

# REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE BROTOS E RAÍZES ADVENTÍCIAS DE MARMELEIRO (*Cydonia oblonga* Mill.) CVS. MC E ADAMS, UTILIZADOS COMO PORTA-ENXERTOS PARA A PEREIRA

*IN VITRO* REGENERATION OF ADVENTITIOUS SHOOTS AND ROOTS OF QUINCE (*Cydonia oblonga* Mill.) CVS. MC AND ADAMS, USED AS ROOTSTOCKS FOR PEAR TREE

ERIG, Alan C.<sup>1</sup>; SCHUCH, Márcia W.<sup>2</sup>

## RESUMO

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), em muitos países, vem sendo utilizado como porta-enxerto da pereira, com o objetivo de obter-se plantas de pequeno porte e rápida frutificação, além de proporcionar uniformidade aos pomares. Com o objetivo de determinar o tipo de explante e a concentração de thidiazuron (TDZ), que utilizado com o ácido naftalenoacético (ANA) no meio de cultura favoreçam a regeneração *in vitro* de brotos adventícios de marmeleiro cvs. MC e Adams, realizou-se este trabalho. Os tratamentos consistiram de duas cultivares de marmeleiro ('MC' e 'Adams'), dois tipos de explante (folha e entrenó) e cinco concentrações de TDZ no meio de cultura (0, 1,5, 3, 4,5 e 6  $\mu\text{M}$ ), no delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 5, com quatro repetições por tratamento. O meio de cultura constituiu-se dos sais e vitaminas MS, suplementados com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (6 g L<sup>-1</sup>), ANA (2  $\mu\text{M}$ ) e TDZ. Aos 45 dias após o início dos tratamentos avaliou-se a percentagem de regeneração de brotos e raízes, o número médio de brotos e raízes, e a intensidade de formação de calo. Verificou-se que a regeneração *in vitro* de brotos adventícios de marmeleiro das cultivares MC e Adams foi favorecida pelo uso da folha como explante, e pela adição de 4,5  $\mu\text{M}$  de TDZ ao meio de cultura. O mesmo explante, quando cultivado em meio suplementado com 2  $\mu\text{M}$  de ANA em ausência de TDZ, apresentou regeneração de raízes.

**Palavras-chave:** organogênese, thidiazuron, fitorreguladores, tipo de explante, porta-enxerto.

## INTRODUÇÃO

Na fruticultura, o uso de porta-enxertos tem grande importância nas práticas de manejo das plantas, permitindo sua melhor adaptação ao ambiente e a superação de problemas relacionados a pragas, doenças, entre outras. Em muitos países, o marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) pertencente à família Rosaceae, subfamília Maloideae, vem sendo utilizado como porta-enxerto da pereira (*Pyrus* spp), com o objetivo de obter-se plantas de pequeno porte e rápida frutificação (PREVIATI et al., 2002), além de proporcionar uniformidade aos pomares (LEITE, 1992).

O estabelecimento prévio de um protocolo de organogênese eficiente e reproduzível, de modo que as células ou tecidos regenerem plantas, é um dos pré-requisitos para o melhoramento genético vegetal por métodos não sexuais (SARWAR & SKIRVIN, 1997; YANCHEVA et al., 2003), como a transformação genética. Na obtenção de organogênese *in vitro*, vários são os fatores que influenciam,

entre os quais a espécie, a cultivar, o tipo de explante, os componentes nutricionais do meio de cultura, os fitorreguladores e o ambiente de cultivo (RAO et al., 1996).

A escolha do melhor explante é, geralmente, função da sua capacidade de regeneração *in vitro* (BRASILEIRO & DUSI, 1999). Normalmente, se tem maior sucesso utilizando tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética (PERES, 2002). Na regeneração de plantas lenhosas, os explantes mais utilizados são folhas e entrenós de plantas desenvolvidas *in vitro* (DE BONDT et al., 1996). Segundo CARPUTO et al. (1995), o explante ideal deve ser estabelecido para cada genótipo de interesse, pois há genótipos em que as folhas apresentam melhores resultados e outros em que os entrenós são mais regenerativos.

Diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* são encontradas ao se variar a composição nutricional do meio de cultura. Contudo, os componentes mais otimizados em meio de cultura, são os fitorreguladores (PERES, 2002), particularmente o balanço auxina/citocinina (HANDRO & FLOH, 1990). Meios de cultura contendo um balanço auxina/citocinina favorável à auxina promovem a formação de raízes, enquanto que, balanços hormonais favoráveis a citocinina fazem com que se formem gemas caulinares, e finalmente, balanços hormonais intermediários não levam a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e conseqüente crescimento do calo (SKOOG & MILLER, 1957).

Segundo IBRAHIM & DEBERGH (2001), em muitos estudos de regeneração, como os de SARWAR & SKIRVIN (1997) e LANE et al. (1998), os autores focaram em determinar a melhor composição do meio de cultura, e o thidiazuron (TDZ), um composto do grupo das feniluréias com atividade de citocinina, mostrou ser eficiente na estimulação de brotações adventícias em Rosáceas.

O objetivo deste trabalho foi determinar o tipo de explante e a concentração de thidiazuron (TDZ), que utilizado com o ácido naftalenoacético (ANA) no meio de cultura, favoreçam a regeneração *in vitro* de brotos adventícios de marmeleiro (*C. oblonga* Mill.) das cultivares MC e Adams.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas, RS.

<sup>1</sup> Eng. Agr., M.Sc., Doutorando do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas. Cx. P. 354, CEP 96.010-900. Pelotas - RS. E-mail: acerig@ufpel.tche.br Bolsista CAPES. Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Dr<sup>a</sup>., Professora do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas. Cx. P. 354, CEP 96.010-900. Pelotas - RS. E-mail: marciaaws@ufpel.tche.br

(Recebido para Publicação em 31/03/2004, Aprovado em 07/10/2005)

Os tratamentos consistiram de duas cultivares de marmeleiro ('MC' e 'Adams'), dois tipos de explante (folha e entrenó) e cinco concentrações de thidiazuron (TDZ) no meio de cultura (0, 1,5, 3, 4,5 e 6  $\mu\text{M}$ ), no delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 5$ . Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um frasco com cinco explantes.

Os explantes foram obtidos de plantas em fase de multiplicação *in vitro*, 30 dias após a repicagem. Folhas inteiras escarificadas em dois locais perpendicularmente à nervura central foram inoculadas com a face adaxial em contato com o meio. O explante entrenó se constituiu de segmentos caulinares com 0,2 a 0,3 cm de comprimento.

O meio de cultura utilizado constituiu-se dos sais e vitaminas MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescidos de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenoacético (ANA) e de concentrações de thidiazuron (TDZ). O pH foi ajustado para 5,7 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g L<sup>-1</sup> e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos. Foram utilizados frascos de 200 mL com 30 mL de meio de cultura.

Após a inoculação, os frascos com os explantes foram mantidos no escuro durante 10 dias, sob temperatura de 25  $\pm$  2°C. Transcorrido este período, os mesmos foram transferidos para sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25  $\pm$  2°C e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 42  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

Aos 45 dias após a inoculação, avaliou-se a percentagem de regeneração de brotos e raízes, o número médio de brotos e raízes por explante, e a intensidade de formação de calo (atribuindo-se notas de 0 a 3, sendo 0 = ausência, 1 = baixa, 2 = média e 3 = alta intensidade de calo) (Figura 1a). A percentagem de regeneração de raízes e o número médio de raízes por explante foram avaliados em função de ter-se observado, no decorrer do trabalho, o surgimento de raízes em alguns tratamentos.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro e analisados por regressão polinomial, através do programa estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984). Os dados da percentagem de regeneração foram transformados em arco seno da raiz quadrada de x, e o número médio de brotos e de raízes segundo raiz quadrada de x + 0,5, onde x foi o número obtido. Os dados da intensidade de formação de calo foram transformados segundo log x + K, sendo x a nota atribuída e K = 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Análise da Variância observou-se efeito significativo da interação entre o tipo de explante e a concentração de TDZ para a percentagem de regeneração de brotos, percentagem de regeneração de raízes e número médio de brotos. A interação entre cultivar, tipo de explante e concentração de TDZ foi significativa para o número médio de raízes e intensidade de formação de calo.

