

ISSN 1980-041X

Outubro, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 38

Introdução ao Cultivo *in vitro* de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Leonardo Ferreira Dutra

Fabício Augusto Hansel

Ivar Wendling

Embrapa Florestas

Colombo, PR

2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba,

83411 000 - Colombo, PR - Brasil

Caixa Postal: 319

Fone/Fax: (41) 3675 5600

Home page: www.cnpf.embrapa.br

E-mail: sac@cnpf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos

Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida

Membros: Álvaro Figueredo dos Santos, Dalva Luiz de Queiroz

Santana, Edilson Batista de Oliveira, Elenice Fritzsos, Jorge

Ribaski, José Alfredo Sturion, Maria Augusta Doetzer Rosot,

Sérgio Ahrens

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos

Revisão de texto: Mauro Marcelo Berté

Normalização bibliográfica: Elizabeth Denise Câmara Trevisan

Editoração eletrônica: Mauro Marcelo Berté

Foto da capa: Quenia Michele de Quadros

1ª edição

1ª impressão (2008): sob demanda

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Florestas

Dutra, Leonardo Ferreira.

Introdução ao cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) [recurso eletrônico] / Leonardo Ferreira Dutra, Fabrício Augusto Hansel, Ivar Wendling - Dados eletrônicos. - Colombo : Embrapa Florestas, 2008.

1 CD-ROM. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Florestas, ISSN 1980-041X; 38)

ISSN 1676-9449 (impresso)

1. Erva-mate – Cultura *in vitro*. 2. *Ilex paraguariensis*. I. Hansel, Fabrício Augusto. II. Wendling, Ivar. III. Título. IV. Série.

CDD 633.77(21. ed.)

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	16
Conclusões	30
Referências	31

Introdução ao Cultivo *in vitro* de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Leonardo Ferreira Dutra ¹

Fabício Augusto Hansel ²

Ivar Wendling ³

Resumo

A maioria dos trabalhos com cultivo *in vitro* de erva-mate tem sido limitada ao cultivo de embriões e segmentos nodais oriundos de mudas produzidas de materiais juvenis. Objetivou-se otimizar o processo de desinfestação no estabelecimento *in vitro* de erva-mate, testando agentes desinfestantes para o controle da ocorrência de contaminações. Segmentos nodais oriundos de minicepas de erva-mate, cultivadas no sistema semi-hidropônico em canaletão, foram desinfestados com hipoclorito de sódio (NaOCl), cloreto de mercúrio (HgCl₂), Saniagri™ ou Preservative Plant Mixture (PPM™). Épocas de coleta dos explantes e termoterapia a frio também foram testados. Após desinfestação, segmentos nodais foram inoculados em meio ¼ MS e mantidos em sala de crescimento durante 30 dias. A maioria dos tratamentos utilizados para a desinfestação dos explantes não foi efetiva, verificando-se altas taxas de oxidação e contaminações fúngica e bacteriana. Os agentes desinfestantes PPM™ e SaniAgri™, adicionados ao meio de cultura, proporcionaram taxas de sobrevivência de 93 % e 83 %, respectivamente, entretanto, a manutenção dos explantes *in vitro* por tempo superior a 30 dias não foi possível. A sobrevivência dos explantes inoculados em agosto foi significativamente superior às demais e a termoterapia a frio parece ser eficiente contra a contaminação por bactéria.

Termos para indexação: *Ilex paraguariensis*, micropropagação, contaminações, agentes antimicrobianos.

¹Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. leo@cnpf.embrapa.br

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

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

Introduction of *in vitro* Culture of (*Ilex paraguariensis*)

Leonardo Ferreira Dutra

Fabrcio Augusto Hansel

Ivar Wendling

Abstract

Ilex paraguariensis (maté tea) *in vitro* culture studies are associated mainly with embryo and nodal segment cultures of juvenile shoots. The aim of present work was to study asepsis in the establishment of mature nodal segment of maté tea. Mature nodal segments were extracted from ministumps maintained in semi-hydroponic system. Different chemical agents such as: sodium hydrochloride (NaOCl), mercuric chloride (HgCl₂), and commercial products Saniagri™ or Preservative Plant Mixture (PPM™), and different season of *in vitro* introduction were studied. After desinfestation the nodal segments were introduced in ¼ MS culture media that were maintained in growth room during 30 days. Most of chemical agent treatments were not efficient, they produce high taxes of contaminations and oxidations. On the contrary, treatments with commercial products Saniagri™ and PPM™ added in the culture medium provided high taxes of survivals 93 % and 83 % respectively, but the maintenance of explant over 30 days in these medium culture were not possible. Season had a positive effect in the survival, the best result was obtained in august introduction. Cold thermoterapy seemed to be efficient against bacteria contamination.

Index terms: *Ilex paraguariensis*, micropropagation, contaminations, antimicrobial agents.

Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) caracteriza-se por ser uma espécie arbórea amplamente difundida na Região Sul do Brasil, no noroeste da Argentina e na parte oriental do Paraguai, situando-se entre a latitude de 22° a 30° S e entre a longitude de 48° a 56° W (OLIVEIRA; ROTTA, 1985). A espécie possui grande importância econômica, ambiental, social e cultural para estes países.

A erva-mate é um dos componentes dos sistemas agroflorestais tradicionais mais antigos da região Sul do Brasil, caracterizados pela produção diversificada de produtos e serviços agrícolas que sustentam de forma significativa a estabilidade econômica e social do produtor (MONTROYA VILCAHUAMAN, 1999). Considerada como a espécie símbolo do Estado do Rio Grande do Sul, a erva-mate apresenta grande importância na economia e na cultura dos estados sulinos (BACKES; IRGANG, 2002).

Por um longo período, foi o primeiro produto das exportações brasileiras e a sua produção ainda se constitui numa das principais fontes de renda e de emprego, especialmente para os pequenos e médios produtores da região de ocorrência da espécie, contribuindo para a manutenção do pequeno produtor no meio rural. No Brasil, é explorada economicamente, em cerca de 486 municípios dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, englobando cerca de 180 mil propriedades rurais, a maioria familiares, congregando em torno de 725 empresas processadoras e mais de 710 mil trabalhadores (DA CROCE; FLOSS, 1999).

A sua exploração ocorre tanto em sua forma nativa, associada às matas de araucária, como em plantios comerciais a céu aberto ou em sub-bosques da floresta. Pode ser utilizada para a produção de bebidas (chimarrão, tereré, refrigerantes e chás), apresentando grande potencial para muitas aplicações industriais como: corantes, conservantes de alimentos, produtos de higiene e cosméticos (MACCARI JÚNIOR; MAZUKOWSKI, 2000). Dentre as propriedades medicinais, além de ser estimulante, apresenta ação diurética, estomáquica e sudorífica, atuando em casos de cólicas

renais, depressões nervosas, neurastenia e fadigas cerebrais em geral (BRAGAGNOLO et al., 1980).

