

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



DISSERTAÇÃO

**Multiplicação e regeneração *in vitro* de marmeleiro,
cvs. Adams e MC.**

ILDA MARICLEI DE CASTRO DA SILVA

Pelotas, 2010

ILDA MARICLEI DE CASTRO DA SILVA

**Multiplicação e regeneração *in vitro* de marmeleiro,
cvs. Adams e MC.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Valmor João Bianchi, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Co-orientadores: Prof. Dr. José Antonio Peters

Profa. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586m Silva, Ilda Mariclei de Castro da
 Multiplicação e regeneração *in vitro* de marmeleiro, cv.
 Adams e MC / Ilda Mariclei de Castro da Silva ; orientador
 Valmor João Bianchi ; co-orientador José Antonio Peters e
 Eugenia Jacira Bolacel Braga. – Pelotas, 2010. – 78f. ; il. –
 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fi-
 siologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal
 de Pelotas. Pelotas, 2010.

 1.Fisiologia vegetal. 2.Marmeleiro. 3.*Cydonia oblonga*
 Mill.. 4.Organogênese. 5.Cultivo *in vitro*. 5.Reguladores de
 crescimento. I.Bianchi, Valmor João. II.Peters, Jose Antonio.
 III.Braga, Eugenia Jacira Bolacel. IV.Título.

CDD: 634.14

ILDA MARICLEI DE CASTRO DA SILVA

Banca examinadora:

Dr. Leonardo Ferreira Dutra
Embrapa Clima Temperado

Dra. Elizete Beatriz Radmann
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Valmor João Bianchi
Orientador

Aos meus pais Nelson Alves da Silva e

Maria José Teixeira de Castro;

E aos meus avós

Marcos Rodrigues de Castro (In Memoriam) e

Ilda Teixeira de Castro,

Com carinho,

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, dar forças, coragem, capacidade de lutar.

À Universidade Federal de Pelotas, em particular, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela acolhida e oportunidade.

Ao Professor Valmor João Bianchi, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, carisma, incentivo, amizade.

Ao Professor José Antonio Peters, pela acolhida, co-orientação, ensinamentos, confiança, apoio, carinho, por ser um grande 'pai' e amigo.

À Professora Eugenia Jacira Bolacel Braga, pela co-orientação, sugestões, incentivo, carinho, simpatia.

Ao Professor Mario Ariel Posada, pelo incentivo e ajuda.

Ao Professor Nei Fernandes Lopes, pelos ensinamentos transmitidos e carinho.

Às minhas amigas e colegas de curso, Aline e Janieli, pela amizade, cumplicidade, companhia, estudos, conversas e risadas.

Aos colegas do Curso de Fisiologia Vegetal: Clarissa, Cristina, Mirian e Tiago, pela convivência e amizade.

Aos colegas de Laboratório: Alírcia, Andersom, Carina, Cibele, Daiane, Daniel, Isabel, Janete, Juliana, Letícia Benitez, Letícia Mascarenhas, Liane, Luciana, Márcia, Raquel, Renan, Rodrigo, Simone Wendt e Willian pela alegre convivência, amizade e carinho.

À minha querida família, que hoje reconheço que é a base, o porto seguro, o alicerce da minha vida.

À minha amada vó Ilda, pelas 'rezas', carinho, ensinamentos e confiança. Aos meus pais, Nelson e Maria José, por terem sempre uma palavra de apoio, incentivo, coragem; pelo amor imensurável, confiança, por acreditarem em mim.

À minha irmã Juliana, pelo amor, cumplicidade, amizade, estímulo, incentivo, conselhos, confiança.

Ao meu cunhado, Jiuliano pela amizade, atenção, carinho, estímulo, otimismo, por ser como um 'irmão' pra mim.

Às minhas tias, Valentina, Solaine e Isabel Cristina, pelo apoio, incentivo, amizade, carinho.

À minha prima Débora pela amizade, cumplicidade, carinho.

Ao meu sobrinho Lorenzo, por trazer muita alegria à minha vida. À minha amiga, irmã de coração, Sandra, pelo carinho, carisma, estímulo, amizade, desde sempre.

