

RESPOSTA DIFERENCIAL AO USO DO THIDIAZURON NA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE MARMELEIROS, CVS. ADAMS E MC

DIFERENCIAL RESPONSE TO THE USE OF THIDIAZURON IN VITRO REGENERATION OF QUINCES, CVS. ADAMS AND MC

Ilda Mariclei de Castro da Silva¹; José Antonio Peters²; Eugenia Jacira Bolacel Braga²; Valmor João Bianchi².

RESUMO

A regeneração ou morfogênese *in vitro* consiste no processo de formação de novos órgãos, a partir de diferentes tipos de tecidos ou células, sendo um pré-requisito para estudos de transformação genética. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a regeneração *in vitro* de porta-enxertos de marmeleiros (*Cydonia oblonga* Mill.), cultivares Adams e MC. Como explantes foram utilizadas folhas inteiras e seccionadas, com ou sem pecíolo, oriundas de brotações cultivadas *in vitro*, as quais foram inoculadas por 40 dias no escuro, em meio de cultivo MS suplementado com TDZ (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg dm⁻³ no primeiro experimento e 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg dm⁻³ no segundo experimento) e ANA (0,1 mg dm⁻³). Posteriormente, os explantes foram transferidos para o mesmo meio básico contendo 1,0 mg dm⁻³ de TDZ e mantidos na luz por 30 dias. Após esse período, avaliou-se a porcentagem de explantes regenerantes e o número de brotações por explante. As duas cultivares estudadas apresentam potencial para a regeneração *in vitro*, porém MC mostrou-se mais responsiva, com valores aproximados de 26% de explantes regenerantes quando cultivada em meio contendo 1,0 mg dm⁻³ de TDZ e 0,1 mg dm⁻³ de ANA. Para ambas cultivares, os explantes constituídos por folhas inteiras foram mais responsivos à regeneração do que os caracterizados por folhas seccionadas, ocorrendo à formação das brotações principalmente na região basal dos explantes, via organogênese direta ou indireta.

Palavras-chave: *Cydonia* sp., porta-enxerto; organogênese; cultura de tecidos vegetais, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

Regeneration or *in vitro* morphogenesis it is a process of organs induction, from different types of

tissues or cells, which is a pre-requirement for genetic transformation. The current work aimed to optimize *in vitro* regeneration of quinces (*Cydonia oblonga* Mill.) rootstocks, cultivars Adams and MC. It was used as initial explants whole leaves or sectioned leaves, with or without petiole, derived from shoots grown *in vitro*, which were inoculated for 40 days on the dark in MS culture medium, supplemented with TDZ (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg dm⁻³ the first experiment and 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 and 4,0 mg dm⁻³ in the second experiment) and ANA (0,1 mg dm⁻³). Thereafter, it was transferred to MS medium containing 1,0 mg dm⁻³ TDZ and maintained on the light during 30 days. After that period, the percentage of regenerate explants and the shoots number for regenerate explant was evaluated. The two cultivars present potential for *in vitro* regeneration, however 'MC' showed to be more responsive, with values ~ 26% of regenerating explants when it was cultured in medium containing 1 mg dm⁻³ of TDZ and 0,1 mg dm⁻³ of ANA. For both cultivars, the explants composed of whole leaves were more active to the regeneration of sectioned leaves, shoots formation occurs mainly in the basal region of the explants via organogenesis directly or indirectly.

Key words: *Cydonia* sp., rootstock; organogenesis; plant tissue culture, plant growth regulators.

INTRODUÇÃO

Nos principais países produtores de pera (*Pyrus* spp.), o marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) vem sendo utilizado como porta-enxerto para essa cultura visando à obtenção de plantas com porte reduzido, permitindo assim melhor manejo, redução do tempo para entrada em frutificação (PREVIATI et al., 2002) e maior uniformidade dos pomares (LEITE, 1992). Além destas características, de acordo HARTMANN et al. (2002), o porta-enxerto é de fundamental importância na formação de uma muda frutífera, pois pode interferir na quantidade e na qualidade da produção, no período de

¹ Msc. e Doutoranda em Fisiologia Vegetal, PPGFV – Departamento de Botânica – Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Campus Universitário, s/n, CP 354, 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil. E-mail: ildamcastro@hotmail.com.