A região sul concentra 99,8 % de toda a produção de erva-mate do Brasil (HORBACH, 2008). A produção de mudas de erva-mate por sementes apresenta uma série de limitações e dificuldades, podendo-se destacar: baixa qualidade genética e fisiológica das sementes (STURION, 1988); dormência das sementes; longo tempo destinado à estratificação (de quatro a seis meses); germinação demorada, desuniforme (de 100 a 360 dias) (PRAT KRIKUN, 1993; MENNA, 1995) e em baixo percentual, inferior a 20 % (MENNA, 1995; STURION, 1988); longo período de produção das mudas (HIGA, 1982; STURION, 1988; GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 1999); necessidade de repicagem das mudas, e dificuldade de obtenção de sementes com alto padrão genético. Todos estes fatores contribuem para elevar o custo de produção das mudas, além de limitar a seqüência dos programas de melhoramento genético da espécie. As sementes da erva-mate apresentam dormência porque o embrião encontra-se morfológicamente imaturo, e requer determinado período de estratificação para que ocorra o seu desenvolvimento e germinação (FOWLER; STURION, 2000), além de apresentar endocarpo lenhoso (MEDEIROS, 1998), ou seja, dormência tegumentar (FOWLER; STURION, 2000).

Os plantios provenientes de sementes apresentam grande heterogeneidade, com reflexos negativos na qualidade do produto final. A utilização da propagação vegetativa para a produção comercial de mudas de erva-mate origina indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz e pode resolver, pelo menos em parte, estas limitações. A propagação vegetativa de espécies florestais é uma poderosa ferramenta na formação de plantios clonais de alta produtividade e uniformidade (ELDRIDGE et al., 1994), na multiplicação de indivíduos resistentes a pragas e doenças (ASSIS, 1986; CHAPERON, 1987) e adaptados a sítios específicos (ELDRIDGE et al., 1994), na transferência, de geração para geração, dos componentes genéticos aditivos e não-aditivos como a melhor adaptação ao ambiente, melhor qualidade e quantidade de folhas, resistência a pragas e doenças, melhor aproveitamento de recursos hídricos e nutricionais do solo, entre

outros; resultando em maiores ganhos dentro de uma mesma geração de seleção (ASSIS, 1986; ELDRIDGE et al., 1994). Além disso, a propagação vegetativa é uma alternativa para a produção de mudas de espécies com sementes de baixo índice germinativo ou de difícil armazenamento, possibilitando a produção de mudas durante todo o ano, por meio de plantas matrizes mantidas em viveiro.

Dentre os métodos de propagação vegetativa com maiores potenciais e/ou possibilidades de aplicação para a cultura da erva-mate, pode-se citar a estaquia, a enxertia, a micropropagação e a miniestaquia. Cada técnica tem limitações e vantagens, devendo ser criteriosamente escolhida aquela que se adapta para cada objetivo proposto (multiplicação massal, rejuvenescimento, formação de pomares de sementes e bancos de conservação genética, entre outros) e em função das condições técnico-financeiras disponíveis.

Os estudos visando desenvolver as técnicas de propagação vegetativa são escassos e os protocolos desenvolvidos até o momento se referem principalmente a material juvenil não selecionado, além de não serem adaptados e testados em escala comercial. Avanços neste sentido foram obtidos por Wendling et al. (2007), que desenvolveram a técnica de miniestaquia para erva-mate.

A micropropagação é uma técnica que oferece possibilidades para propagação de plantas. Entretanto, o uso da micropropagação na produção comercial de mudas de espécies florestais ainda não foi justificada técnica e economicamente. O sucesso na propagação de material adulto de várias espécies lenhosas indica que a micropropagação pode ser usada para o rejuvenescimento de material adulto. Atualmente, com o advento da microestaquia, esta técnica tem merecido especial atenção, visando à formação de jardins microclonais.

Até o momento, a maioria dos trabalhos referentes ao cultivo *in vitro* de erva-mate tem se limitado ao cultivo de embriões (HU et al., 1978; FERREIRA et al., 1991; FERREIRA; SILVEIRA, 1992) e de segmentos nodais

oriundos de mudas produzidas de materiais juvenis (KRYVENKI, 1997; MROGINSKI et al., 1997; SANSBERRO et al., 1997a; SANSBERRO et al., 1997b; SANSBERRO et al., 1999; KRAEMER et al., 2002; HORBACH, 2008).

Rey e Mroginski (1988) evidenciaram que explantes obtidos de mudas de árvores adultas não são adequados para culturas *in vitro*, uma vez que apresentam altas taxas de contaminação e não multiplicam (recalcitrância *in vitro*). Mroginski et al. (1997) concluíram que é possível micropropagar plantas de erva-mate com menos de dois anos de idade. Porém, em termos de propágulos obtidos de árvores adultas (acima de 10 anos de idade), somente podem ser estabelecidos *in vitro* caso os explantes provenham de plantas obtidas por estaquia, as quais são mantidas em condições de estufa. Mesmo assim, o percentual de enraizamento dos propágulos obtidos é baixo. No caso do estabelecimento de explantes de plantas matrizes adultas diretamente *in vitro*, as únicas respostas que se obtêm são o seu escurecimento e contaminação com fungos e bactérias, não sendo, portanto, possível induzir sua brotação.

Em função dos resultados obtidos com a micropropagação de erva-mate, até o presente momento, faz-se necessário o aperfeiçoamento desta técnica para a clonagem massal de indivíduos adultos geneticamente superiores. Estudos visando definir o potencial da micropropagação como método de rejuvenescimento e sua influência em função de vários subcultivos *in vitro* necessitam ser desenvolvidos para tornar possível ou aumentar a capacidade de propagação *ex vitro* de materiais adultos selecionados de erva-mate.

Objetivando estabelecer protocolos de micropropagação de erva-mate, uma série de experimentos foi desenvolvida visando ao estabelecimento *in vitro* como a primeira etapa do processo.

Material e Métodos

As mudas fornecedoras de explantes constituíram-se de minicepas cultivadas no sistema semi-hidropônico em canaletão, com areia média. As minicepas receberam diariamente nutrientes por gotejamento a uma vazão de 5 L.m⁻²; sendo a solução nutritiva composta por monoamônio fosfato (0,04 g.L⁻¹), sulfato de magnésio (0,40 g.L⁻¹), nitrato de potássio (0,44 g.L⁻¹), sulfato de amônio (0,31 g.L⁻¹), cloreto de cálcio (0,79 g.L⁻¹), ácido bórico (2,88 mg.L⁻¹), sulfato de manganês (3,7 mg.L⁻¹), molibdato de sódio (0,18 mg.L⁻¹), sulfato de zinco (0,74 mg.L⁻¹) e hidroferro em pó (81,80 mg.L⁻¹).