À minha amiga Raquel, pelo entusiasmo, carinho, amizade.

À minha amiga Iara, pelo otimismo, incentivo, torcida.

A todos, citados aqui ou não, de perto ou de longe, que, de alguma forma, colaboraram e apoiaram a conclusão desta etapa.

RESUMO

SILVA, I. M. de C. da. **Multiplicação e regeneração *in vitro* de marmeleiro, cultivares Adams e MC**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas/UFPel, Pelotas/RS.

Os marmeleiros (*Cydonia oblonga* Mill.) são excelente alternativa de diversificação de porta-enxertos para pereiras, devido ao interesse por plantas com porte reduzido, rápida frutificação, uniformidade nos pomares e boa qualidade das frutas. A sua propagação por meio da cultura de tecidos permite a produção de plantas homogêneas, em larga escala, com alta qualidade sanitária e num curto espaço de tempo. Outra aplicação desta técnica é a regeneração ou morfogênese *in vitro*, que consiste na formação de órgãos, seja por meio de embriogênese somática ou organogênese, sendo esta um pré-requisito para a transformação genética. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a multiplicação e regeneração *in vitro* dos porta-enxertos de *Cydonia oblonga* Mill., cultivares Adams e MC. Para os experimentos de multiplicação foram utilizadas brotações apicais com ápice excisado (1,5cm), inoculadas em meio MS^{1/2} e MS^{3/4} ou MS modificado (^{3/4} da concentração normal de NH₄NO₃ e KNO₃ e Ferro na forma de EDTA-Férrico), contendo diferentes concentrações de BAP ou interação entre BAP e AG₃, mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 48 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25±2°C de temperatura por 40 dias. Após, analisaram-se as variáveis: número de brotações por explante, comprimento das brotações, número de nós por brotação e percentagem de explantes com hiperidricidade. Nos experimentos de regeneração utilizou-se como explante inicial folhas inteiras ou terços basais, jovens ou adultas, com ou sem pecíolo, inoculados em meio MS, suplementados com TDZ (0, 1, 2, 3 e/ou 4mg dm⁻³) e ANA (0,1mg dm⁻³), permanecendo no escuro por 40 dias. Posteriormente, foram transferidos para meio MS contendo 1mg dm⁻³ de TDZ e mantidos na luz por mais 30 dias. Após esse período, avaliou-se a percentagem de explantes regenerados, o número de brotações por explante regenerante e tipo de organogênese formada. As duas cultivares estudadas apresentam potencial para a propagação *in vitro*, porém 'Adams' foi mais responsivo, pois obteve-se 6,3 brotações por explante, com 2,8mg dm⁻³ de BAP, enquanto 'MC' apresenta maior sensibilidade a altas concentrações deste regulador de crescimento e à vitrificação, porém demonstrou ser mais eficiente durante a regeneração *in vitro*, apresentando

valores aproximados de 26% de explantes regenerantes (utilizando $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ). Para ambas cultivares, o explante folha inteira é mais responsivo à regeneração do que terços basais e que esta ocorre principalmente na região basal do explante, via organogênese direta ou indireta. Baseado nos resultados obtidos tanto na fase de multiplicação quanto na de regeneração, verifica-se que é possível multiplicar *in vitro* estas cultivares em larga escala, bem como melhorar as taxas de regeneração para futuros trabalhos de melhoramento para características de interesse, via transformação genética.

Palavras-chave: *Cydonia oblonga* Mill.. Organogênese. Cultivo *in vitro*. Reguladores de crescimento.

ABSTRACT

SILVA, I. M. de C. da. **Multiplication and regeneration *in vitro* of quince, cultivars Adams and MC.** 2010. 78p. Dissertation (Masters) – Pos-Graduation Plant Physiology Program. Universidade Federal Pelotas/UFPel, Pelotas/RS.