Com o explante foliar uma tendência quadrática foi ajustada para a percentagem de regeneração de brotos, com a maior média de regeneração com 4,5  $\mu\text{M}$  de TDZ (45,29%) (Figura 2a). Resultados quanto à concentração de TDZ são bastante variáveis em marmeleiro, em estudo de regeneração

de brotos de marmeleiro a partir de folhas, BAKER & BHATIA (1993) obtiveram os melhores resultados com 1,5  $\mu\text{M}$  de TDZ e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, em discos foliares do marmeleiro 'A', entretanto, a maior regeneração (48%) foi obtida com 32  $\mu\text{M}$  de TDZ e 0,3  $\mu\text{M}$  de ANA (DOLCET-SANJUAN et al., 1991). Segundo PÉREZ-TORNERO et al. (2000), estas diferenças entre os genótipos tornam necessário o estudo individualizado para cada cultivar.

O entrenó mostrou menor potencial morfogênico quando comparado à folha, com uma regeneração média de 7,04%, independentemente da concentração de TDZ utilizada. As aparências dos brotos regenerados a partir do entrenó e da folha são mostradas nas Figuras 1b e 1c, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por SCHUCH & PETERS (2002), que observaram uma maior capacidade regenerativa em folhas de macieira cv. Gala, enquanto que os entrenós não regeneraram. JIHYAE et al. (1996) trabalhando com várias cultivares de macieira, também concluíram que folhas possuem maior capacidade de regenerar brotos do que pecíolos e entrenós.

Para a percentagem de regeneração de raízes, verificou-se que a concentração de TDZ teve efeito contrário àquele observado para a percentagem de regeneração de brotos, isto é, enquanto que a regeneração de brotos aumentou com a concentração de TDZ, a regeneração de raízes diminuiu. Em folhas e entrenós, a regeneração de raízes ocorreu apenas quando estes foram cultivados em meio de cultura sem TDZ (76,87% e 10,02%, respectivamente para cada explante) ou com 1,5  $\mu\text{M}$  de TDZ (21,21% e 3,5%, respectivamente para folhas e entrenós) (Figura 2b). A partir de 3  $\mu\text{M}$  de TDZ, a percentagem de regeneração de raízes em folhas e entrenós foi praticamente nula. Nas Figuras 1d e 1e, pode-se observar a formação de raízes no entrenó e na folha, respectivamente. Tanto na regeneração de brotos como na regeneração de raízes, o que se observou foi o efeito do balanço auxina/citocinina no explante relatado anteriormente por SKOOG & MILLER (1957).

O número médio de brotos formados na folha foi diretamente proporcional à concentração de TDZ no meio de cultura, com a maior média (1,2 brotos) obtida em 6  $\mu\text{M}$  de TDZ (Figura 2c). Resultados semelhantes foram obtidos por IBRAHIM & DEBERGH (2001), apesar destes terem trabalhado com outro gênero da família *Rosaceae*, obtiveram 3,8, 2,4 e 2,6 brotações por explante, nas cultivares de roseira RUI 317, RUI 319 e Inka, respectivamente, adicionando 6,8  $\mu\text{M}$  de TDZ no meio de cultura. SCHUCH & PETERS (2002) obtiveram o maior número de brotações por explante de macieira cv. Gala (2,59) com 18,1  $\mu\text{M}$  de TDZ. No presente trabalho, utilizando o entrenó como explante, independentemente da concentração de TDZ, obteve-se uma média de 0,76 brotos. Na regeneração *in vitro* de pereira (*P. communis*) cv. Carrick, ERIG & SCHUCH (2003) obtiveram em média 1,4 brotos, cultivando entrenós desta espécie diretamente em meio de proliferação com 8,9  $\mu\text{M}$  ou 13,3  $\mu\text{M}$  de TDZ no meio de cultura.

Nas cultivares MC e Adams, quando utilizou-se a folha, esta apresentou maior número de raízes adventícias em meio de cultura sem TDZ (médias de 2,4 e 4,1 raízes, respectivamente) (Figura 3a), obtendo-se o ponto de mínima, 0,47 e 0,23 raízes por folha para cada cultivar, com 4,09  $\mu\text{M}$  e 4,1  $\mu\text{M}$  de TDZ, respectivamente. Já com o entrenó, obteve-se 0,73 e 0,74 raízes, respectivamente, independentemente da concentração de TDZ adicionada ao meio de cultura.