Tratamentos fitossanitários foram realizados com fungicidas à base de Tiofanato Metílico (70 % - Pó molhável) e Oxicleto de Cobre (58,8 %), 24 horas antes da coleta. Condições fitossanitárias adequadas das brotações coletadas em estufa, proporcionadas pela aplicação de fungicidas, foram importantes para uma menor taxa de contaminação fúngica. As brotações de erva-mate foram coletadas com auxílio de tesouras de poda e imersas em ácido ascórbico 1 % para evitar o processo oxidativo e perda da turgescência celular dos tecidos vegetativos, na seqüência, foram transportadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e submetidas aos tratamentos.

Nos experimentos foram avaliados quatro tipos de agentes químicos com diferentes concentrações, combinações, tempo de exposição e adição ao meio de cultura. Os agentes químicos utilizados foram o hipoclorito de sódio (NaClO), o cloreto de mercúrio (HgCl) e dois produtos comerciais, SaniAgriTM e PPMTM. Após a assepsia, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada e autoclavada e então introduzidos ao meio de cultura. Experimentos relativos à época de introdução dos explantes *in vitro* e termoterapia a frio também foram estudados.

Após os tratamentos de desinfestação, os segmentos nodais de tamanho entre 1 cm a 2 cm foram inoculados com 10 mL de meio de cultura ¼ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 14 g de sacarose e 7 g de ágar, com pH ajustado para 5,8. Os meios de cultura foram distribuídos em

frascos com capacidade para 30 mL e esterilizados em autoclave (120 °C, 1 h), salvo aqueles em que houve adição do desinfestante SaniAgri™. Quando não houve necessidade da etapa de esterilização em autoclave; o SaniAgri™ foi adicionado antes da aferição do volume e ajuste do pH. Decorridos 30 dias, avaliaram-se a sobrevivência, a contaminação por fungos e bactérias e a oxidação. A partir do experimento 4, as variáveis, em alguns casos, foram avaliadas concomitantemente e, desta forma, os valores totais puderam ultrapassar 100 %, visto que a presença de mais de uma resposta (contaminação fúngica, bacteriana e oxidação) pode ser vista no mesmo explante. As condições de incubação dos explantes, em todos os experimentos, foram 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $85 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro explantes, cada uma por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ou Scott- Knott a 5 % de probabilidade.

Experimento 1 - Desinfestação de explantes sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio

Segmentos nodais com comprimento entre 1 cm a 2 cm foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1 - Imersão em álcool 70 % por 1 min + lavagem em água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2,5 %) por 10 min + 3 lavagens com água autoclavada; T2 - Imersão em álcool 70 % por 1 min + lavagem em uma água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (5 %) por 10 min + 3 lavagens com água autoclavada; T3 - Imersão em álcool 70 % por 1 min + lavagem em água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (7,5 %) por 10 min + 3 lavagens com água autoclavada; T4 - Imersão em álcool 70 % por 1 min + lavagem em água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (10 %) por 10 min + 3 lavagens com água autoclavada.

Experimento 2 - Desinfestação de explantes em diferentes tempos em solução de hipoclorito de sódio

Segmentos nodais com comprimento entre 1 cm e 2 cm foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1 - Imersão em álcool 70 % por 1 min + 3 lavagens com água autoclavada; T2 - Imersão em álcool 70 % por 1 min + lavagem em água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (5 %) por 10 min + 3 lavagens com água autoclavada; T3 - Imersão em álcool 70 % por 1 min + lavagem em água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (5 %) por 20 min + 3 lavagens com água autoclavada; T4 - Imersão em álcool 70% por 1 min + lavagem em água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (5 %) por 10 min + 3 lavagens com água autoclavada + hipoclorito de sódio (5 %) por 10 min + 3 lavagens com água autoclavada e T5 - Imersão em álcool 70% por 1 min + lavagem em água autoclavada + desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (5 %) por 20 min + 3 lavagens com água autoclavada + desinfestação em hipoclorito de sódio (5 %) por 20 min + 3 lavagens com água autoclavada.

Experimento 3 - Assepsia com cloreto de mercúrio

Os explantes foram submetidos a concentrações de HgCl_2 e diferentes tempos de imersão: T1 - 0,01 % HgCl_2 por 10 min; T2 - 0,01 % HgCl_2 por 20 min; T3 - 0,05 % HgCl_2 por 10 min; T4 - 0,05 % HgCl_2 por 20 min; T5 - 0,1 % HgCl_2 por 10 min; T6 - 0,1 % HgCl_2 por 20 min; T7 - 0,25 % HgCl_2 por 10 min; T8 - 0,25 % HgCl_2 por 20 min e T9 - 0,5 % HgCl_2 por 10 min.

Experimento 4 - Assepsia com solução desinfestante SaniAgri™

Foram testados diferentes concentrações do desinfestante SaniAgri™ na solução desinfestante para assepsia de segmentos nodais e posterior introdução *in vitro*. Os tratamentos consistiram das seguintes concentrações: T1 - 5 mL.L⁻¹, T2 - 10 mL.L⁻¹, T3 - 15 mL.L⁻¹ e T4 - 20 mL.L⁻¹.

Os explantes ficaram por 16 horas imersos em frascos com solução desinfestante no escuro, foram transportados para a câmara de fluxo laminar e, após enxaguados, foram introduzidos em frascos contendo 10 mL de meio de cultura.

Experimento 5 - Desinfestante SaniAgri™ na assepsia dos explantes e no meio de cultura

Foram testadas concentrações de SaniAgri™ na solução desinfestante dos explantes e no meio de cultura, segundo os seguintes tratamentos: T1 - sem assepsia dos explantes e meio de cultura sem desinfestante; T2 - sem assepsia dos explantes e meio de cultura com 5 mL.L⁻¹ de SaniAgri™; T3 - sem assepsia dos explantes e meio de cultura com 10 mL.L⁻¹ de SaniAgri™; T4 - assepsia dos explantes com 5 mL de SaniAgri™ e meio de cultura sem desinfestante; T5 - assepsia dos explantes com 5 mL de SaniAgri™ e meio de cultura com 5 mL.L⁻¹ de SaniAgri™; T6 - assepsia dos explantes com 5 mL de SaniAgri™ e meio de cultura com 10 mL.L⁻¹ de SaniAgri™; T7 - assepsia dos explantes com 10 mL de SaniAgri™ e meio de cultura sem desinfestante; T8 - assepsia dos explantes com 10 mL de SaniAgri™ e meio de cultura com 5 mL.L⁻¹ de SaniAgri™; T9 - assepsia dos explantes com 10 mL de SaniAgri™ e meio de cultura com 10 mL.L⁻¹ de SaniAgri™.