² Prof. Dr. PPGFV – Departamento de Botânica – Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – RS. Apoio financeiro: CAPES.

(Recebido para Publicação em 16/09/2011, Aprovado em 24/04/2012)

colheita dos frutos, na resistência a inúmeras pragas e doenças do solo, bem como na capacidade de adaptação da planta a condições edafoclimáticas desfavoráveis.

Atualmente, no Brasil, embora exista um grande interesse pelo uso de porta-enxertos de marmeleiro para a cultura da pereira, a maioria dos genótipos utilizados para esta finalidade foi introduzido de outros países, devido à carência de trabalhos de melhoramento que busquem selecionar novos genótipos adaptados às condições de clima e solo do país (OLIVEIRA et al., 2010). Uma das formas de contornar esse problema, de falta de germoplasma para o melhoramento, é pela indução de variabilidade somaclonal ou pela transformação genética para características de interesse.

A cultura de tecidos de plantas é uma técnica biotecnológica que apresenta inúmeras aplicações práticas, como a produção em larga escala de genótipos superiores livres de pragas e doenças (ZIMMERMANN & FORDHAM, 1985), bem como o aumento da variabilidade genética de uma determinada espécie (D'ONOFRIO & MORINI, 2006; SILVA, 2009), recuperação de híbridos interespecíficos e intergenéricos (CARVALHO & ARAÚJO, 2007), conservação de germoplasma e obtenção de plantas geneticamente modificadas (CARVALHO et al., 2008).

A morfogênese *in vitro*, caracterizada pela emergência e formação de novos órgãos, resulta da interação de processos de indução, competência, determinação e diferenciação celular, os quais são influenciados pelo genótipo, tipo e condições fisiológicas dos explantes, bem como da composição do meio de cultivo *in vitro* (LIU & PIJUT, 2008). Desta maneira, quando se busca a regeneração de tecidos ou de plantas inteiras, quer seja por organogênese ou embriogênese, é necessária a adequação de protocolos específicos para cada material vegetal de interesse (D'ONOFRIO & MORINI, 2006). No caso do marmeleiro, o efeito dessa variabilidade de fatores pode ser observado nos trabalhos desenvolvidos por DOLCET-SANJUAN et al. (1991); BAKER & BHATIA (1993); D'ONOFRIO & MORINI (2003/4); D'ONOFRIO & MORINI (2005); STANIENE & STANYS (2004); ERIG & SCHUCH (2005) e MINGOZZI & MORINI (2009).

Na regeneração de plantas lenhosas, geralmente os explantes mais utilizados são folhas e entrenós de plantas desenvolvidas *in vitro* (PÉREZ-TORNERO et al. 2000; CASSANA et al., 2007). Diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* são encontradas ao se variar o tipo de explante e a composição nutricional do meio de cultura. Contudo, os componentes mais otimizados no meio de cultivo são os fitorreguladores, particularmente o balanço auxina/citocinina (ERIG & SCHUCH, 2005). Neste sentido, o thidiazuron (TDZ) é um composto do grupo das feniluréias com atividade de citocinina, que pode

ser utilizado com sucesso na regeneração de plantas lenhosas (CHEVREAU et al., 1989).

Quando se busca fazer o melhoramento genético por métodos não sexuais, seja pela indução de variação somaclonal ou pela transformação genética, a eficiência do sistema de cultura de tecidos *in vitro* é indispensável, pois um dos pré-requisitos é o estabelecimento de um protocolo eficiente para obter organogênese, de modo que as células ou tecidos regenerem novas plantas (SARWAR & SKIRVIN, 1997; YANCHEVA et al., 2003; RAO et al., 1996).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a resposta regenerativa dos porta-enxertos de *C. oblonga*, cvs. Adams e MC, em relação ao uso de diferentes concentrações de TDZ e tamanho do explante foliar.

MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes foliares utilizados nos experimentos de regeneração foram provenientes de brotações de porta-enxertos de *C. oblonga*, cultivares Adams e MC, multiplicadas *in vitro* durante 40 dias em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado (contendo EDTA-Férrico e $\frac{3}{4}$ da concentração normal de NH_4NO_3 e KNO_3), suplementado com $0,6 \text{ mg dm}^{-3}$ de BAP (6-benzilaminopurina).