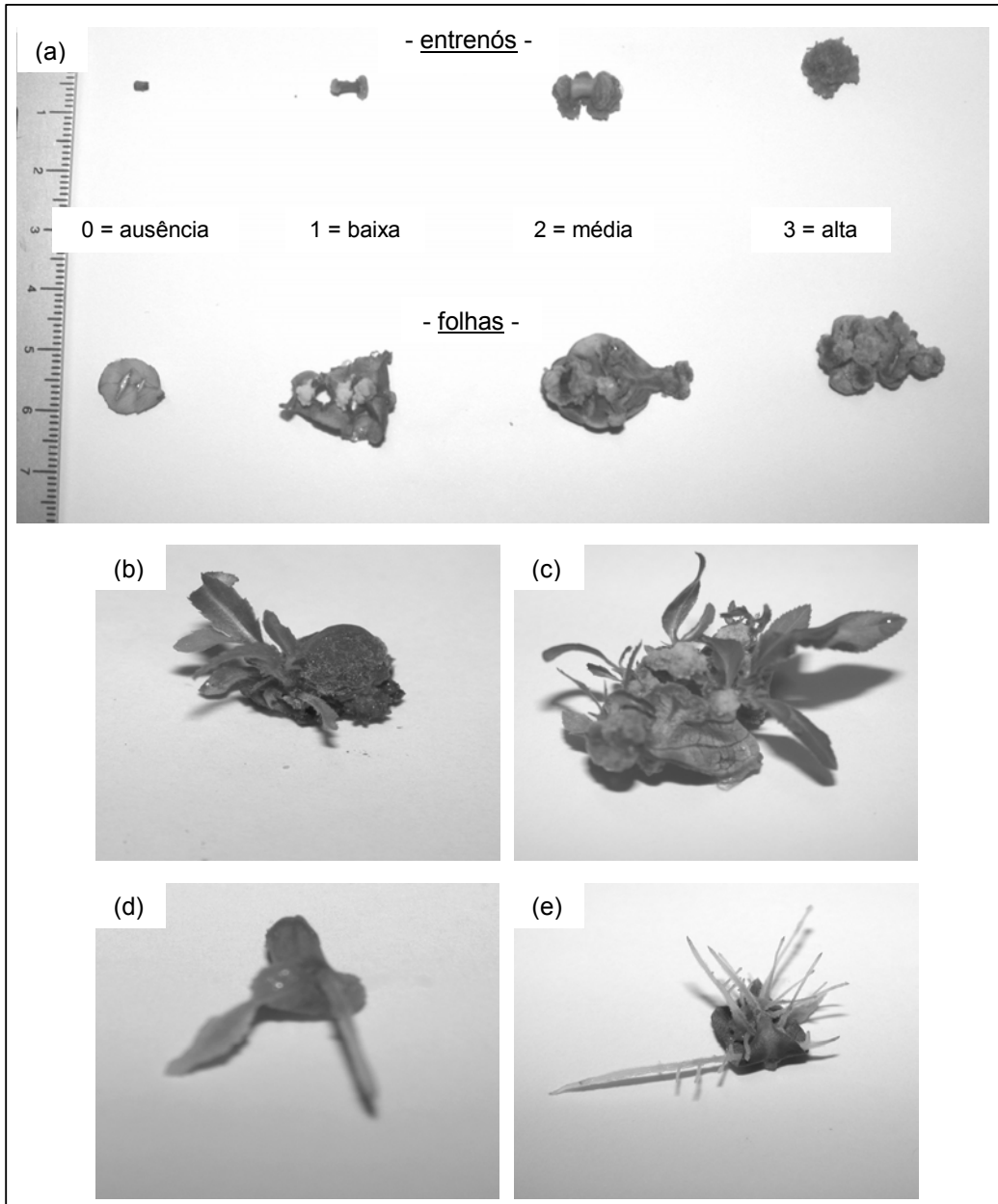


Figura 1 – Intensidades de formação de calo em entrenós e folhas (a), regeneração de brotos em entrenó (b) e folha (c), e regeneração de raízes em entrenó (d) e folha (e) de marmeleiro cv. MC, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. UFPel, Pelotas, RS, 2004.