Os explantes ficaram imersos por 18 horas, no escuro, em solução desinfestante constituída de sais de ¼ de MS, juntamente com o desinfestante comercial SaniAgri™, com o pH ajustado para 5,8, e então levados para a câmara de fluxo laminar, enxaguados três vezes e introduzidos em frascos contendo 10 mL de meio de cultura.

Experimento 6 - Assepsia convencional dos explantes com adição do desinfestante SaniAgri™ no meio de cultura WPM, modificado com adição de PVP e diferentes concentrações de sacarose

Foi realizada a assepsia convencional nos explantes com etanol por 1 min e hipoclorito de sódio por 20 min. Aos meios de cultura foram adicionados

1 mL.L⁻¹ de SaniAgri™ e o pH foi ajustado para 5,8. Os meios foram solidificados com 7 g de ágar. Posteriormente, foram testadas concentrações de sais do meio de cultura WPM, sacarose, e adição ou não de Polivinilpirrolidona (PVP-10), de acordo com os seguintes tratamentos: T1 - ½ WPM, 0,025 % de PVP e 14 g.L⁻¹ de sacarose; T2 - ½ WPM, sem PVP e 14 g.L⁻¹ de sacarose; T3 - WPM, 0,025% de PVP e 14 g.L⁻¹ de sacarose; T4 - WPM, sem PVP e 14 g.L⁻¹ de sacarose; T5 - ½ WPM, 0,025 % de PVP e 20 g.L⁻¹ de sacarose; T6 - ½ WPM, sem PVP e 20 g.L⁻¹ de sacarose; T7 - WPM, 0,025 % de PVP e 20 g.L⁻¹ de sacarose; T8 - WPM, sem PVP e 20 g.L⁻¹ de sacarose.

Experimento 7 - Assepsia com anti contaminante PPM™

Foram testados dois métodos de assepsia com três concentrações de anticontaminante PPM™ na assepsia dos explantes, e com ou sem a adição do anticontaminante ao meio de cultura, segundo os seguintes tratamentos: T1 - sem assepsia dos explantes com PPM™ e meio de cultura sem PPM™; T2 - sem assepsia dos explantes com PPM™ e meio de cultura com 1 mL L⁻¹ PPM™; T3 - sem assepsia dos explantes com PPM™ e meio de cultura com 2 mL.L⁻¹ PPM™; T4 - assepsia dos explantes com 2,5 % de PPM™ e meio de cultura sem PPM™; T5 - assepsia dos explantes com 2,5 % de PPM™ e meio de cultura com 1 mL.L⁻¹ PPM™; T6 - assepsia dos explantes com 2,5 % de PPM™ e meio de cultura com 2 mL L⁻¹ PPM™; T7 - assepsia dos explantes com 5 % de PPM™ e meio de cultura sem PPM™; T8 - assepsia dos explantes com 5 % de PPMTM e meio de cultura com 1 mL.L⁻¹ PPM™; T9 - assepsia dos explantes com 5 % de PPMTM e meio de cultura com 2 mL.L⁻¹ PPM™; T10 - assepsia com etanol (álcool 70 %) por 1 min. e hipoclorito de sódio 5 % por 20 min e meio de cultura sem PPM™; T11 - assepsia com etanol (álcool 70 %) por 1 min e hipoclorito de sódio 5 % por 20 min. e meio de cultura com 1 mL.L⁻¹ PPM™; T12 - assepsia com etanol (álcool 70 %) por 1 min e hipoclorito de sódio 5 % por 20 min. e meio de cultura com 2 mL.L⁻¹ PPM™.

Os explantes dos tratamentos T4 até T9 ficaram imersos em solução de PPM™ com sais de ¼ de MS e 1 % de ácido ascórbico para evitar a

oxidação dos explantes, o pH foi ajustado para 5,8 por 16 horas no escuro, e então inoculados em frascos contendo 10 mL de meio de cultura.

Experimento 8 - Assepsia à baixa temperatura ou termoterapia

Inicialmente, os segmentos nodais foram submetidos ao processo de desinfestação com etanol (álcool 70 %) por 1 min e hipoclorito de sódio 5 % por 20 min., seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar. Após a desinfestação, os explantes foram introduzidos em frascos contendo 10 mL de meio de cultura e transferidos para BOD (Câmara de germinação com alternância de temperatura MA 402). Foram testados diferentes tempos de permanência dos segmentos nodais de material adulto em BOD (Câmara com temperatura de 4 °C, e um fotoperíodo de 16 horas de luz, nos seguintes tratamentos: T0 - 0 dias (testemunha); T1 - 3 dias (72 horas); T2 - 8 dias (192 horas); T3 - 16 dias (384 horas) e T4 - 20 dias (480 horas).

Experimento 9 - Efeito da coleta em diferentes meses do ano no comportamento *in vitro* de segmentos nodais

Segmentos nodais coletados em agosto, setembro e dezembro de 2005 e março, abril e maio de 2006, com comprimento entre 1 cm e 2 cm, foram desinfestados com álcool 70 % por 1 min.), hipoclorito de sódio a 5 % por 20 min., e lavados três vezes com água destilada e autoclavada.

Resultados e Discussão

Experimento 1 - Desinfestação de explantes sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio

As taxas de contaminações por fungos e bactérias não apresentaram variações significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de contaminações por fungos e bactérias, oxidação e sobrevivência em relação aos tratamentos de desinfestação realizados nos segmentos nodais de erva-mate.

Tratamento	Fungos	Bactérias	Oxidação	Sobrevivência
			-----%-----	
T1	36a	48a	0a	16a
T2	20a	64a	12a	4a
T3	32a	52a	8a	8a
T4	52a	48a	0a	0a

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Experimento 2 - Desinfestação de explantes sob diferentes tempos em solução de hipoclorito de sódio

Considerando que a concentração de hipoclorito de sódio não apresentou significância entre os testes, novos tratamentos foram realizados na concentração de 5 %, mas com tempos de imersão diferentes. A desinfestação dupla dos explantes, durante 40 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 5 % (T5), foi a mais efetiva para controle da contaminação fúngica, resultando numa taxa de 5 % (Tabela 2). Em todos os tratamentos, a contaminação por bactérias foi maior em relação à contaminação fúngica. Isto, provavelmente, ocorreu pela ausência de aplicação de bactericida nas mudas.

A imersão dos segmentos nodais durante a desinfestação dupla de 40 minutos em NaOCl (T5), embora tenha proporcionado baixa contaminação por fungos (5 %), promoveu a maior taxa de oxidação (80 %). Embora sem diferença significativa dos tratamentos 2, 3 e 4, a menor porcentagem de oxidação (25 %) foi obtida no tratamento onde não houve exposição ao agente desinfestante (T1).