Quinces (*Cydonia oblonga* Mill.) are good alternative for pear tree rootstock diversification, due the interest to control the plants development to obtain fast frutification, plants uniformity and higher fruit quality. Their propagation through the tissue culture allows the plant production in a large scale, with high sanitary in a short period of time. Another application of this technique is the regeneration or *in vitro* morphogenesis that consists in the organs induction by somatic embryogenesis or organogenesis, which is a pre-requirement for genetic transformation. The current work aimed at optimizing the multiplication and *in vitro* regeneration of *Cydonia oblonga* Mill. rootstocks, cultivars Adams and MC. For the multiplication experiments were used apical shoots with excised tip (1,5cm), and inoculated in MS $\frac{1}{2}$ and MS $\frac{3}{4}$ or MS medium modified ($\frac{3}{4}$ of the normal concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 and EDTA-Ferric), containing different BAP concentrations or interaction among BAP and AG_3 concentrations. The explants were maintained in growth chamber with 16h photoperiod, $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ density photon flux and $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature, for 40 days. The variables analyzed were shoots number per explants, shoots length, node number per shoot and percentage of hyperhydric shoots. In the regeneration experiments it was used as initial explants entire leaves or third basal leaves, young or adult leaves, with or without petiole, inoculated in MS medium, supplemented with TDZ (0, 1, 2, 3 and/or 4mg dm^{-3}) and ANA ($0,1 \text{mg dm}^{-3}$), maintained in darkness for 40 days. Later, they were transferred to MS medium containing 1mg dm^{-3} TDZ and maintained in the light for 30 days more. After that period, the percentage of regenerate explants, the shoots number for regenerate explant and type of organogenesis formed was evaluated. Both cultivars present potential for *in vitro* propagation, however 'Adams' is more responsive, because it was obtained 6,3 shoots per explant, with $2,8 \text{mg dm}^{-3}$ BAP, while 'MC' presents larger sensibility to this plant growth regulator and to develop the hyperhydric explants, however it demonstrated to be more efficient to the *in vitro* regeneration, presenting 26% of regenerating explants (with 1mg dm^{-3} TDZ). It was verified for both cultivars, the entire explant leaves were more responsive for the regeneration than basal thirds and that this happens mainly in the basal area of the explant, through direct and

indirect organogenesis. Based on the multiplication and the regeneration results, it was concluded that is possible the *in vitro* multiplication of these cultivars in large scale, as well as to improve the regeneration rates for future plant breeding works for characteristics of interest, through genetic transformation.

Key words: *Cydonia oblonga* Mill.. Organogenesis. *In vitro* cultivation. Plant growth regulators.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Número de brotações por explante e número de nós por brotação obtidos na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams, em meio de cultivo MS ^{3/4} e MS ^{1/2}	26
Tabela 2	Número de brotações por explante, número de nós por brotação e comprimento das brotações (cm) obtidos na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams, em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP e AG ₃	30
Tabela 3	Número de brotações por explante, número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) obtidos na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. MC, em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP e AG ₃	37
Tabela 4	Comprimento das brotações (cm) obtido na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. MC, em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP e AG ₃	39

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Plantas-matrizes de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cvs. Adams (A) e MC (B), cultivadas em casa-de-vegetação.....	21
Figura 2	Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cvs. Adams e MC, durante a inoculação (A e B) e após 35 dias de cultivo na luz (C, D e E) e inoculação em meio de multiplicação (F).....	22
Figura 3	Número de brotações e número de nós por brotação, obtidos na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams, sob diferentes concentrações de BAP.....	27
Figura 4	Comprimento das brotações (cm) de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams, obtido em meio de cultivo MS ^{3/4} e MS ^{1/2} , acrescido de diferentes concentrações de BAP.....	28
Figura 5	Explantes de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cvs. Adams e MC, apresentando hiperidricidade (A, B e C) e comparação entre explante hiperídrico e normal (D).....	29
Figura 6	Número de brotações por explante (A), número de nós por brotação (B) e comprimento das brotações (cm) (C) de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams, obtidos em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP.....	32
Figura 7	Número de brotações por explante (A), número de nós por brotação (B) e comprimento das brotações (cm) (C) de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams, obtidos em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP.....	35
Figura 8	Brotações de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams, obtidas na multiplicação <i>in vitro</i> , em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP	36
Figura 9	Brotações de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. MC, obtidas na	

	multiplicação <i>in vitro</i> , em meio de cultivo acrescido de 0,3mg dm ⁻³ de BAP.....	39
Figura 10	Número de brotações por explante (A), número de nós por brotação (B) e percentagem de vitrificação (%) (C) de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. MC, obtidos em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP.....	41