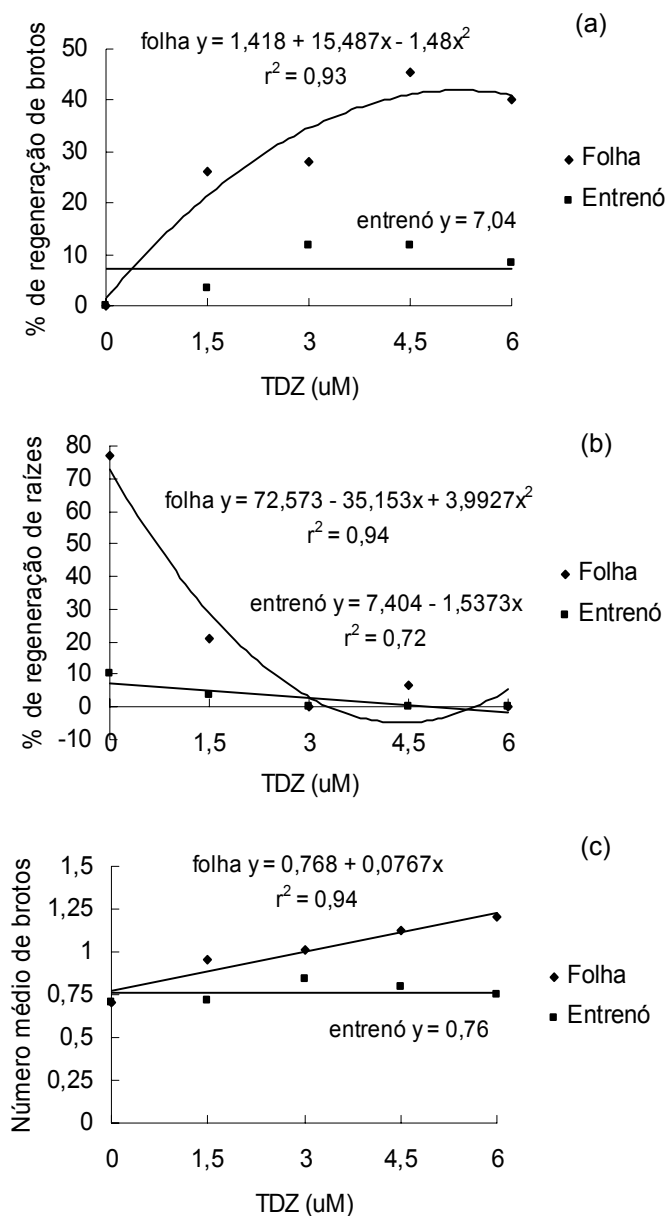


Figura 2 – Percentagem de regeneração de brotos (a), percentagem de regeneração de raízes (b) e número médio de brotos (c), em marmeleiro cvs. MC e Adams, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em função do tipo de explante e da concentração de TDZ no meio de cultura. UFPel, Pelotas, RS, 2004.

Embora não se tenha encontrado nenhum relato na literatura sobre a regeneração de raízes de marmeleiro diretamente a partir de folhas e entrenós, DOLCET-SANJUAN et al. (1991) obtiveram enraizamento de brotos do porta-enxerto de marmeleiro 'A' regenerados *in vitro*, cultivando-os durante uma semana em meio de cultura contendo 5 µM de ANA, e transferindo-os, em seguida, para meio de cultura sem auxina onde permaneceram durante quatro semanas. BAKER & BHATIA (1993) obtiveram o enraizamento de brotos de marmeleiro regenerados *in vitro*, cultivando-os em meio MS

reduzido a 50% de sua concentração original e adicionado de 10 µM de ANA.

