

TIPO DE EXPLANTE E CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO E OXIDAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE PLANTAS DE MACIEIRA (*Malus domestica* BORKH.) CVS. GALAXY, MAXIGALA E MASTERGALA

EXPLANT TYPE AND CONTAMINATION AND OXIDATION CONTROL ON THE *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF APPLE PLANTS (*Malus domestica* BORKH.) CVS. GALAXY, MAXIGALA E MASTERGALA

ERIG, Alan C.¹; SCHUCH, Márcia W.²

RESUMO

Com o objetivo de determinar o explante mais adequado e definir metodologia para o controle da contaminação e oxidação dos explantes no estabelecimento *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala foram realizados três experimentos. No experimento I, testou-se o tipo de explante mais adequado (gema ou segmento nodal) para o estabelecimento *in vitro* de macieira. Determinado o melhor explante, se iniciou o experimento II, onde se verificou o efeito de dois diferentes compostos a base de cloro (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio) e do ácido ascórbico em três diferentes concentrações no meio de cultura (0, 50 e 100 mg L⁻¹), no controle da contaminação e oxidação dos explantes. No experimento III, os tratamentos se constituíram da lavagem ou não das brotações doadoras de explantes, em água corrente antes do procedimento de desinfestação, e de cinco concentrações de ácido ascórbico (0, 50, 100, 150 e 200mg L⁻¹) utilizado na lavagem das brotações após concluída a desinfestação. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que, para o estabelecimento *in vitro* de macieiras cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala, o explante mais indicado é o segmento nodal. A utilização de ácido ascórbico adicionado ao meio de cultura ou na lavagem das brotações após a desinfestação, não inibiu ou reduziu a oxidação dos explantes nas concentrações utilizadas, comparadas ao controle (0mg L⁻¹). A desinfestação dos explantes com hipoclorito de sódio, de modo geral, foi mais eficiente, possibilitando uma maior percentagem de sobrevivência. A lavagem das brotações em água corrente antes da desinfestação diminuiu a oxidação, porém aumentou a contaminação bacteriana.

Palavras-chave: cultura de tecidos, gema, segmento nodal, assepsia, ácido ascórbico.

INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de clima temperado, a macieira (*Malus domestica*, Borkh.) ocupa lugar de destaque no Brasil, com uma área de 32 mil hectares e uma produção aproximada de 967.000 toneladas (RADMANN et al., 2002), suficiente para atender 95% do mercado interno, bem como atendendo ao mercado externo. Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina são responsáveis por cerca de 90% da produção nacional.

Segundo TSUCHIYA (2001), as duas cultivares de maçã mais plantadas no Brasil são a 'Gala' e a 'Fuji', com 46% e 45% de participação, respectivamente. No entanto, de acordo com STAINER et al. (2001), o plantio de cultivares originadas

de mutações tem aumentado significativamente, devido principalmente ao mercado que exige um produto sempre de melhor qualidade. As cultivares Galaxy, Maxigala e Mastergala são algumas das cultivares, atualmente difundidas, originadas de mutações, a partir da cv. Gala.

Para atender às demandas por material vegetativo de uma nova cultivar de macieira, é necessária uma grande quantidade de material propagativo. Com o avanço da biotecnologia, foram estabelecidos vários protocolos para a micropropagação massal de diversas espécies frutíferas (ALMEIDA et al., 1997).

Na micropropagação de uma espécie, o primeiro passo é o estabelecimento *in vitro* de plantas, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados. Segundo FACHINELLO et al. (1995), na maioria dos trabalhos envolvendo micropropagação de frutíferas, os explantes escolhidos são obtidos de gemas apicais ou axilares. Para o estabelecimento *in vitro* de macieira são utilizados como explantes ápices caulinares, segmentos nodais e meristemas extraídos de gemas apicais e/ou laterais, como mostram os trabalhos de HUTCHINSON (1984), MACHADO et al. (1991), SHAWKY et al. (1993), YEPES & ALDWINCKLER (1994), AKLAN et al. (1997), MODGIL et al. (1999) e NUNES et al. (1999). Segundo VILLALOBOS & THORPE (1991), o melhor explante deve ser determinado experimentalmente.