A fase de indução da regeneração foi conduzida em dois experimentos, cada um com diferentes ensaios, os quais foram caracterizados pela variação na concentração de TDZ, e utilização de folhas com diferentes tamanhos como explante.

As folhas utilizadas foram escarificadas no limbo e na nervura central, inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultivo, em placas de Petri contendo meio MS, suplementado com TDZ e ANA (ácido naftaleno acético) ($0,1 \text{ mg dm}^{-3}$), mio-inositol (100 mg dm^{-3}), sacarose (30 g dm^{-3}), Gelrite como gelificante ($1,8 \text{ g dm}^{-3}$) e pH ajustado para 5,8. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo no escuro por 40 dias.

No primeiro experimento de indução as concentrações de TDZ utilizadas foram 0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e $0,8 \text{ mg dm}^{-3}$, sendo os explantes constituídos por folhas inteiras, com pecíolo. Em paralelo a este, também foi realizado um ensaio complementar contendo terços basais de folhas, com pecíolo, da cultivar Adams.

No segundo experimento de indução utilizou-se concentrações mais altas de TDZ: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg dm}^{-3}$, sendo os ensaios constituídos por folhas inteiras sem pecíolo (ensaio 1), folhas inteiras com pecíolo (ensaio 2) e terços basais de folhas com pecíolo (ensaio 3); os demais componentes do meio foram iguais aos adotados no primeiro experimento.

Para a fase de expressão da regeneração, os explantes foram transferidos para meio de cultivo MS

contendo 1,0 mg dm⁻³ de TDZ e colocados na luz (48 µmol m⁻² s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons e fotoperíodo de 16 horas), em ambos ensaios dos dois experimentos, onde foram mantidos por mais 30 dias. Após esse período avaliou-se a percentagem de explantes regenerados, número de brotações por explante regenerante e tipo de organogênese. Gemas e brotações incipientes, menores que três milímetros, não foram consideradas por serem muito pequenas e de difícil manuseio.

Os experimentos foram conduzidos com delineamento inteiramente casualizado, seguindo um arranjo bifatorial composto pelos fatores cultivar (MC e Adams) e concentrações de TDZ, com três repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma placa contendo 10 explantes. Realizou-se a análise de variância dos dados, e as médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de

Tukey a 5% de probabilidade de erro, ou analisadas por regressão polinomial, utilizando o Software Sanest (ZONTA & MACHADO, 1984). Os dados do número de brotações por explante regenerado foram transformados segundo $(x+0,5)^{1/2}$, e os dados expressos em percentagem foram transformados em arco seno de $(x/100)^{1/2}$, onde x é o número obtido. Para a variável tipo de organogênese formada foi realizada apenas a análise descritiva.

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise de variância, onde é possível observar que nos experimentos 1 e 4 o fator cultivar foi excluído da análise devido a não ocorrência de regeneração para a cultivar Adams.

Tabela 1 – Análise de variância e testes de significância para a variável explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante em *C. oblonga*, submetidos a diferentes concentrações de TDZ.

Causas da variação	GL	Explantes regenerados (%)	Número de brotações
Quadrados médios A			
TDZ	4	188,187 ^{ns}	0,085 ^{ns}
Resíduo	10	94,093	0,078
Média geral		5,313 ^{***}	1,122 ^{**}
CV (%)		182,574	24,911
Quadrados médios B			
CULTIV. (A)	1	1339,373 *	0,547*
TDZ (B)	4	261,007*	0,547*
A x B	4	143,294*	0,381*
Resíduo	10	2,419	0,034
Média geral		11,715 ^{***}	1,430 ^{**}
CV (%)		13,276	12,970
Quadrados médios C			
CULTIV. (A)	1	185,274 *	0,038 ^{ns}
TDZ (B)	4	274,791*	0,476*
A x B	4	15,139 ^{ns}	0,023 ^{ns}
Resíduo	10	31,205	0,049
Média geral		10,527 ^{***}	1,405 ^{**}
CV (%)		53,064	15,766
Quadrados médios D			
TDZ	4	16,992 ^{ns}	0,050 ^{ns}
Resíduo	15	16,992	0,050
Média geral		0,922 ^{***}	1,050 ^{**}
CV (%)		447,214	21,296