A intensidade de formação de calo (Figura 3b) aumentou com a concentração de TDZ no meio de cultura até determinado ponto, onde a máxima intensidade de calo nas folhas (nota de 1,25, sendo, 1 = baixa e 2 = média intensidade de calo, conforme padrão apresentado na Figura 1a) de ambas as cultivares ('MC' e 'Adams'), ocorreu com 5,41 µM e 4,24 µM de TDZ, respectivamente, para cada cultivar. Com o entrenó, a máxima intensidade de calo foi de 1,5 para 'MC' e de 1,48 para 'Adams', com 4,05 µM e 3,99 µM de TDZ no meio de cultura. O TDZ, segundo HUETTEMAN & PREECE (1993), é uma potente substância com efeito de citocinina para estimular a formação de calos em explantes lenhosos, especialmente quando usado em concentração igual ou maior que 1 µM.

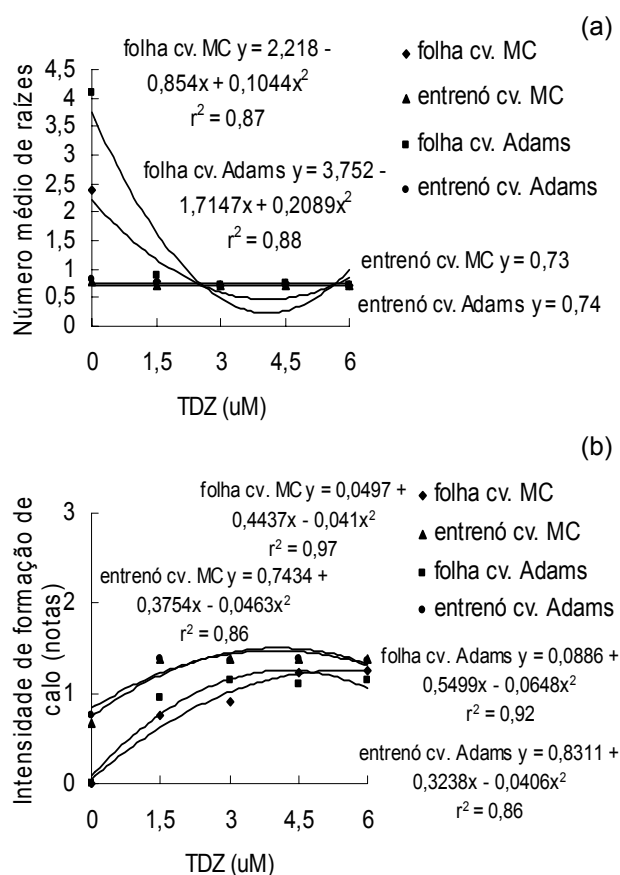


Figura 3 – Número médio de raízes (a) e intensidade de formação de calo (b), em marmeleiro cvs. MC e Adams aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em função da cultivar, do tipo de explante e da concentração de TDZ no meio de cultura. UFPel, Pelotas, RS, 2004.

O crescimento de calos é desejável quando se tem por objetivo induzir a variação somaclonal ou estudos fisiológicos, principalmente, quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular (LAMEIRA et al., 1997). Porém, na organogênese de brotações, a regeneração direta (sem uma fase

intermediária de calo) é a mais aconselhável, tendo em vista que a fase de calo aumenta o tempo necessário para que o processo de regeneração ocorra e a incidência de variação somaclonal (TAO et al., 1997), além de dificultar a seleção de células transformadas no processo de transformação, favorecendo a formação de escapes.

Na ausência de TDZ no meio de cultura, isto é, no meio adicionado apenas de ANA (2  $\mu$ M), a intensidade de formação de calo na folha foi praticamente nula em ambas as cultivares (Figura 3b), enquanto que nos entrenós cultivados em meio de mesma constituição, houve formação de calo. Isto indica que a formação de calo nas folhas destas cultivares ('MC' e 'Adams') é dependente de auxina e citocinina, enquanto que no entrenó, é dependente apenas de auxina. Segundo YEOMAN (1970), o crescimento de calo em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina, dependente de auxina ou de citocinina, ou dependente de ambas. De acordo com o mesmo autor, certos tecidos mostram uma total dependência da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam.

## CONCLUSÕES

A regeneração *in vitro* de brotos adventícios de marmeleiro das cultivares MC e Adams foi favorecida pelo uso da folha como explante, e pela adição de 4,5  $\mu$ M de TDZ ao meio de cultura. O mesmo explante, quando cultivado em meio de cultura adicionado de 2  $\mu$ M de ANA em ausência de TDZ, apresentou regeneração de raízes.