As plantas lenhosas, onde se inclui a maioria das frutíferas, apresentam dificuldades relevantes para o estabelecimento *in vitro*, principalmente devido a contaminação e oxidação. Para evitar ou amenizar a contaminação, são determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta doadora do material vegetal utilizado para isolamento *in vitro*. A primeira medida é a manutenção da planta-matriz em ambiente higienizado, como uma casa de vegetação ou câmara de crescimento, evitando desta forma sua exposição às intempéries e insetos que provocam ferimentos, permitindo a entrada de microrganismos (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998) que são difíceis de controlar, e cuja desinfecção pode trazer simultaneamente danos ou mesmo morte aos tecidos.

Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000). Várias substâncias com ação

¹ Eng^o. Agr^o, M.Sc., Doutorando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Fruticultura). FAEM/UFPeL, Cx. P. 354, CEP 96010-900. Pelotas - RS. Bolsista CAPES. E-mail: acerig@ufpel.tche.br

² Eng^a. Agr^a, Dr^a, Professora do Departamento de Fitotecnia. FAEM/UFPeL, Pelotas - RS. E-mail: marciaaws@ufpel.tche.br

(Recebido para publicação em 25/03/2003)

germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e o de cálcio (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). As combinações dos princípios ativos desinfestantes podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), sendo necessária à adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado.

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado. Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000). Segundo SATO et al. (2001), esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, podendo causar sua morte, além de escurecer o meio de cultura.

Através do presente trabalho, objetivou-se determinar o explante mais adequado e definir metodologia para o controle da contaminação e oxidação dos explantes, no estabelecimento *in vitro* de macieira (*M. domestica*) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi subdividido em três experimentos, os quais foram realizados no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas, RS, no período de dezembro de 2002 a março de 2003.

No experimento I, testou-se o tipo de explante mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de macieira. Gemas e segmentos nodais provenientes de brotações novas com 20 a 50cm de comprimento, obtidas de mudas de macieira com aproximadamente um ano de idade, das cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala, enxertadas sobre o porta-enxerto EM-9, mantidas em casa de vegetação, foram utilizadas como explantes e constituíram os tratamentos.

Determinado o melhor explante, iniciou-se o experimento II, onde se verificou o efeito de dois diferentes compostos a base de cloro (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio) e do ácido ascórbico em três diferentes concentrações no meio de cultura (0, 50 e 100mg L⁻¹), no controle da contaminação e oxidação dos explantes, visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. Neste experimento, segmentos nodais com uma gema e aproximadamente 1cm de comprimento, provenientes das mesmas mudas do experimento I, foram utilizados como explantes.

No experimento III, os tratamentos se constituíram da lavagem ou não das brotações doadoras de explantes, em água corrente durante 10 minutos, antes do procedimento de desinfestação, e de cinco concentrações de ácido ascórbico (0, 50, 100, 150 e 200mg L⁻¹) utilizado na lavagem das brotações doadoras de explante durante 5 minutos, em câmara de fluxo laminar, após concluído o procedimento de desinfestação. Nos tratamentos nos quais não foi utilizado o ácido ascórbico (0mg L⁻¹), realizou-se uma lavagem adicional com água destilada e autoclavada. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais com uma gema e aproximadamente 1cm de comprimento, provenientes de brotações novas de mudas de macieira da cv. Galaxy, enxertadas sobre o porta-enxerto EM-9, mantidas em casa de vegetação.

Visando diminuir a contaminação *in vitro*, as mudas doadoras dos explantes mantidas em casa de vegetação, foram pulverizadas semanalmente com o antibiótico Agrimicina (Oxitetraciclina e Sulfato Estreptomicina – Pfizer) e com o fungicida Dithane (Mancozeb), misturados nas doses de 2,4g L⁻¹ e 1,0g L⁻¹, respectivamente.