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Médias transformadas para raiz de (X+1)

***Médias transformadas para arco seno da raiz quadrada de (X/100)

^{ns} Não significativo

Quadrados médios A e D – cultivar MC

Quadrados médios B e C – cultivares Adams e MC

No primeiro experimento não se verificou interação entre fatores, sendo que a cultivar Adams não apresentou capacidade regenerativa, enquanto que a cultivar MC apresentou 6,67% de explantes regenerados na concentração de 0,6 mg dm⁻³ e 13,33% de explantes regenerados com 0,8 mg dm⁻³ de TDZ, não ocorrendo regeneração nas concentrações inferiores e obtendo-se, assim, uma média de apenas

5,31% de explantes regenerantes e 1,12 brotações por explante (Tabela 1A).

Ao avaliar o local de regeneração nos explantes, verificou-se que 33,33% das estruturas organogênicas se desenvolveram a partir de calos na base do explante, e os demais por organogênese direta, formadas a partir da nervura central (Figura 1A) ou das escarificações no limbo (Figura 1B).

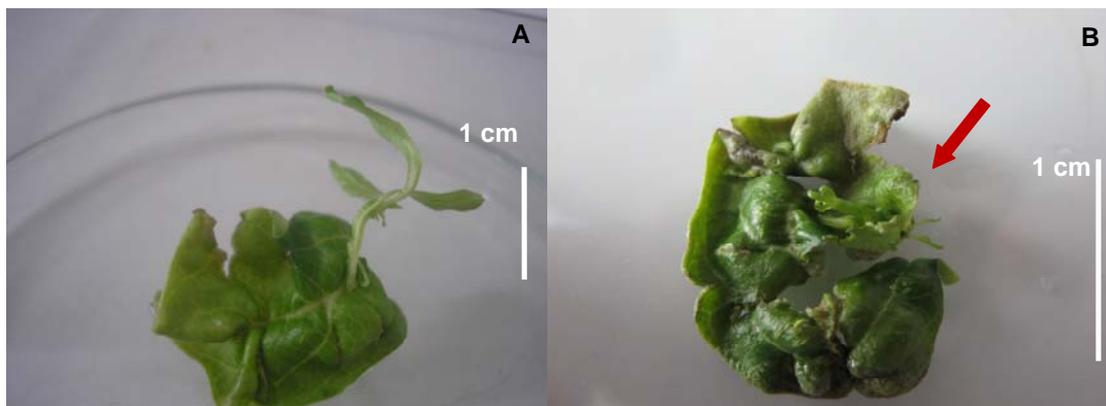


Figura 1 – Brotações regeneradas de *C. oblonga*, cv. MC, desenvolvidas a partir da nervura central aos 50 dias de cultivo (A) e das escarificações no limbo aos 70 dias de cultivo (B).

Conforme já citado no material e métodos, em paralelo a este experimento, foi realizado um ensaio complementar contendo terços basais de folhas, com pecíolo, da cultivar Adams, porém não foram obtidos explantes regenerantes e não se observou a formação de calos (resultados não apresentados).

O segundo experimento foi realizado buscando investigar se as cultivares em estudo apresentaram maior capacidade responsiva à regeneração. Quando o efeito de concentrações mais altas de TDZ e folhas inteiras sem pecíolo foram avaliadas (ensaio 1), verificou-se interação entre os fatores para as variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante (Tabela 1B). Para a cultivar Adams, somente obteve-se explantes regenerados (9,5%) na concentração de $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$ de TDZ, portanto optou-se por não apresentar a curva de tendência na figura 2A, enquanto que na cultivar MC obteve-se 26% de explantes regenerados na concentração de $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ de TDZ, porém observou-se uma resposta quadrática, com ponto de máxima na concentração de $2,17 \text{ mg dm}^{-3}$, com 22,08% de explantes com capacidade organogênica (Figura 2A).

Em relação ao número de brotações por explante regenerante, Adams apresentou uma média de 4,5 brotações na concentração de $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$ de TDZ, enquanto que para MC a resposta foi quadrática, com ponto de máxima na concentração de $2,8 \text{ mg dm}^{-3}$, com 2,31 brotações por explante (Figura 2B).