O maior percentual de sobrevivência (15 %) foi verificado no T 3 (álcool 70 %, 1 min e NaClO 5 %, 20 min.; Tabela 2), embora, nesse tratamento, tenha ocorrido uma maior taxa de contaminação bacteriana (45 %). A oxidação e a contaminação por fungos no T3 foram de 30 % e 10 %, respectivamente. Essa assepsia apresentou-se como a de melhor resultado com relação à sobrevivência, sendo então nomeada de assepsia convencional, e usada como parâmetro em alguns experimentos a seguir.

Tabela 2. Médias de contaminações por fungos e bactérias, oxidação e sobrevivência em relação aos tratamentos de desinfestação realizados nos segmentos nodais de erva-mate.

Tratamento	Fungos	Bactérias	Oxidação	Sobrevivência
			-----%-----	
T1	35a	35a	25 b	5ab
T2	15ab	20a	65ab	0 b
T3	10ab	45a	30ab	15a
T4	15ab	30a	55ab	0 b
T5	5 b	15a	80a	0 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Experimento 3 - Assepsia com cloreto de mercúrio ($HgCl_2$)

Não houve diferença entre os tratamentos de desinfestação para percentagem de explantes sadios (Tabela 3). As maiores percentagens de explantes com contaminação com fungos foram verificadas nos tratamentos T1 e T2, e com bactérias nos tratamentos T1, T2, T3 e T4. O aumento da concentração de $HgCl_2$ na solução tendeu a aumentar a oxidação dos explantes. Nenhum tratamento com $HgCl_2$ apresentou resultado superior, com relação a indivíduos sadios, que a assepsia convencional, sugerindo o NaClO como melhor agente desinfestante.

Portanto, o tratamento dos explantes com cloreto de mercúrio não foi eficaz para o controle da contaminação por fungos e bactérias no cultivo de erva-mate *in vitro*. Além deste agente desinfestante não ter sido efetivo, deve-se levar em consideração que seu resíduo é tóxico, o que requer manipulação e armazenamento especiais.

Tabela 3. Percentagem de ocorrência de fungos, bactérias, explantes oxidados e sadios após 30 dias de inoculação em meio de cultura ¼ MS.

Treatamento	Fungos	Bactérias	Oxidação	Sadios
-----%-----				
T1	40a*	70a	35 c	7a
T2	50a	75a	65 b	1a
T3	1 b	60a	99a	0a
T4	10 b	83a	55 b	2a
T5	0 b	0 b	100a	0a
T6	4 b	25 b	100a	0a
T7	0 b	4 b	100a	0a
T8	0 b	0 b	100a	0a
T9	0 b	4 b	96a	1a
Média	11,6	35,2	83,3	1,2

*Dados transformados por arco seno da raiz de $x/100$, segundo o teste de normalidade. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

Experimento 4 - Assepsia com solução desinfestante SaniAgri™

A utilização do desinfestante SaniAgri™ é interessante na desinfestação de explantes visando ao estabelecimento *in vitro*, pois não deixa resíduos nocivos devido à sua decomposição em água produzir ácido acético.

A imersão dos explantes em solução com o germicida comercial SaniAgri™ não foi eficaz. Nos tratamentos T1 e T2 (SaniAgri™ 5 e 10 ml.L⁻¹, 16 h), foi observada alta taxa de contaminação por fungos e oxidação em todos os explantes, não ocorrendo contaminação bacteriana (Tabela 4). Os

tratamentos T3 e T4 (SaniAgri™ 15 e 20 mL. L⁻¹, 16 h) produziram baixo índice de explantes saudáveis, não superando a assepsia convencional (álcool 70 %, 1 min e NaClO 5 %, 20 min), embora tenha ocorrido ação fúngica, a alta taxa de oxidação é um indicio do caráter fitotóxico do produto. Além do mais, nesses tratamentos, foram observados significativos índices na taxa de contaminação por bactérias.

Tabela 4. Percentagem de ocorrência de fungos, bactérias, explantes oxidados e saudáveis após 30 dias de inoculação em meio de cultura.

Tratamento	Fungos	Bactérias	Oxidados	Saudáveis
T1	100a *	0 c	100a	0a
T2	100a	0 c	100a	0a
T3	22 b	27 b	87 b	3a
T4	35 b	56a	60 c	5a
Média	62,3	20,8	86,6	2,0

*Dados transformados por arco seno da raiz de x/100, segundo o teste de normalidade. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

Experimento 5 - Desinfestante SaniAgri™ na assepsia dos explantes e no meio de cultura

O uso do agente desinfestante no meio de cultura é uma alternativa quando esse não apresenta nenhuma toxicidade à planta. Realizaram-se diferentes testes com o objetivo de avaliar a toxicidade do agente e sua eficácia no controle da contaminação.

Novamente, os tratamentos T4 e T7, os quais utilizaram assepsia com SaniAgri™ (5 e 10 mL.L⁻¹, 18 h), não foram eficientes na produção de indivíduos saudáveis. Isto ocorreu devido, principalmente, ao alto índice de oxidação (Tabela 5). Isso reforça o caráter fitotóxico do reagente nos níveis testados. Comportamento semelhante pode ser visto nos tratamentos sem assepsia com SaniAgri™ e na combinação assepsia com SaniAgri™ e

adição ao meio de cultura nos níveis de 5 a 10 mL.L⁻¹, tratamentos T2, T3, T5, T6, T8 e T9. Altos índices de oxidação demonstram o caráter fitotóxico. Na variável explantes sadios, a média foi muito baixa, não passando de 1 % para todos os tratamentos. A percentagem de indivíduos oxidados no tratamento 1 pode estar relacionada à grande taxa de contaminações por fungos e bactérias, que ocasionou as mortes dos explantes.

Tabela 5. Ocorrência fungos, bactérias, explantes oxidados e sadios após 20 dias de inoculação em meio de cultura.

Tratamento	Fungos	Bactérias	Oxidados	Sadios
-----%-----				
T1	10a*	100a	100a	0a
T2	1 b	0 c	99a	1a
T3	21a	0 c	100a	0a
T4	25a	0 c	99a	0a
T5	25a	0 c	99a	0a
T6	10a	0 c	99a	1a
T7	0 b	4 b	100a	0a
T8	0 b	0 c	99a	1a
T9	1 b	0 c	100a	0a
Média	13,0	11,5	99,4	0,3

*Dados transformados por arco seno da raiz de x/100, segundo o teste de normalidade. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

Experimento 6 - Assepsia convencional dos explantes com adição do desinfestante SaniAgri™ ao meio de cultura WPM com adição de PVP e diferentes concentrações de sacarose

Tendo em vista a fitotoxicidade do agente nas concentrações de 5 mL e 10 mL, um experimento adicional foi realizado com a assepsia convencional (álcool 70 %, 1 min e NaClO 5 %, 20 min) com a adição de 1 mL.L⁻¹ do agente a diferentes meios de cultura com e sem a adição do antioxidante PVP.

