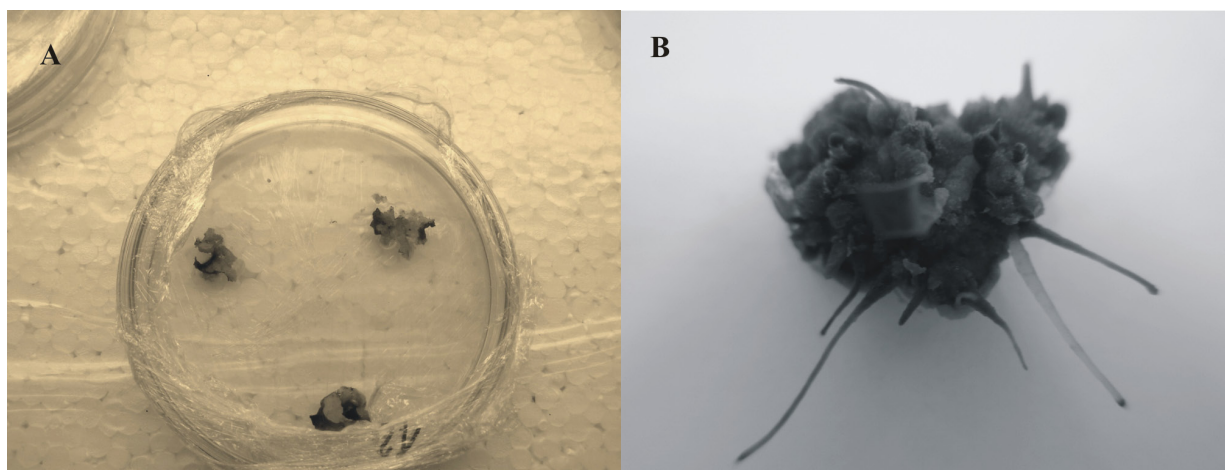
A importância dos meios de cultura se deve também às diferenças nas exigências nutricionais de cada espécie. Com relação a espécies lenhosas, para *Eucalyptus globulus*, os meios MS, 1/2MS, B5, WPM, DKW e JADS foram comparados na indução de calos embriogênicos e o meio MS também apresentou os melhores resultados (Pinto et al., 2008). Na indução de calos em segmentos nodais de *Phyla nodiflora* cultivados nos meios MS, B5, SH ou WPM, o meio MS também mostrou melhor resultado (Ahmed et al., 2011). Em estudo com *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), os meios MS, B5 e White foram superiores ao WPM na indução de calos (Werner et al., 2010).

No entanto, resposta diferenciada foi observada em *Barringtonia racemosa*, onde a formação de calos no meio com WPM iniciou antes, e as melhores taxas de crescimento foram observadas nos meios WPM e B5 quando comparados MS, WPM e B5 (Behbahani et al., 2011).

Segundo Radice (2004), o meio MS é o mais apropriado para espécies dicotiledôneas devido aos altos níveis de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , bem como à proporção entre as duas formas de nitrogênio. O meio JADS foi formulado com significativas reduções na concentração de sais minerais em comparação com o meio MS, e a proporção entre  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  nos dois meios é diferente. O meio WPM apresenta concentração menor de nitrogênio do que o meio MS. No entanto, no presente trabalho foi utilizada uma formulação de  $\frac{1}{4}$  MS, o que fez com que os níveis de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  fornecidos pelos dois meios fossem semelhantes. Apesar disso, no meio MS outra fonte de nitrogênio é o  $\text{KNO}_3$ , enquanto no meio WPM o nitrogênio é fornecido através de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , sugerindo que a combinação  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  foi mais eficiente em promover a indução de calos. Deve-se ressaltar, entretanto, que este não é o único componente com diferenças entre os meios avaliados.

Na segunda avaliação, realizada após seis meses, foi observada a formação de raízes adventícias em alguns explantes cultivados em meio WPM (Figura 1). Essa resposta também foi observada em mogno (Rocha & Quoirin, 2004). Nos meios MS e JADS não houve organogênese. Estes resultados sugerem que o balanço hormonal endógeno e a adição de reguladores vegetais em interação com nutrientes presentes no meio WPM foram mais eficientes na formação de raízes adventícias, embora a indução de calos tenha sido menor.

Foi observado visualmente um aumento na massa nos calos cultivados, sugerindo a necessidade de pesquisas futuras para explicar os processos fisiológicos envolvidos na formação e crescimento desses calos. A investigação da composição dos calos quanto à produção de metabólitos secundários também é importante, uma vez que a espécie produz grande quantidade de compostos fenólicos, saponinas e metilxantinas (de Souza et al., 2011).



**Figura 1.** A) Formação de calos em explantes foliares de erva mate após 40 dias de cultivo em meio  $\frac{1}{4}$  MS suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de mio inositol,  $4,56 \mu\text{M}$  de zeatina,  $4,52 \mu\text{M}$  de 2,4D e  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. B) Formação de raízes em explantes foliares após 6 meses de cultivo em meio WPM.

## Conclusões

O meio  $\frac{1}{4}$  MS é mais eficiente na indução de calos em segmentos foliares de erva-mate.

Em meio WPM, na presença de 2,4-D e zeatina, há formação de raízes adventícias.

Nas concentrações de reguladores vegetais avaliadas não houve a indução de brotações adventícias.

## Referências

- AHMED, A. B. A.; PALLELAR, P.; RAO, A. S.; RAO, M. V.; TAHA, R. M. Optimized conditions for callus induction, plant regeneration and alkaloids accumulation in stem and shoot tip explants of *Phyllanthus nodiflorus*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Madrid, v. 9, n. 4, p. 1262-1270, 2011.
- BEHBAHANI, M.; MEHRNAZ SHANEHSAZZADEH, M.; HESSAMI, M. J. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 69-76, 2011.

- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 f. Dissertação – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- DE SOUZA, L. M.; DARTORA, N. N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. Comprehensive analysis of mate (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A.**, Amsterdam, v. 1218, n. 41, p. 7307-7315, 2011.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. **Plant propagation by tissue culture**: v. 1. the background. Dordrecht: Springer, 2007. 508 p.
- GLOCKE, P. DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* Cv. ‘Urrbae Germ’. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 42, p. 139-143, 2006.
- HECK, C. I.; DEMEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1981.
- MOSELE, S. H. **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y. S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Martinus Nijhof, v. 95, p. 79-88, 2008.
- QUADROS, K. M. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- RADICE, S. Morfogênese in vitro. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biotecnologia y Mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004 10 p.
- REY, H. Y.; SANSBERRO, P. A.; COLLAVINO, M. M.; DAVINA, J. R.; GONZALEZ, A. M.; MROGINSKI, L. A. Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 123, p. 49-56, 2002.
- ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados in vitro. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 14, n. 1, p. 91-101, 2004.
- ROSA, F. C. da; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; QUADROS, K. M. de. **Micropropagação de erva-mate**: efeito de diferentes épocas do ano no estabelecimento in vitro de segmentos nodais. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 163).
- SANSBERRO, P.; REY, H.; BERNARDIS, A.; LUNA, C.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by in vitro culture of nodal segments. **Biocell**, Mendoza, v. 24, n. 1, p. 53-63, 2000.
- WENDLING, I. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire)**: estado da arte e tendências futuras. Colombo: Embrapa Florestas, 46 p. 2004. (Embrapa Florestas. Documentos, 91).
- WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A. CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.