Verificou-se que na cultivar Adams, em 66,67% dos explantes a regeneração se deu de forma direta e o restante a partir da formação de calos, ou seja, de forma indireta. Para o porta-enxerto MC, 59,09% das estruturas organogênicas se desenvolveram sem formação de calos (Figura 3A) e 40,91% desenvolvidos a partir deles (Figura 3B), porém independente da cultivar e do tipo de regeneração obtida, todas as brotações se formaram na porção basal dos explantes.

Ao utilizar folhas inteiras com pecíolo (ensaio 2), não se verificou interação entre os fatores cultivar e concentração de TDZ para as variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante (Tabela 1C). Entretanto, ocorreu um efeito linear crescente à percentagem de explantes regenerados e número de brotações com o incremento na concentração de TDZ no meio de cultivo, obtendo-se valores máximos de 10% de explantes regenerados (Figura 2C) e 2,25 brotações por explante regenerante (Figura 2D), quando se utilizou $4,0 \text{ mg dm}^{-3}$ deste regulador de crescimento.

Comparando a capacidade organogênica das duas cultivares, verificou-se que 100% e 75% das brotações ocorreram de forma direta e na base do explante para Adams e MC, respectivamente. Das brotações regeneradas de forma indireta em MC (25%), 16,67% desse total tiveram origem na base foliar e o restante a partir de pontos de escarificação do limbo.