A maior média de explantes sadios foi alcançado pelo tratamento T5, que também obteve a menor média de explantes oxidados, zero contaminação por bactéria e apenas 10 % de contaminação por fungos (Tabela 6). O tratamento T4 obteve zero de contaminação por fungos. Os testes indicam que a manutenção dos explantes em 1 mL.L⁻¹ do agente durante 30 dias não apresentou fitotoxicidade aos explantes. Com relação ao meio de cultura utilizado, não existe diferença significativa para a resposta oxidação, sugerindo que as várias combinações de meios utilizados não afetaram estatisticamente os resultados. Embora em valores absolutos os tratamentos T1 e T5 apresentaram melhores resultados.

Em função dos resultados obtidos, o meio de cultura ½ WPM, com o antioxidante PVP e sacarose na concentração de 20 g.L⁻¹ e acrescido de 1 mL.L⁻¹ de SaniAgri™, após a assepsia convencional (etanol 70 %, 1 min e NaClO 5 %, 20 min) foi eficiente para obter explantes de erva-mate livres de contaminação.

Tabela 6. Porcentagem de ocorrência de fungos, bactérias, explantes oxidados e sadios após 30 dias de introdução em meio de cultura.

Tratamento	Fungos	Bactérias	Oxidados	Sadios
----- % -----				
T1	20ab*	43a	7a	35ab
T2	32a	7ab	32a	42ab
T3	27ab	22ab	26a	31ab
T4	0 b	48a	14a	47ab
T5	10ab	0 b	3a	83a
T6	47a	17ab	17a	21ab
T7	28a	7ab	17a	50ab
T8	41a	28ab	28a	17 b
Média	25,6	21,5	18	38,3

*Dados transformados por arco seno da raiz de x/100, segundo o teste de normalidade. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

Experimento 7 - Assepsia com anti contaminante PPM™

Nos tratamentos T11 e T12, com assepsia convencional (álcool 70 %, 1 min e NaClO 5 %, 20 min e a adição de 1 e 2 mL.L⁻¹ de PPM™ no meio de cultura), juntamente com o tratamento T10, somente assepsia convencional, os explantes obtiveram as menores médias para variável oxidados, e as maiores percentagens de explantes sadios. A melhor percentagem de explantes sadios e a menor taxa de oxidação ocorreu com o tratamento T12, embora não detectada diferença estatística para oxidação entre os tratamentos T10 até T12 (Tabela 7). Os tratamentos T11 e T12 foram eficientes na produção de explantes sadios. O caráter tóxico do agente nesses níveis e na exposição de 30 dias aparenta ser devido à baixa oxidação (Tabela 7).

As maiores taxas de contaminação por fungos corresponderam aos tratamentos onde não foi realizado assepsia com e sem a presença do PPM™ ao meio de cultura (T1, T2 e T3), e naqueles com a assepsia utilizando o PPM™, mas sem a presença desse no meio de cultura (T4 e T7). A combinação assepsia com PPM™ e a sua presença no meio de cultura (T5, T6, T8 e T9) produziram baixos índices de contaminação, mas a mortalidade foi total e a oxidação de 100 %, indicando que a combinação possui um caráter fitotóxico.

Portanto, os melhores tratamentos foram aqueles nos quais ocorreu a combinação da assepsia convencional (etanol a 70 %, 1 min e NaClO 5 %, 20 min) juntamente com o meio de cultura acrescido de PPM™.

Tabela 7. Percentagem de ocorrência de fungos, bactérias, explantes oxidados e sadios após 30 dias de inoculação em meio de cultura.

Tratamento	Fungos	Bactérias	Oxidados	Sadios
T1	100a*	1 b	100a	0 c
T2	99a	0 b	70 b	1 c
T3	90a	0 b	79 b	10 c
T4	99a	21a	100a	0 c
T5	1 c	0 b	100a	0 c
T6	1 c	0 b	100a	0 c
T7	99a	4 b	99a	0 c
T8	0 c	0 b	100a	0 c
T9	1 c	1 b	100a	0 c
T10	25 b	1 b	17 c	70 b
T11	7 c	0 b	4 c	93a
T12	2 c	0 b	2 c	98a
Média	43,6	2,3	72,6	22,6

*Dados transformados por arco seno da raiz de $x/100$, segundo o teste de normalidade. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

Experimento 8 - Assepsia à baixa temperatura ou termoterapia

Os tratamentos T1 e T2 proporcionaram as maiores percentagens de explantes sadios (Tabela 8). A maior percentagem de explantes contaminados com bactéria ocorreu no tratamento T0, e a menor percentagem ocorreu com o T3 e T4. Após o T2 (8 dias na BOD), o número de explantes sadios em média diminuiu, embora significativamente semelhante ao T1, e, conseqüentemente, o número de explantes oxidados aumentou, demonstrando que a exposição muito prolongada ao tratamento a frio não foi eficiente para a obtenção de explantes sadios, causando danos. Essa característica foi confirmada nos altos índices de oxidação nos tratamentos T3 e T4.

O tratamento dos explantes a baixas temperaturas foi eficiente para obter explantes saudáveis, e demonstrou ser um método interessante a ser estudado para o controle de bactérias. A exposição entre três e oito dias a uma temperatura de 4 °C foi recomendada. Este tratamento foi válido, pois demonstrou ser eficaz para o controle de contaminação por bactéria dos explantes de erva-mate, já para fungos, não houve diferenças entre os tratamentos.

Tabela 8. Ocorrência de fungos, bactérias, explantes oxidados e saudáveis após 26 dias de inoculação.

Tratamento	Fungos	Bactérias	Oxidação		Sadios
			-----%		
T0	40a*	75a	13 b		13 b
T1	21a	25 b	1 b		60a
T2	25a	50 b	13 b		35a
T3	0a	1 c	99a		1 b
T4	10a	0 c	93a		7 b
Média	19,2	30,2	43,8		23,2

*Dados transformados por arco seno da raiz de $x/100$, segundo o teste de normalidade. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

Experimento 9 - Efeito da coleta em diferentes meses do ano no comportamento *in vitro* de segmentos nodais

A produção de indivíduos saudáveis foi significativamente superior em agosto (57 %), quando comparada aos demais meses testados, nos quais as percentagens de sobrevivência foram inferiores a 25 % (Tabela 9). Com relação às contaminações por fungos, a maior incidência ocorreu no mês de maio (60 %) e as menores, em março, abril e agosto. Já para contaminação por bactérias, a maior incidência ocorreu no mês de abril (70 %); o mês de agosto apresentou uma taxa significativamente inferior, no qual somente 5 % dos indivíduos apresentaram contaminação. A maior taxa de indivíduos oxidados ocorreu em março (30 %), significativamente

diferente dos outros meses, exceto de agosto, que apresentou uma taxa de 13 %. Em dezembro e maio, foram obtidos os melhores resultados em relação ao controle da oxidação, observando-se a ausência de explantes oxidados.