No ato da coleta, as brotações novas tiveram suas folhas eliminadas, sendo, em seguida, desinfestadas em câmara de fluxo laminar, no laboratório. No experimento III, antes da desinfestação, algumas brotações foram lavadas em água corrente, durante 10 minutos, como parte do tratamento. A desinfestação, no experimento I e III, constituiu-se primeiramente, da imersão do material vegetal em álcool a 70% durante 10 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 2% durante 10 minutos, adicionando-se uma gota de Tween 20. No experimento II, além do hipoclorito de sódio utilizado na desinfestação, outros tratamentos consistiram da utilização de hipoclorito de cálcio 2% durante 10 minutos, adicionando-se uma gota de Tween 20. Na sequência o material desinfestado, nos três experimentos, foi lavado três vezes com água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar. No experimento III, realizou-se uma lavagem adicional com ácido ascórbico esterilizado a frio com filtro de membrana durapore®, onde as concentrações (0, 50, 100, 150 e 200mg L⁻¹) variaram com o tratamento, para posterior isolamento dos explantes.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 4,44µM de BAP (6-benzilaminopurina), 0,054µM de ANA (ácido naftalenoacético) e 0,29µM de AG₃ (ácido giberélico), o mesmo utilizado por ERIG & FORTES (2002) no estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro*. No experimento II, adicionou-se ao meio de cultura o ácido ascórbico, sendo que as concentrações (0, 50 e 100mg L⁻¹) variaram com o tratamento. Nos três experimentos, o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6g L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5atm por 15 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio (150x20mm) com 10m L de meio de cultura.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, a 25 ± 2°C, por um período de sete dias, visando diminuir a oxidação fenólica. Aos sete dias de cultivo, os explantes foram transferidos para novo meio de mesma constituição, devido ao escurecimento (oxidação) do meio. Em seguida, os tubos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 42µmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição constituiu-se de cinco tubos com um explante cada.

Nos três experimentos, as avaliações da percentagem de contaminação bacteriana, percentagem de contaminação fúngica e percentagem de oxidação foram realizadas semanalmente, até os 21 dias de cultivo. Os frascos que apresentaram contaminação e/ou oxidação foram eliminados após registro. Aos 45 dias de cultivo avaliou-se a percentagem de sobrevivência e de estabelecimento. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante (gema ou segmento nodal) e o estabelecimento determinou-se pelo desenvolvimento dos primórdios foliares no explante (emissão de folhas ou broto).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ou analisados por regressão polinomial,

através do uso do pacote estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987). Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

A oxidação dos explantes ocorreu até os 21 dias de cultivo, quando se obteve uma oxidação média de 32%. De maneira geral, em duas a três horas após o isolamento dos explantes e sua transferência para os tubos de ensaio, já se observava a liberação de compostos fenólicos no meio de cultura e sua oxidação (indicada pelo escurecimento do meio de cultura e das superfícies cortadas dos explantes), tornando-se mais intensa ao passar dos dias, até mostrar-se como o principal entrave para o estabelecimento *in vitro* das cultivares de macieira. MODGIL et al. (1999) relatam que a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, e segundo GRATTAPAG LIA & MACHADO (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina. MODGIL et al. (1999) também verificaram elevada oxidação (34,25%) no estabelecimento *in vitro* de macieira cv. Tydeman's Early Worcester utilizando ápices caulinares e segmentos nodais como explantes.

A contaminação fúngica foi praticamente nula, não oferecendo problemas ao estabelecimento *in vitro* de macieira, com uma média de 1,4% de contaminação até os 21 dias de cultivo. A contaminação bacteriana também não foi intensa, com exceção para a cv. Galaxy quando se utilizou como explante a gema (56% de contaminação) (Tabela 1). Estes resultados, possivelmente se devem, à manutenção das plantas-matrizes em um ambiente protegido (casa de vegetação), e as suas pulverizações semanais com fungicida e antibiótico, e reforçam a afirmativa de MONTARROYOS (2000), de que a condição fitossanitária da planta-matriz determina o grau de facilidade do processo de eliminação de microrganismos contaminantes existentes no explante, durante a sua introdução *in vitro*. No estabelecimento *in vitro* de cultivares de pereira (*Pyrus* spp.), ERIG & FORTES (2002), obtiveram contaminação por bactérias em 45,7% das gemas provenientes de plantas mantidas no campo.

Tabela 1 - Porcentagem de contaminação bacteriana aos 21 dias de cultivo *in vitro*, em função do tipo de explante (gema e segmento nodal) de macieira cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. UFPel, Pelotas, RS, 2003.