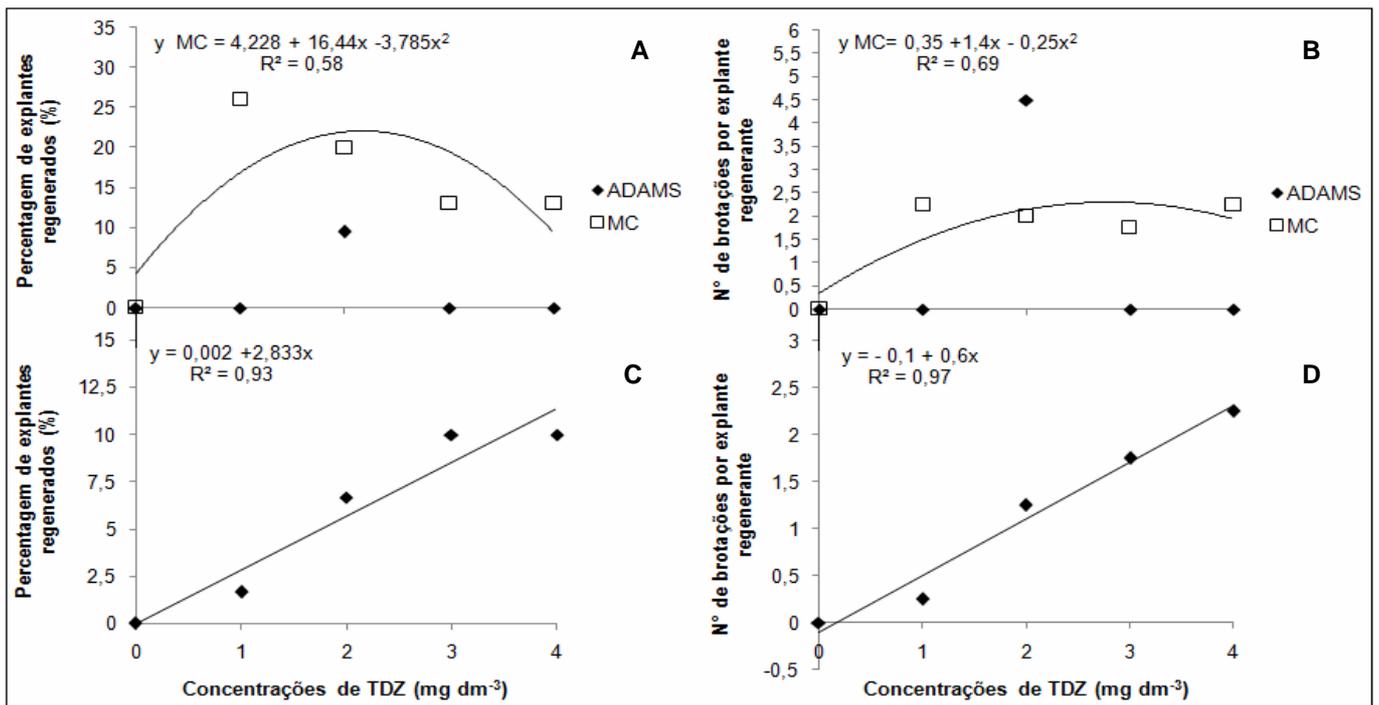


Figura 2 – Percentagem de explantes regenerados (A e C) e número de brotações por explante regenerante (B e D), obtidos na regeneração *in vitro* de *C. oblonga*, cvs. Adams e MC, sob diferentes concentrações de TDZ e 0,1mg dm⁻³ de ANA.

Quando terços basais de folhas com pecíolo foram utilizados como explantes (ensaio 3), não se verificou desenvolvimento de estruturas organogênicas no porta-enxerto Adams, enquanto que para o porta-enxerto MC se obteve regeneração de apenas 0,5% de explantes foliares na concentração de 3,0 mg dm⁻³ de TDZ. Não foi constatado efeito das concentrações de

TDZ para as variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante (Tabela 1D). Observou-se que a cv. Adams apresentou somente formação de calos não friáveis (Figura 3C), e a cv. MC organogênese indireta, oriunda da base do explante foliar (Figura 3D).

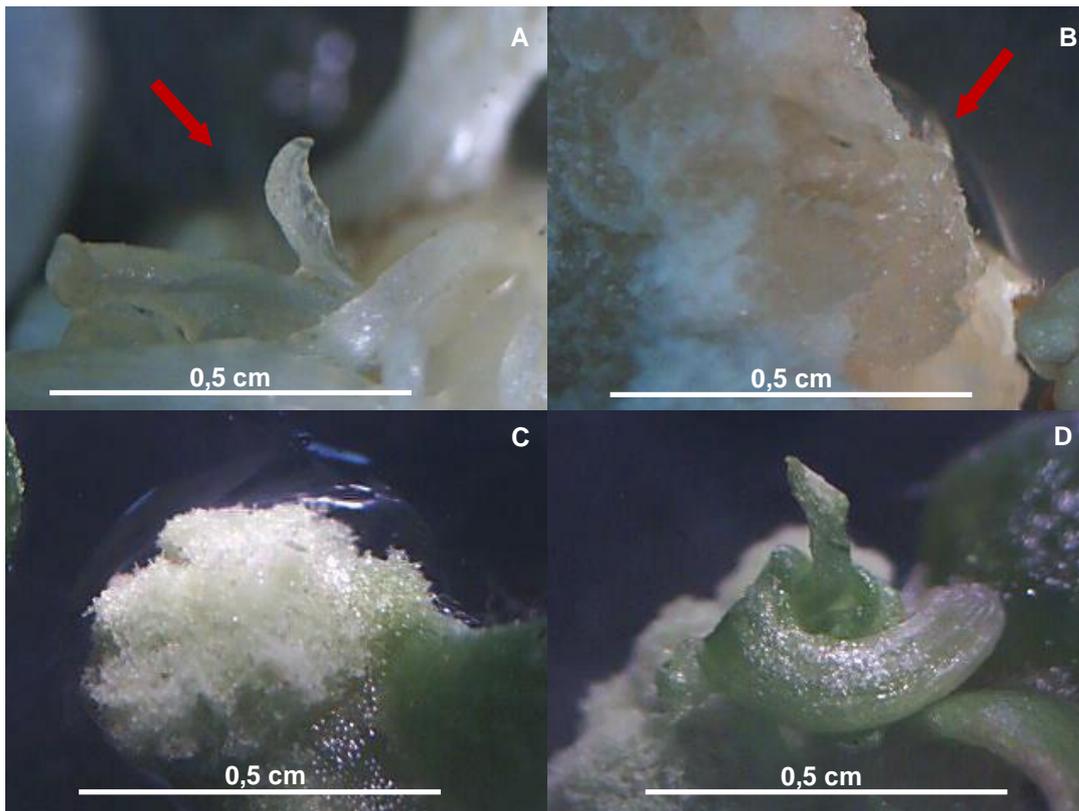


Figura 3 – Organogênese direta (A) e indireta (B) aos 40 dias de cultivo em *C. oblonga*, cultivar MC (Ensaio 1). Formação de calos não friáveis na base de explantes foliares da cv. Adams (C) e organogênese indireta na base de explantes da cv. MC (D), aos 60 dias de cultivo (Ensaio 3).