Não houve nenhuma relação do mês do ano com a contaminação por fungos. O mesmo não pôde ser observado na contaminação por bactérias, no qual o mês de agosto apresentou uma diferença significativa com relação aos outros meses. Com respeito à oxidação dos explantes, esta se mostrou dentro dos limites aceitáveis na maioria dos meses do ano, ou seja, inferior a 13 %, o que está de acordo com Bernasconi et al. (1998). Entretanto, o mês de março apresentou uma percentagem significativa de oxidação (30 %), que pode estar relacionada à estação do ano (verão), na qual ocorre uma maior atividade fisiológica, ocasionando uma maior produção de compostos fenólicos.

O mês de agosto foi o mais adequado para a coleta e inoculação dos segmentos nodais (Tabela 9). Esses resultados contrastam com os de outros autores que verificaram que os meses mais adequados para o cultivo *in vitro* de erva-mate foram os de janeiro e fevereiro (verão). Isto pode estar associado à presença de microorganismos contaminantes de forma endógena nos explantes nos diferentes meses do ano. O mês de agosto apresentou o melhor resultado em relação à percentagem de explantes saudáveis, e o menor valor de umidade relativa (72,5 %) e temperatura média de 13,9 °C, o que poderia ter dificultado o desenvolvimento de microorganismos nos tecidos da planta.

Tabela 9. Efeito dos diferentes meses do ano no comportamento *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate.

Mês/ano	Fungos	Bactérias	Oxidados	Sadios
-----%-----				
2005				
Agosto	25b	5c	13ab	57a
Setembro	40ab	40abc	10b	10b
Dezembro	50ab	45abc	0b	5b
2006				
Março	20b	35abc	30a	15b
Abril	25b	70a	5 b	5b
Mai	60a	15 bc	0 b	25b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os objetivos de multiplicar e enraizar *in vitro* as plântulas de erva-mate não puderam ser alcançados em vista das altas taxas de oxidação e contaminação bacteriana e fúngica. Alguns tratamentos utilizados para a assepsia foram eficientes no controle das contaminações, na fase de estabelecimento, sendo que o tratamento com melhor resultado foi a assepsia convencional dos explantes e nos meios de cultura acrescidos do anticontaminante PPMTM.

Mesmo com resultados satisfatórios em alguns tratamentos para estabelecimento dos explantes, foi observado que a manutenção destes por tempo superior a 60 dias, visando à multiplicação, é até o momento inviável, devido à recontaminação principalmente por bactérias e recalcitrância dos explantes em meios contendo os agentes PPMTM e SaniAgriTM. Neste sentido, a continuidade dos trabalhos com micropropagação de erva-mate se faz necessária, visto que esta técnica teria grande impacto na produção de mudas desta espécie, principalmente de material adulto, que é difícil de ser propagado vegetativamente.

O uso de hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes, em parte, foi eficiente na descontaminação, mas o seu uso isolado não foi satisfatório para o estabelecimento em longo prazo devido à recontaminação principalmente por bactérias.

O emprego de cloreto de mercúrio na desinfestação dos explantes também não proporcionou resultados satisfatórios. O cloreto de mercúrio tem apresentado boas taxas de controle de microorganismos em algumas espécies, entretanto, foi um produto tóxico e gerou resíduos que devem ser adequadamente descartados. Para erva-mate, este produto não foi eficiente contra bactérias em baixas concentrações e causou altas taxas de oxidação quando empregado em maiores concentrações.

Nos diversos experimentos realizados, puderam ser obtidos percentuais de sobrevivência de explantes de até 98 %. Os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos em que se utilizou o anticontaminante PPM™, com o qual observaram-se percentuais que variaram de 83 % a 98 % de explantes sadios, mas a manutenção desse uso no meio de cultura, nas concentrações estudadas, não foi recomendado por causar recalitrância dos explantes. O PPM™ é um biocida de amplo espectro de ação e comparativamente foi mais barato em relação a antibióticos, sendo recomendada para a erva-mate a utilização de concentrações entre 1 e 2 mL.L⁻¹ como componente do meio de cultura (METHODS..., 2008). Conforme Niedz (1998), as isotiazolonas são uma classe de biocidas industriais que têm sido utilizadas profilaticamente na forma de *Preservative Plant Mixture* (PPM) no meio de cultura para controlar contaminação microbiana. Este anticontaminante tem sido utilizado no cultivo *in vitro* de inúmeras espécies com resultados satisfatórios.

O desinfestante SaniAgri™, empregado na assepsia dos explantes ou no meio de cultura, não proporcionou bons resultados no controle de contaminações *in vitro*, contribuindo para altas taxas de oxidação dos explantes. A sua utilização na concentração de 1 mL.L⁻¹ no meio de cultura apresentou-se como satisfatória na fase de estabelecimento, mas o seu uso prolongado no meio causa a recalitrância dos explantes. Relatos de

sucesso deste produto no cultivo *in vitro* de orquídeas demonstram que há necessidade de maiores estudos com a erva-mate para definir a sua eficácia e modo de uso.

Resultados promissores de controle de contaminações *in vitro* de erva-mate foram obtidos com os tratamentos de termoterapia (60 % de explantes saudáveis) e coleta em diferentes épocas do ano (57 % de explantes saudáveis). A efetividade da manutenção dos explantes a 4 °C durante três dias, provavelmente exerceu ação contra o desenvolvimento de agentes contaminantes bacterianos. Neste sentido, pois relevante a manutenção de matrizes em ambientes com controle das condições climáticas, a exemplo de fitotron, onde pôde-se testar o efeito de várias simulações entre algumas variáveis atmosféricas, pois há facilidade do controle fitossanitário, em função do ambiente protegido.

Da mesma forma, a obtenção de menores taxas de contaminação nos explantes coletados em agosto pode ter sido devido aos valores baixos de umidade relativa do ar e temperatura (ROSA et al., 2006). Entretanto, outros trabalhos desenvolvidos com erva-mate indicam o período primavera/verão como a melhor época para coleta de explante desta espécie. Mroginski et al. (1997) e Bernasconi et al. (1998) relataram que os melhores resultados de estabelecimento foram obtidos com explantes de erva-mate coletados nas épocas mais quentes do ano no hemisfério sul (janeiro, fevereiro e março) e que nos meses mais frios (julho e agosto), a taxa de estabelecimento foi nula. Em função da disparidade de resultados obtidos, mais estudos são necessários.

Os resultados obtidos até o presente com micropropagação de erva-mate ainda são inconclusivos, havendo a necessidade de serem testados outros fatores. Mesmo com resultados satisfatórios em alguns tratamentos para estabelecimento dos explantes, foi observado que a manutenção destes por tempo superior a 30 dias, visando à multiplicação, foi, até o momento, inviável. Neste sentido, a continuidade dos trabalhos com micropropagação de erva-mate se faz necessária, visto que esta técnica teria grande impacto na produção de mudas desta espécie, principalmente de material adulto, o qual é difícil de ser propagado vegetativamente.