Cultivar	% de contaminação bacteriana *	
	gema	segmento nodal
Galaxy	56,0aA	7,5aB
Maxigala	0,9bA	10,1aA
Mastergala	0,0bA	1,9aA
Média	16,1	
CV (%)	85,9	

* Médias não seguidas de mesma letra minúscula para mesmo explante e maiúscula entre explantes, diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

Apesar da sobrevivência dos explantes ter sido maior na cv. Mastergala (64,9%), seguido da cv. Galaxy (38,3%) e da cv. Maxigala (19,3%), na Tabela 2, verifica-se que a maior porcentagem de estabelecimento, com o segmento nodal, foi obtida com a cv. Galaxy (31,5%), seguido da Maxigala e da Mastergala (ambas com 0,9%). Trabalhando com a macieira cv. Tydeman's Early Worcester, MODGIL et al. (1999) obtiveram 21,75% e 39,75% de estabelecimento com explantes coletados no inverno e outono, respectivamente. ERIG et al. (2003) trabalhando com mirtilo, verificaram que apesar da porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais e gemas ser relativamente alta (40,75% e 7,81%, respectivamente), a porcentagem de estabelecimento destes explantes sobreviventes foi baixa (8,09% e 0,82%, respectivamente).

Tabela 2 - Porcentagem de estabelecimento aos 45 dias de cultivo *in vitro*, de diferentes explantes (gema e segmento nodal) de macieira cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. UFPel, Pelotas, RS, 2003.

Cultivar	% de estabelecimento *	
	gema	segmento nodal
Galaxy	0,0aB	31,5aA
Maxigala	0,0aA	0,9bA
Mastergala	0,0aA	0,9bA
Média	7,6	
CV (%)	97,6	

* Médias não seguidas de mesma letra minúscula para mesmo explante e maiúscula entre explantes, diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

A partir destes resultados pode-se afirmar que, mesmo havendo uma alta sobrevivência de explantes, isto não pode ser usado como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes. Como se pode ver, para as cultivares Mastergala e Maxigala a sobrevivência dos explantes foi relativamente alta (64,9% e 19,3%, respectivamente), no entanto, o estabelecimento *in vitro* para estas cultivares foi baixo, com 0,9% para ambas as cultivares a partir de segmento nodal, e nulo quando se utilizou a gema. ALTMAN & GOREN (1977) observaram que gemas laterais pequenas de *Citrus sinensis*, cultivadas sem qualquer "escudo" de caule, não brotaram, enquanto que explantes maiores contendo partes de caule cresceram.

O que se observou em relação à sobrevivência e ao estabelecimento neste trabalho, é que os tecidos dos explantes continuaram vivos (o que foi indicado pela coloração verde do explante), no entanto, eles não emitiram folhas ou brotos, isto é, não se estabeleceram *in vitro*. Isto pode ser justificado pelo grau de desenvolvimento da gema do explante. O que poderia estar ocorrendo, é que alguns explantes, principalmente aqueles isolados da base e da região mediana da brotação, estariam com as gemas mais desenvolvidas e com o lenho mais lignificado do que as do ápice, influenciando a oxidação, sobrevivência e estabelecimento. Segundo PEREIRA & FORTES (1999), o uso de segmentos nodais de origem basal e apical, sem prévia subdivisão, em estudos de multiplicação *in vitro*, pode provocar uma fonte de variação na resposta final, para várias espécies vegetais. MURASHIGE (1974) observou em explantes de seções de caule de *Nicotiana tabacum* que aqueles de regiões mais próximas do ápice produziram maior número de brotos e raízes do que aqueles localizados mais perto da região basal, demonstrando um progressivo declínio nas características organogênicas à medida que se afasta do ápice.

Experimento II

A oxidação, da mesma forma que no experimento I, ocorreu de forma intensa até os 21 dias de cultivo. Nas cvs. Mastergala e Maxigala, não houve diferença significativa para a oxidação, quando se utilizou hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio na desinfestação dos explantes. Já na cv. Galaxy, os explantes desinfestados com hipoclorito de sódio apresentaram maior oxidação comparado aqueles desinfestados com hipoclorito de cálcio (29,8% e 5,3%, respectivamente) (Tabela 3). ERIG et al. (2003), também verificaram que a oxidação em segmentos nodais de mirtillo (*Vaccinium ashei* Reade) colocados *in vitro* foi maior com a utilização de hipoclorito de sódio, quando comparado ao hipoclorito de cálcio. GRATTAPAG LIA & MACHADO (1998) afirmam que o hipoclorito de cálcio tem a vantagem de ser menos tóxico aos tecidos do que o hipoclorito de sódio.