DISCUSSÃO

Conforme RAO et al., (1996), a morfogênese pode ser influenciada por vários fatores, dentre eles a espécie, cultivar, tipo de explante e reguladores de crescimento, o que pode ser evidenciado neste trabalho, pois a cultivar MC mostrou-se mais responsiva à regeneração *in vitro* do que a Adams.

O efeito do genótipo na taxa de regeneração a partir de folhas de marmeleiro já havia sido observado por STANIENE & STANYS (2004), os quais obtiveram 43,8% e 35% de regeneração, usando 2,2 mg dm⁻³ de TDZ, nas cvs. K11 e K16, respectivamente, enquanto que com a cv. K19 conseguiram 33,3% de explantes regenerados, com o uso de 7,05 mg dm⁻³ de TDZ; assim como DOLCET-SANJUAN et al. (1991), que obtiveram 48% de regeneração na cv. A, utilizando meio de cultura suplementando 7,05 mg dm⁻³ de TDZ e 0,55 mg dm⁻³ de ANA.

D'ONOFRIO & MORINI (2005) obtiveram 100% de regeneração com a cv. BA 29 utilizando 1,0 mg dm⁻³ de TDZ e 0,1 mg dm⁻³ de ANA. Desta forma, é possível afirmar que o potencial genético de cada cultivar é um dos fatores decisivos no sucesso da multiplicação e da regeneração, tornando necessário o

estudo individualizado para cada cultivar, conforme preconizado por PÉREZ-TORNERO et al. (2000).

Com base nos dados obtidos nesta avaliação e em estudos anteriores (DE BONDT et al., 1996; SCHUCH & PETERS, 2002; ERIG & SCHUCH, 2005) é possível afirmar que além da espécie e/ou cultivar, o uso e a otimização da concentração do regulador de crescimento é muito importante, sendo que o TDZ tem se mostrado efetivo na indução da regeneração *in vitro*. Este regulador de crescimento tem sido muito utilizado para induzir a formação de brotações e calos em várias espécies de plantas, especialmente nas lenhosas, mostrando-se mais eficiente que outros tipos de citocinina, como BAP e Cinetina (KIN) (HUETTEMAN & PREECE, 1993; NAYAK et al., 1997).

A concentração de citocinina é um dos principais fatores que afetam a morfogênese, e sua influência varia de acordo com o genótipo de cada espécie em estudo (YEPES & ALDWINCKLE, 1994). Nesta avaliação, o melhor resultado obtido foi com 1,0 mg dm⁻³ de TDZ e 0,1 mg dm⁻³ de ANA (26% de regeneração, cv. MC) (Figura 2A). Estes resultados diferem do observado por BAKER & BHATIA (1993), que obtiveram as melhores taxas de regeneração com 0,33 mg dm⁻³ de TDZ e 0,46 mg dm⁻³ de ANA, em discos foliares do marmeleiro 'A'.

Em relação ao tamanho dos explantes, foi observado que folhas inteiras apresentaram maior capacidade organogênica do que terços basais foliares, o que, possivelmente, pode estar relacionado à quantidade de nutrientes e reguladores de crescimento disponíveis no explante para desencadear a organogênese, uma vez que, segundo GUERRA et al. (1999), a interação entre os reguladores de crescimento, o explante e os demais constituintes do meio cultivo determinam a morfogênese do tecido, conduzindo a uma organogênese que pode ser tanto direta como indireta.

Segundo THORPE et al. (1991), a regeneração direta e indireta são duas estratégias básicas utilizadas para micropropagação de espécies lenhosas, sendo que a regeneração direta é a mais aconselhável (Figura 1A, 1B e 3A), pois envolve morfogênese sem uma fase intermediária de calo. Além disso, está claro que sistemas de regeneração indiretos podem ser uma fonte de variação somaclonal (ARENE et al., 1993; SOUQ et al., 1996; TZIFIRA et al., 1997), e quando o objetivo é a transformação genética, a regeneração direta é preferível, a fim de evitar variação genética.