Em que pese as melhores respostas obtidas com o cultivo *in vitro* desta espécie, na Argentina, os explantes são introduzidos e, após brotação e enraizamento, são transplantados para ambiente *ex vitro*. No entanto, quando o objetivo é o rejuvenescimento de materiais adultos selecionados, esta metodologia não é adequada, visto que os explantes devem ser mantidos indeterminadamente *in vitro*.

Conclusões

Em função dos resultados obtidos para o cultivo *in vitro* de erva-mate, pôde-se concluir que:

- Métodos de assepsia com hipoclorito de sódio apresentam-se como alternativa quando usados em conjunto com outros agentes desinfestantes;
- O cloreto de mercúrio não foi eficiente no controle de contaminantes em explantes de erva-mate;
- O SaniAgri™ apresentou caráter fitotóxico em concentrações superiores a 1 mL.L⁻¹. A combinação de hipoclorito de sódio na assepsia e adição de 1 mL.L⁻¹ de SaniAgri™ ao meio de cultura demonstrou ser eficaz na descontaminação, mas o uso prolongado (> 1 mês) do agente no meio de cultura causou recalcitrância aos explantes;
- O anticontaminante PPM™ proporcionou taxas de sobrevivência de até 98 % quando adicionado ao meio de cultura; e assim como o SaniAgri™, apresentou melhores resultados quando realizada simultaneamente a assepsia com hipoclorito de sódio. Da mesma forma, o seu uso prolongado causou recalcitrância aos explantes;
- A termoterapia e a coleta de explantes em determinadas épocas do ano influenciam na obtenção de indivíduos sadios durante o estabelecimento;
- Até o momento, a multiplicação de erva-mate *in vitro* foi inviável em função das altas taxas de contaminação e/ou recalcitrância após o estabelecimento.

Referências

- ASSIS, T. F. de. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 141, p. 36-46, 1986.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação & interesse ecológico: as principais espécies nativas sul-brasileiras. [Rio de Janeiro]: Instituto Souza Cruz, 2002. 325 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.
- BRAGAGNOLO, N.; PAN, W.; KLOSOVSKI FILHO, L. **Manual técnico de erva-mate**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura: EMATER-PR: Instituto de Terras e Cartografia, 1980. 40 p.
- CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES FORESTALES, 1987, Buenos Aires. **Anales**. Buenos Aires: Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales, 1987. v. 2, p. 2115-232.
- DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. 81 p. (EPAGRI. Boletim técnico, 100).
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; VAN WYK, G. Mass vegetative propagation. In: _____. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.
- FERREIRA, A. G.; CUNHA, G. G.; SILVEIRA, T. S.; HU, C. Y. *In vitro* germination of immature embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**, v. 52, n. 1, p. 27-32, 1991.
- FERREIRA, A. G.; SILVEIRA, T. S. Crescimento *in vitro* de embriões de 4 espécies de *Ilex*. In: REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1., 1992, Porto Alegre. **Programa e Resumos**. Porto Alegre: FAPERGS: Secretaria de Ciência e Tecnologia, 1992. p. 2.
- FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 5 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 45).
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; RODIGHERI, H. R.; MOSELE, S. H.; WIELEWSKI, P. **Estimativa de danos causados por doenças em viveiros de erva-mate, nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1999. 3 p. (EMBRAPA-CNPQ. Comunicado técnico, 21).

HIGA, R. C. V. Estaquia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): resultados preliminares. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 304-305, 1983. Edição dos Anais do 4º Congresso Florestal Brasileiro, 1982, Belo Horizonte.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire - Aquifoliaceae)**. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

HU, C. Y.; OCHS, J. D.; MANCINI, F. M. Further observations on *Ilex* embryoid production [angiosperm trees]. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v. 89, n. 1, p. 41-49, 1978.

KRAEMER, K. H.; SCHENKEL, E. P.; VERPOORTE, R. *Ilex paraguariensis* cell suspension culture characterization and response against ethanol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, n. 3, p. 257-263, 2002.

KRYVENKI, M. A. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto de la bencilaminopurina y la kinetina sobre el cultivo *in vitro* de segmentos nodales. 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-CNPFF, 1997. p. 424. (EMBRAPA-CNPFF. Documentos, 33).

MACCARI JÚNIOR, A.; MAZUKOWSKI, J. Z. (Coord.). **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate, 2000. 160 p. (Série PADCT, 1).

MEDEIROS, A. C. de S. **Dormência em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: Embrapa-CNPFF, 1998. 25 p. (Embrapa-CNPFF. Documentos, 36).

MENNA, A. B. Proposta para ação extensionista na cultura da erva-mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. (Org). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p. 235-239.

MONTOYA VILCAHUAMAN, L. J. **Caracterizacion y evaluacion economica del sistema agroforestal yerba mate en el sur de Brasil: un enfoque financiero, de optimizacion y de riesgo**. 1999. 140 f. Tese (Doutorado en Economia) - Colegio de Postgraduados, Institucion de Enseñanza e Investigacion en Ciencias Agricolas, Instituto de Socioeconomia Estadística e Informática, Montecillo.

MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; COLLAVINO, M. Micropropagación vegetativa 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-CNPFF, 1997. p. 141-152. (EMBRAPA-CNPFF. Documentos, 33).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NIEDZ, R.P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **Hort Technology**, v. 8, n. 4, p. 598-601, 1998.

OLIVEIRA, M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10., 1983, Curitiba. **Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): anais**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p. 17-36. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 15).

METHODS & applications of plant cell & tissue culture. In: **MooreWeb**: course web pages. Disponível em: <<http://www.hos.ufl.edu/mooreweb>>. Acesso em: 28 jun. 2008.

PRAT KRIKUN, S. D. **Yerba mate**: técnicas actualizadas de cultivo. Cerro Azul: INTA, Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, 1993. 14 p. (INTA. Miscelánea, n. 27).

REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Regeneración de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo *in vitro* de ápices caulinares y de segmentos nodales. **Phyton**, v. 48, n. 1/2, p. 139-145, 1988.

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. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, n. 35, n. 5, p. 401-402, 1999.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. Obtención de plantas mediante el cultivo *in vitro* de embriones de yerba 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, Curitiba. **Anais**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1997a. p. 422. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 33).

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. Regeneración de plantas de yerba mate por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de plantas juvenes. 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-CNPQ, 1997b. p. 423. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 33).

STURION, J. A. **Produção de mudas e implantação de povoamentos com erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1988. 10 p. (EMBRAPA-CNPQ. Circular técnica, 17).

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 2, p. 289-292, fev. 2007. Nota Científica.