## ABSTRACT

The quince (*Cydonia oblonga* Mill.) has been used in many countries, as rootstock of the pear tree, with the objective of obtaining plant of small load and fast fruit production, besides providing uniformity to the orchards. With the objective of determining the explant type and the thidiazuron concentration (TDZ), to be used with the naphthaleneacetic acid (NAA) in the culture medium, which favors the *in vitro* regeneration of quince adventitious shoots cvs. MC and Adams, this work was accomplished. The treatments consisted of two quince cultivars ('MC' and 'Adams'), two explant types (leaf and entrenode) and five TDZ concentrations in the culture medium (0, 1.5, 3, 4.5 and 6  $\mu$ M), in the completely randomized experimental design in factorial outline 2 x 2 x 5, with four repetitions for treatment. The culture medium used was constituted of MS salts and vitamins, supplemented with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar (6 g L<sup>-1</sup>), NAA (2  $\mu$ M) and TDZ. At 45 days after the beginning of the treatments were evaluated the regeneration percentage of shoots and roots, the mean number of shoots and roots, and the intensity of callus formation. It was verified that, the *in vitro* regeneration of quince adventitious shoots cvs. MC and Adams was favored by the use of the leaf as explant, and for the addition of 4.5  $\mu$ M of TDZ to the culture medium. The same explant, when cultivated in culture medium supplemented with 2  $\mu$ M of NAA in absence of TDZ, presented root regeneration.

Key words: organogenesis; thidiazuron; plant growth regulators; explant type; rootstock.

## REFERÊNCIAS

BAKER, B.S.; BHATIA, S.K. Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.35, p.273-277, 1993.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa - CNPH, 1999. v.2, p.679-735.

CARPUTO, D.; CARDI, T.; CHIARI, T. et al. Tissue culture response in various wild and cultivated *Solanum* germplasm accessions for exploitation in potato breeding. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.1, p.151-158, 1995.

DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I. et al. *Agrobacterium* - mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v.15, p.549-554, 1996.

DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Reports**, New York, v.10, p.240-242, 1991.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.443-448, 2003.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa - CNPH, 1990. p.203-212.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

IBRAHIM, R.; DEBERGH, P.C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.88, p.41-57, 2001.

JIHYAE, J.; BYEONGWOO, Y.; MIHEE, Y. et al. Influence of cultivar, light condition and pre-treatment on adventitious shoot regeneration from leaves, internodes and petioles of *Malus domestica in vitro*. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Korea Republic, v.37, n.5, p.700-703, 1996.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G. et al. Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.47-49, 1997.

LANE, W.D.; IKETANI, H.; HAYASHI, T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.54, p.9-14, 1998.

LEITE, G.B. O uso do marmeleiro como porta-enxerto de pereira. **HortiSul**, Pelotas, v.2, n.4, p.28-32, 1992.

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

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA, J.; VANOOSTENDE, A. et al. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Calcutta, v.158, p.61-70, 2000.

PREVIATI, A.; DA RE, F.; BASSI, D. et al. Development of protocols for *in vitro* rooting of advanced selections of *Pyrus communis* rootstocks. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.596, p.485-486, 2002.

- RAO, C.D.; GOH, C.J.; KUMAR, P.P. High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Pawlonia* spp. cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v.16, p.204-209, 1996.
- SARWAR, M.; SKIRVIN, R.M. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus x domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, p.95-100, 1997.
- SCHUCH, M.W.; PETERS, J.A. Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Gala. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.301-305, 2002.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v.11, p.118-131, 1957.
- TAO, R.; DANDEKAR, A.M.; URATSU, S.L. et al. Engineering genetic resistance against insects in Japanese Persimmon using the cryIA<sup>+</sup> gene of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.122, n.6, p.764-771, 1997.
- YANCHEVA, S.D.; GOLUBOWICZ, S.; FISHER, E. et al. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. **Plant Science**, Limerick, v.165, p.299-309, 2003.
- YEOMAN, M.M. Early development in callus culture. **International Review of Cytology**, New York, v.29, p.383-409, 1970.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Registrado na SEI – Secretaria Especial de Informática, sob n°. 066.060, Categoria A. Pelotas, 1984.