CONCLUSÃO

O porta-enxerto de marmeleiro da cultivar MC foi mais responsivo à regeneração do que Adams na presença de TDZ.

O explante folha inteira foi mais responsivo à regeneração em relação ao uso de terços basais.

A regeneração, em ambas cultivares MC e Adams, ocorreu principalmente na região basal do explante tipo folha, tanto via organogênese direta como indireta.

A regeneração *in vitro* da cultivar MC foi potencializada com a utilização de 1,0 mg dm⁻³ de TDZ e 0,1 mg dm⁻³ de ANA no meio de indução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENE, L.; PELLEGRINO, C.; GUDIN, S. A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv. Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. **Euphytica**, Wageningen, v.71, p.83-90, 1993.

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.

CARVALHO, J.M.F.C.; ARAÚJO, S.S. **Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico ou Imaturo no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 36 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 170).

CARVALHO, J.M.F.C.; ARAÚJO, S.S.; SILVA, M.A. **Preservação e Intercâmbio de Germoplasma**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 26 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 196).

CASSANA, F. F.; PINTO, L. da S.; POHL, S.; et al. Regeneração de brotos a partir de folhas de Mirtilo cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.870-872, 2007.

CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R. M.; ABU-QAOUD, H. A.; et al. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars *in vitro*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.7, p.688-691, 1989.

DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I.; et al. Agrobacterium-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): and assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, 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**, Berlin, v.10, p.240-242, 1991.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Simultaneous regeneration of different morphogenic structures from quince leaves as affected by growth regulator combination and treatment length. **Biologia Plantarum**, Prague, v.47, n.3, p.321-325, 2003/4.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Development of adventitious shoots from *in vitro* grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration. **Biologia Plantarum**, Prague, v.49, n.1, p.17-21, 2005.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 107, p.194-199, 2006.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Regeneração *in vitro* de brotos e raízes adventícias de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cvs. MC e ADAMS, utilizados como porta-enxertos para a pereira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.4, p.419-424, 2005.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: SPI / Embrapa – CNPH, v.2, 1999. p.533-568.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES Jr., F. T.; et al. **Plant propagation; principles and practices**. 6ª ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 770 p.

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.

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

LIU, X.; PIJUT, P.M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hangué, v. 94, p.113-123, 2008.

MINGOZZI, M.; MORINI, S. *In vitro* cultivation of donor quince shoots affects subsequent morphogenesis in leaf explants. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.53, p.141-144, 2009.

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

NAYAK, N. R.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Direct shoot regeneration from foliar explants of and epiphytic orchid, *Acampe traemorsa* (Roxb) Blatter and McCann. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, p.583-586, 1997.

OLIVEIRA, P.R.D.; RITSCHER, P.S.; LEITE, G.B.; et al. Projetos de Pesquisa em Melhoramento Genético da Pereira. In: III Reunião Técnica da Cultura da Pereira, 3, 2010, Lages. **Anais...** Lages, SC. p.46-55.

PÉREZ-TORNERO, O. P.; EGEA, J.; VANOOSTENDE, A.; et al. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Espanha, 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**, Berlin, 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.

SILVA, C. P. **Variabilidade genética induzida por radiação gama em pereira cultivada *in vitro***. Pelotas, 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas.

SOUQ, F.; COUTOS-THEVENOT, P.; YEAN, H.; et al. Genetic transformation of roses, two examples: One on morphogenesis, the other on anthocyanin biosynthetic pathway. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.424, p.381-388, 1996.

STANIENE, G.; STANYS, V. Plant regeneration from leaves of *Cydonia oblonga* cultivars. **Acta Universitatis Latviensis, Biology**, Latvia, v.676, p.231-233, 2004.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERG, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (eds.) **Micropropagation, technology and application**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-336.

TZFIRA, T.; JENSEN, C. S.; VAINSTEIN, A.; et al. Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.99, p.554-561, 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.

YEPES, L. M.; ALDWINCKLE, H. S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hangué, v.37, n.3, p.257-269, 1994.

ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting Apple cultivars *in vitro*. **Jornaul of America Society for Horticulturae Science**, Alexandria, v.110, n.1, p.34-38, 1985.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST – Sistema de Análise para microcomputadores**. Pelotas: UFPel, 1984. 75 p.