Na Tabela 3, observa-se que a contaminação bacteriana, com exceção para a cv. Galaxy, foi baixa, não havendo diferença para esta variável, entre os explantes desinfestados com hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. Já na cv. Galaxy, a contaminação bacteriana foi mais intensa quando se utilizou o hipoclorito de cálcio na desinfestação dos explantes (78,2%), comparado ao hipoclorito de sódio (27,8%). CHAVES et al. (2002) verificaram no estabelecimento *in vitro* de *Prunus* cv. MR.S. 2/5, que a desinfestação com hipoclorito de cálcio favoreceu uma maior percentagem de contaminação, quando comparado ao hipoclorito de sódio. Entre as cultivares, pôde-se observar que, tanto na utilização de hipoclorito de sódio como na utilização de hipoclorito de cálcio, a contaminação por bactérias foi maior na cv. Galaxy, seguida de 'Maxigala' e, por último 'Mastergala', onde foi praticamente nula.

Tabela 3 - Percentagem de oxidação, percentagem de contaminação bacteriana e percentagem de contaminação fúngica, aos 21 dias de cultivo *in vitro*, em função do tipo de composto a base de cloro utilizado na desinfestação dos explantes de macieira, cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. UFPel, Pelotas, RS, 2003.

Cultivar	% de oxidação *	
	hipoclorito de sódio	hipoclorito de cálcio
Mastergala	53,6aA	43,7aA
Maxigala	35,1abA	34,9aA
Galaxy	29,8bA	5,3bB
Média	34,6	
CV (%)	43,9	
Cultivar	% de contaminação bacteriana *	
	hipoclorito de sódio	hipoclorito de cálcio
Mastergala	0,0cA	0,1cA
Maxigala	8,1bA	11,0bA
Galaxy	27,8aB	78,2aA
Média	22,0	
CV (%)	74,6	
Cultivar	% de contaminação fúngica *	
	hipoclorito de sódio	hipoclorito de cálcio
Mastergala	0,1aA	0,1cA
Maxigala	0,1aB	18,4aA
Galaxy	0,1aB	2,9bA
Média	7,1	
CV (%)	146,3	

* Médias não seguidas de mesma letra minúscula para mesmo composto a base de cloro e maiúscula entre compostos a base de cloro, diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

A contaminação fúngica, como também foi observado no experimento I, ocorreu em percentagens baixas (de 0,1 a 18,4%) (Tabela 3). Nas cvs. Maxigala e Galaxy, esta variável foi superior quando se utilizou o hipoclorito de cálcio na desinfestação dos explantes (18,4% e 2,9%, respectivamente) comparado ao hipoclorito de sódio (0,1% para as duas cultivares).

Com a utilização de hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes, a percentagem de sobrevivência foi maior comparada à utilização de hipoclorito de cálcio (15,5% e 6,7%, respectivamente). Este resultado está relacionado à contaminação por bactérias e por fungos que, de maneira geral, foram menores com a utilização de hipoclorito de sódio na desinfestação, conseqüentemente, mais explantes sobreviveram.

Em relação à utilização de ácido ascórbico no meio de cultura, observou-se que a sobrevivência foi maior com a utilização de 0 e 100mg L⁻¹ (17,6% e 13,8%, respectivamente), e depois com 50mg L⁻¹ (3,4%). Portanto, quando se pensa em reduzir os custos do processo de estabelecimento *in vitro*, deve-se optar com base nos resultados deste experimento, em não utilizar o ácido ascórbico, pois a sobrevivência será igual àquela obtida quando se utiliza 100mg L⁻¹ de ácido ascórbico. Resultados semelhantes foram obtidos por BIASI et al. (1994) na micropropagação do abacateiro 'Ouro verde' a partir de segmentos nodais, onde foi verificado que a adição de antioxidante (ácido ascórbico ou ácido cítrico nas concentrações de 0, 100 e 200mg L⁻¹) ao meio de cultura não é vantajosa.