CAPÍTULO 2

Figura 1	Percentagem de explantes regenerados (%) (A) e número de brotações por explante regenerante (B), obtidos na regeneração <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cvs. Adams e MC, cultivados em meio contendo TDZ.....	49
Figura 2	Organogênese direta de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cultivar Adams, aos 70 dias de cultivo.....	50
Figura 3	Organogênese indireta (A) e direta (B) de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cultivar MC, aos 70 dias de cultivo.....	50
Figura 4	Percentagem de explantes regenerados (%) (A) e número de brotações por explante regenerante (B), obtidos na regeneração <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cvs. Adams e MC, sob diferentes concentrações de TDZ.....	52
Figura 5	Organogênese indireta em <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cultivar Adams, aos 40 dias (A) e aos 70 dias de cultivo (B).....	53
Figura 6	Regeneração em <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cultivar MC: Organogênese direta (A) e indireta (B) aos 40 dias de cultivo.....	53
Figura 7	Percentagem de explantes regenerados (%) (A) e número de brotações por explante regenerante (B), obtidos na regeneração <i>in vitro</i> de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cvs. Adams e MC, cultivados em meio contendo TDZ.....	55
Figura 8	Organogênese direta em <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. Adams aos 70 dias de cultivo (A) e cv. MC aos 40 dias de cultivo (B).....	56
Figura 9	Formação de calos não friáveis na base de explantes foliares da cv. Adams (A) e organogênese indireta na base de explantes da cv. MC (B), aos 60 dias de cultivo.....	57
Figura 10	Brotações regeneradas de <i>Cydonia oblonga</i> Mill., cv. MC, desenvolvidas a partir da nervura central aos 70 dias de cultivo (A), nervural central aos 50 dias de cultivo (B),	

inoculadas em meio MS modificado aos 50 dias (C) e aos 70 dias de cultivo (D) e explante regenerado a partir de escarificações no limbo, aos 70 dias de cultivo (E)..... 59

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	08
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÃO.....	42
CAPÍTULO 2	
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
APÊNDICES.....	72

INTRODUÇÃO GERAL

O centro de origem do marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) é referido, por muitos autores, como sendo a cidade de Cydon, situada na ilha de Creta, na Grécia, onde ainda é encontrado em estado selvagem. Introduzido no Brasil em 1532 por Martim Afonso de Souza, os marmelos e a marmelada foram os principais e os primeiros produtos de exportação paulista, antecessora ao café (PIO et al., 2005).

Em 1930, o Brasil foi considerado um dos maiores produtores mundiais de marmelos, mas devido à falta de incentivos em anos posteriores, à falta de investimentos em programas de pesquisas e extensão e a problemas fitossanitários, houve a quase dizimação dessa cultura nas regiões produtoras do país, principalmente no Sul de Minas Gerais (ABRAHÃO et al., 1996).

Dada a importância dessa cultura para a fruticultura nacional, principalmente por ser explorada em pequenas propriedades rurais, a marmelocultura constitui uma excelente alternativa de alta rentabilidade. Nos últimos anos, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) retomaram os trabalhos de pesquisa com esta cultura com o objetivo de resolver os entraves ao seu desenvolvimento (PIO et. al., 2007).

Além da exploração comercial das frutas, o marmeleiro é utilizado há muito tempo como uma alternativa de porta-enxerto para pereiras européias (*Pyrus communis* L.), e nespereiras (*Eriobotrya japonica* Lindl.). No caso da pereira européia, a utilização do marmeleiro como porta-enxerto é muito difundido nos principais países produtores de peras, por proporcionar bons índices produtivos (SOUZA et al., 2002); redução do vigor das plantas, pois possui efeito ananizante; e induz precocidade de produção, enquanto que porta-enxertos de *Pyrus* spp., de maneira geral, induzem elevado vigor (PIO et al., 2006), dificultando o manejo dos pomares.

Na grande maioria das combinações de porta-exertos de marmeleiro com pereira, as plantas necessitam de suporte (ancoramento) para melhor desempenho, pois possuem sistema radicular pouco profundo e, em função do grau de incompatibilidade com várias cultivares-copa de pereira, tendem a romper no ponto de enxertia com o peso da produção e vento, necessitando, para isso, tutoramento (WESTWOOD, 1988). Entretanto, é bastante cultivado na Europa, principalmente na Itália (em 90% dos pomares), enquanto que, no Brasil, desde a década de 90, quando foi introduzido para fins comerciais, o uso do marmeleiro como porta-enxerto vem provocando mudanças na forma de manejo da cultura da pereira (FACHINELLO; FRANCESCOTTO, 2009).

Atualmente, existem vários clones de marmeleiro disponíveis, com diferentes tipos de vigor, com melhor adaptação e compatibilidade de enxertia com a pereira. Os marmeleiros de maior difusão como porta-enxertos para a cultura da pereira são: 'BA 29', 'Marmelo A ou Quince A', 'Sydo', 'Adams' e 'Marmelo C ou MC', em ordem decrescente de vigor (PERAZZOLO, 2006), 'MH' (vigor similar ao 'Sydo') e 'Cts 212' (seleção oriunda de Pisa na Itália) (MARANGONI; MALAGUTI, 2002).

Com o surgimento de porta-enxertos clonais de marmeleiro (*Cydonia* spp.) iniciou-se uma nova fase na produção de peras (FACHINELLO; FRANCESCOTTO, 2009), havendo demanda de propagação em larga escala desses clones. Os métodos mais comuns de propagação de porta-enxertos de pomaceas são a mergulhia de cepa e a estaquia (BIANCHI et al., 2003), além da micropropagação.

A propagação *in vitro* é uma técnica de grande aplicação prática dentro da biotecnologia vegetal, sendo importante em fruticultura por permitir a produção comercial de mudas clonais em larga escala e livres de patógenos, tanto de plantas-matrizes quanto de porta-enxertos de diversas espécies (SCHUCH; ERIG, 2005).

O uso da cultura de tecidos vegetais possibilita desenvolver estudos auxiliares para realização de análises bioquímicas e morfológicas, acompanhando desde a diferenciação celular até o desenvolvimento de tecnologias e métodos para a produção clonal, auxiliando no melhoramento genético (VILLALOBOS; THORPE, 1991; ROCHA; QUOIRIN, 2004). Segundo Villalobos e Thorpe (1991), as vantagens mais importantes da propagação *in vitro* são: possibilidade de multiplicar uma grande quantidade de plantas em uma superfície reduzida, de forma rápida, custos relativamente reduzidos, com controle fitossanitário do material propagado, facilidade para transportar material *in vitro* de uma região/país para outra e pela

possibilidade de multiplicar rapidamente uma variedade da qual existem poucos indivíduos.

Um aspecto fundamental para realizar a micropropagação de uma espécie frutífera é o domínio da tecnologia de cultivo em laboratório, resultante de estudos relacionados ao crescimento e o desenvolvimento das plantas nas condições *in vitro* (SOUZA, 2007). Dentre os fatores que afetam este cultivo estão: o meio de cultura (SILVEIRA et al., 2001) e o tipo e a concentração de reguladores de crescimento utilizados para a indução de respostas morfogénéticas (PERES, 2002; SCHUCH; ERIG, 2005; JUNIOR, 2007).

Outra técnica utilizada na biotecnologia vegetal é a regeneração, ou morfogênese *in vitro*, que consiste no processo de formação de órgãos, o qual pode ocorrer através da organogênese ou embriogênese somática (ERIG; SCHUCH, 2005). A organogênese conduz à diferenciação celular e à formação de meristemas caulinares e/ou radiculares, originando caules ou raízes, respectivamente; enquanto que a embriogênese somática conduz à formação de embriões somáticos, seguindo as fases do embrião zigótico, embora, obviamente, sem fecundação (SEGURA, 1993).