A percentagem de estabelecimento foi extremamente baixa, com uma média de 2,2% aos 45 dias de cultivo *in vitro*, apesar da percentagem de sobrevivência de explantes ter sido bem superior, demonstrando mais uma vez, que mesmo havendo uma alta sobrevivência de explantes, isto não pode ser usado como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes.

Experimento III

Neste experimento, como também foi observado nos experimentos I e II, a oxidação surgiu como o principal problema para o estabelecimento *in vitro* de macieira. Quando as brotações não foram lavadas em água corrente antes da desinfestação, observou-se um efeito quadrático para as concentrações de ácido ascórbico utilizadas na lavagem das brotações após o procedimento de desinfestação, com ponto de máxima oxidação (91,4%) ocorrendo na utilização de 83,4mg L⁻¹ de ácido ascórbico (Figura 1a). Nas concentrações de 0, 100 e 150mg L⁻¹, a oxidação foi menor nas brotações lavadas em água corrente, comparadas aquelas não lavadas em água corrente. Entre estas concentrações, quando não se utilizou o ácido ascórbico (0mg L⁻¹) e fez-se a lavagem em água corrente, a oxidação atingiu somente 12,8% dos explantes. Isto indica que, para diminuir a oxidação em explantes de macieira, a simples lavagem das brotações em água corrente, durante 10 minutos, antes do procedimento de desinfestação é suficiente, sendo desnecessária a lavagem com ácido ascórbico. GRATTAPAG LIA & MACHADO (1998) relatam que a lavagem dos explantes coletados em água corrente, antes da desinfestação, auxilia a lixiviação de compostos fenólicos, diminuindo conseqüentemente, a oxidação. No entanto, SATO et al. (2001) lavaram os explantes de *Celtis* sp., em água corrente, durante 0, 15, 30 e 45 minutos, e observaram oxidação apenas na lavagem de 45 minutos.

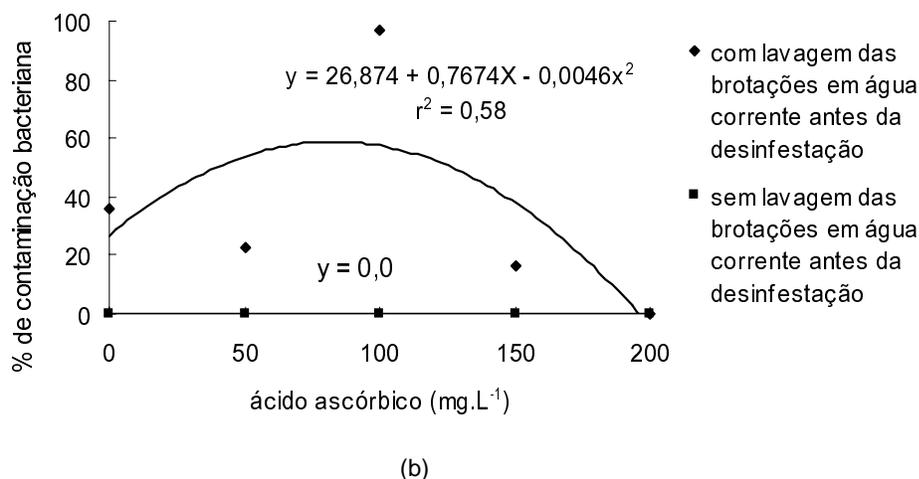
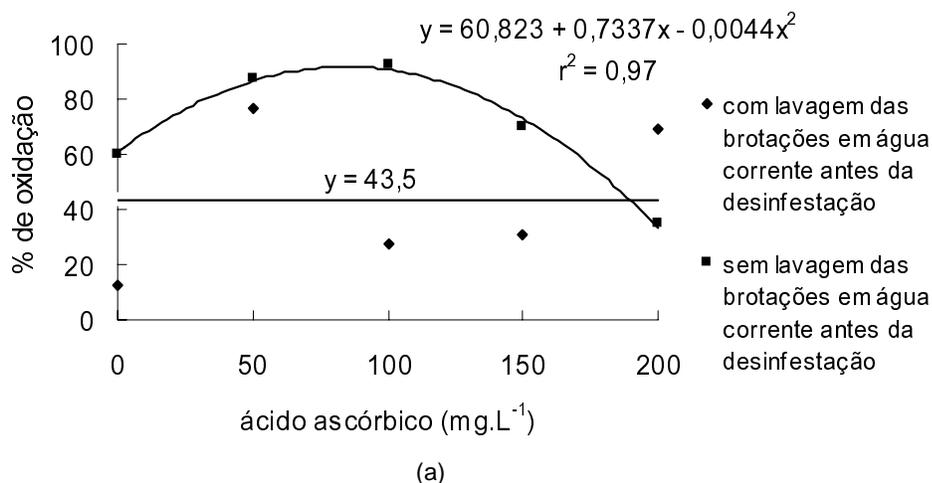