A regeneração *in vitro* é bastante empregada em auxílio aos programas de melhoramento em várias espécies, associada à transformação genética com características de interesse (CABONI et al., 2000; RAO et al., 1996); ou, ainda, utilizando-se a estratégia de cultivo em meios que induzam a variabilidade naquelas espécies que apresentam baixa variabilidade genética natural.

Inúmeros fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura, tipo e concentração de reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas, assim como a competência do tecido em responder a essas mudanças hormonais, afetam o processo de regeneração (SUGIYAMA, 1999; ALVES, 2001).

Devido à importância econômica dos porta-enxertos de marmeleiro 'Adams' e 'MC' no país, conforme mencionado anteriormente, por serem amplamente utilizados em pomares de pereiras uniformizando e reduzindo o vigor das plantas, estes foram utilizados no presente trabalho para estudos de multiplicação e regeneração.

A cv. Adams foi selecionada na Bélgica, em 1970. Apresenta grande facilidade de ser multiplicada por estaquia e mergulhia de cepa, com sistema radicular fasciculado e superficial, exigindo áreas de cultivo novas e férteis. É

medianamente sensível à bacteriose *Erwinia amylovora* e induz vigor reduzido nas plantas enxertadas, precocidade de frutificação, elevada produtividade e eficiência produtiva, apresentando discreta afinidade com as cultivares mais difundidas mundialmente. Propicia bom tamanho de frutos e mesmo com produção abundante pode ser utilizado para plantios em alta densidade (LORETI; GIL, 1994; MARANGONI; RIVALTA, 1995).

A cv. MC é considerada a mais ananizante, sendo utilizado em plantios de altas densidades (3500-7200 pl ha⁻¹) (SANSVINI; MUSACCHI, 2000), porém apresenta baixa afinidade de enxertia com as cultivares de pereiras Kaiser, Beurré Bosc, Packham's Triumph e Williams (exceto Williams Compatível) (CAMPBELL, 2003). É considerada compatível com 'Abate Fetel', 'Decana del Comizio' e 'Conference' (COLOMBO, 2003). É bastante sensível à clorose férrica, exigente em nutrição e irrigação. Seu sistema radicular é bastante superficial. Possui alta eficiência produtiva. Apresenta resistência ao pulgão lanígero e nematóides e apresenta sensibilidade a *Erwinia amylovora* e viroses (LORETI; GIL, 1994).

Considerando o exposto acima, em relação ao uso de marmeleiros como porta-enxertos para a cultura da pereira, a técnica de micropropagação permite a multiplicação clonal de plantas com qualidade fitossanitária e em larga escala, que é de grande importância para uniformização dos pomares de pereira. Enquanto que a regeneração *in vitro* é uma etapa crucial para o melhoramento, via transformação genética, sendo, no entanto, de suma importância o desenvolvimento de um protocolo com elevada taxa regenerativa. Desta forma, a otimização destes processos, para *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams e MC, visa potencializar sua produção e utilização no melhoramento genético, almejando selecionar novos genótipos com características de interesse.

CAPÍTULO 1 – Influência das concentrações de sais e de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de marmeleiro ‘Adams’ e ‘MC’

1 Introdução

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) pertence à família *Rosaceae* e subfamília *Pomae*, bem como a macieira e pereira, e pode ser utilizado como porta-enxerto de algumas espécies de pereira (*Pyrus communis* L.) e nespereira (*Eriobotrya japonica* Lindl.), principalmente por promover a redução do vigor das plantas e proporcionar maior precocidade de produção, ao contrário do que ocorre quando se usa porta-enxertos de *Pyrus* spp. (PIO et al., 2006).

Existem vários clones de marmeleiro para uso como porta-enxerto e que induzem diferentes tipos de vigor, melhor adaptação e compatibilidade de enxertia com *Pyrus communis* L., sendo que os de maior difusão são: ‘BA 29’, ‘Marmelo A ou Quince A’, ‘Sydo’, ‘Adams’ e ‘Marmelo C ou MC’, em ordem decrescente de vigor (PERAZZOLO, 2006).