Figura 1 - Percentagem de oxidação (a) e percentagem de contaminação bacteriana (b) em explantes de macieira cv. Galaxy, aos 21 dias de cultivo *in vitro*, em função da lavagem ou não das brotações em água corrente antes da desinfestação, e da concentração de ácido ascórbico utilizado na lavagem das brotações após o procedimento de desinfestação. UFPel, Pelotas, RS, 2003.

Para a contaminação bacteriana, verificou-se efeito contrário ao ocorrido para a oxidação, na lavagem das brotações em água corrente. Nos explantes oriundos de brotações lavadas em água corrente, a percentagem de contaminação por bactérias foi superior àquela obtida para as brotações não lavadas, na qual a contaminação foi nula (Figura 1b). Isto possivelmente ocorreu porque a lavagem em água corrente favoreceu a disseminação das bactérias, aumentando desta maneira a contaminação. Portanto, para diminuir ou evitar a contaminação bacteriana, não recomenda-se lavar as brotações em água corrente antes da desinfestação.

Como os resultados da lavagem das brotações em água corrente foram contraditórios para a oxidação e a contaminação bacteriana, recomenda-se não realizar a lavagem das brotações, pois assim, apesar da oxidação ser um pouco mais elevada, a contaminação bacteriana será nula ou, então, minimizada. A lavagem das brotações poderia ser utilizada para diminuir a oxidação dos explantes, se houvesse uma situação em que se teria certeza de que as plantas

estariam livres de bactérias. Desta forma, a lavagem não favoreceria sua disseminação.

A contaminação fúngica foi praticamente nula, semelhante aos resultados do experimento I e II, não oferecendo problemas ao estabelecimento *in vitro* de macieira, com uma média de 1,2% de contaminação aos 21 dias de cultivo *in vitro*.

A maior sobrevivência foi obtida quando se utilizou 200, 0 e 150mg.L⁻¹ de ácido ascórbico na lavagem dos explantes após o procedimento de desinfestação (41,8%, 39,8% e 39,2%, respectivamente). Este resultado está diretamente relacionado à oxidação e contaminação bacteriana que, de maneira geral, foram maiores com a utilização de 50 e 100mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, conseqüentemente nestes tratamentos, menos explantes sobreviveram (6,1% e 5,2%, respectivamente). Portanto, da mesma forma que o ocorrido no experimento II, quando se pensa em reduzir os custos do processo de estabelecimento *in vitro*, deve-se optar com base nos resultados obtidos neste experimento, em não utilizar o ácido ascórbico na lavagem das brotações, pois a

sobrevivência será igual àquela obtida com 200 e 150mg.L⁻¹ de ácido ascórbico.

A percentagem de estabelecimento foi extremamente baixa, com uma média de 2,3% aos 45 dias de cultivo *in vitro*, apesar da percentagem de sobrevivência de explantes ter sido bem superior, demonstrando mais uma vez (como também ocorreu nos experimentos I e II) que mesmo havendo uma alta sobrevivência de explantes, isto não pode ser usado como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que: (i) para o estabelecimento *in vitro* de macieira cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala, o explante mais indicado é o segmento nodal; (ii) a utilização de ácido ascórbico adicionado ao meio de cultura ou na lavagem das brotações após a desinfestação, não evita ou ameniza a oxidação dos explantes nas concentrações utilizadas; (iii) a desinfestação dos explantes com hipoclorito de sódio, possibilita maior percentagem de sobrevivência; e (iv) a lavagem das brotações em água corrente antes do procedimento de desinfestação diminui a oxidação, porém, aumenta a contaminação bacteriana.

ABSTRACT

With the objective of determining the most appropriate explant and to define methodology for the control of explant contamination and oxidation in the in vitro establishment of apple plants (Malus domestica Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala and Mastergala were accomplished three experiments. In the experiment I, the more appropriate explant type was tested (bud or nodal segment) for the in vitro establishment of apple plants. Certain the best explant, the experiment II began, where the effect of two different chlorine-based composes was verified (sodium hypochloride and calcium hypochloride). Also, the effect of three different ascorbic acid concentrations in the culture medium (0, 50 and 100mg L⁻¹), in the control of explant contamination and oxidation, was measured. In the experiment III, the treatments consisted of washed/unwashed shoot donor explants in running water before the asepsis procedure, and of five concentrations of ascorbic acid (0, 50, 100, 150 and 200mg L⁻¹) used to wash the shoots after having concluded the asepsis. From the obtained results it was concluded that, for the in vitro establishment of apple plants cvs. Galaxy, Maxigala and Mastergala, the nodal segment is the most suitable explant. The use of ascorbic acid added to the culture medium or in the wash of the shoots after the asepsis, did not inhibit or reduced the explant oxidation at the used concentrations, compared to the control (0mg L⁻¹). The explant asepsis with sodium hypochloride was generally more efficient, resulting in a larger survival percentage. The wash of the shoots in running water before the asepsis reduced the oxidation, however it increased the bacterial contamination.

Key words: tissue culture, bud, nodal segment, asepsis, ascorbic acid.

REFERÊNCIAS

- AKLAN, K.; CETINER, S.; AKA-KACAR, Y.; et al. *In vitro* multiplication of clonal apple rootstocks M.9, M.26 and MM.106 by meristem culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.441, p.325–327, 1997.
- ALMEIDA, E.P.; OLIVEIRA, R.P.; MORALES, C.F.G.; et al. Efeito do tipo de explante e de reguladores de crescimento no desenvolvimento *in vitro* de cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.2, p.213-219, 1997.
- ALTMAN, A.; GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of *Citrus* bud culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.78, p.51–60, 1977.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- BIASI, L.A.; KOLLER, O.C.; KAMPF, A.N. Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.7, p.1051-1058, 1994.
- CHAVES, A. da C.; ROCHA, P.S.; BIANCHI, V.J.; et al. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr.S. 2/5 no estabelecimento *in vitro*. **Simiente**, Santiago, v.72, n.3-4, p.111, 2002.
- ERIG, A.C.; FORTES, G.R.L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.577-582, 2002.
- ERIG, A.C.; VICENZI, M.; CHAVES, A.C.; et al. Desinfestação de explantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.8, n.1, p.142-148, 2003.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179p.
- GRATTAPAG LIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI / Embrapa - CNPH, v.1, 1998. p.183-260.
- HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.22, p.347-358, 1984.
- MACHADO, M.L.D.; MACHADO, A.D.; HANZER, V.; et al. A new, efficient method using 8-hydroxy-quinolinol-sulfate for the initiation and establishment of tissue cultures of apple from adult material. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.27, n.2, p.155-160, 1991.
- MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, p.473-497, 1962.
- NUNES, J.C.O.; BARPP, A.; SILVA, F.C.; et al. Micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.191-195, 1999.
- PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R. de L. Efeito do uso de segmentos basais e apicais na multiplicação *in vitro* da macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7. 1999, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF: SBFV, 1999. p.90.
- RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J.C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de

- porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.624-628, 2002.
- SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.
- SHAWKY, I.; DAMIANO, C.; EL HENNAWY, H.M.; et al. Studies on the behaviour of proliferated shoots of M.26 apple rootstock *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v.38, n.2, p.691-697, 1993.
- STAINER, R.; WOHLGEMUTH, H.; GUMMERER, K. Rischi e opportunità dei mutanti di melo. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, Bologna, n.9, p.19-23, 2001.
- TSUCHIYA, S. Perspectivas das novas cultivares japonesas de maçã no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 4., 2001, Fraiburgo. **Anais...** Fraiburgo, SC: ENFRUTE, 2001. p.58-68.
- VILLALOBOS, A.V.M.; THORPE, T.A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. Cali, Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991. p.127-141.
- YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of 13 *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v.15, n.1, p.55-67, 1994.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.