A micropropagação, ou propagação *in vitro*, tem sido recomendada como uma alternativa viável para a propagação de mudas de algumas espécies frutíferas lenhosas, devido a rapidez da propagação em larga escala, manutenção das características genéticas (COUTO, 2003; ASSIS; TEIXEIRA, 1998) e produção de material vegetal com melhor qualidade sanitária, em relação àquele obtido por técnicas convencionais como estaquia e mergulhia de cepa (BIANCHI et al., 2003).

Dentre as fases de micropropagação, a multiplicação visa produzir o maior número possível de plantas, no menor espaço de tempo, sendo que para obter altas taxas de multiplicação dos explantes é necessário o ajuste do protocolo para cada espécie/cultivar em estudo (SCHUCH; ERIG, 2005). Dentre os fatores mais

importantes que influenciam a taxa de multiplicação destacam-se o tipo de meio de cultura, o tipo e a concentração de citocinina (SILVEIRA et al., 2001).

Das citocininas utilizadas nos meios de multiplicação, a 6-Benzilaminopurina (BAP) é a que tem contribuído eficientemente na indução de gemas adventícias e multiplicação dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), além de se destacar das demais por ser a citocinina de menor custo, mais ativa e mais utilizada na multiplicação de diversas espécies (FIORINO; LEVA, 1983; BERARDI et al., 1993).

Meios com concentrações de $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de BAP têm sido usados com bons resultados para a multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga*, cv. MC (DONINI et al., 2008). Entretanto, o uso de elevados níveis de BAP no meio de cultura pode causar desordens fisiológicas como a inibição do alongamento de folhas e caules, a formação de tufos e a vitrificação (hiperidricidade) dos explantes (HARADA; MURAI, 1996; PÉREZ-TORNERO; BURGOS, 2000). Os explantes vitrificados caracterizam-se por apresentarem folhas translúcidas, túrgidas, rígidas, com aspecto encharcado e facilmente quebráveis, apresentando brotações mal formadas e alongadas (HAZARIKA, 2006).

Sendo assim, o desenvolvimento deste trabalho teve por objetivo otimizar a multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Cydonia oblonga*, cultivares Adams e MC.

2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, durante o período de março 2008 a janeiro de 2010.

As plantas-matrizes das cultivares Adams e MC, provenientes de material auto-enraizado, foram cultivadas em vasos, em casa-de-vegetação (Fig. 1). Com objetivo de reduzir a contaminação *in vitro*, as plantas receberam tratamento fitossanitário para bactérias e fungos com agrimicina® ($2,4\text{g dm}^{-3}$ de Sulfato de Estreptomicina) e Benlate® ($0,6\text{g dm}^{-3}$ de Benomyl), respectivamente, com intervalo de três dias, durante todo o período de coleta de material vegetal (novembro a janeiro).

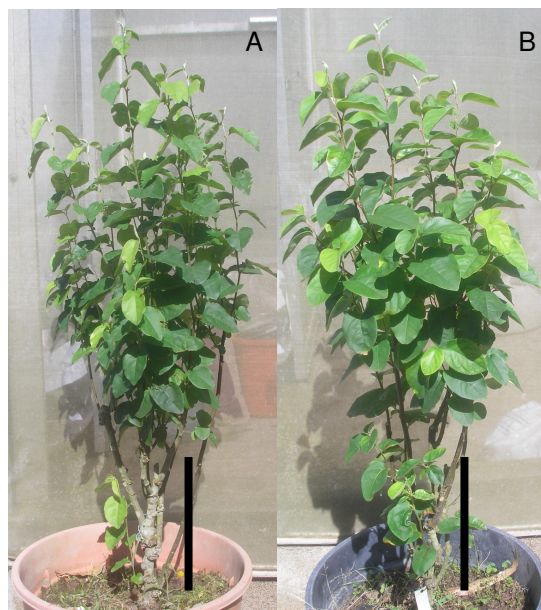


Figura 1 – Plantas-matrizes de *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams (A) e MC (B), cultivadas em casa-de-vegetação. Barra = 20cm.

Durante a fase de pleno crescimento vegetativo das plantas, foram coletados segmentos nodais para o estabelecimento *in vitro*. Anteriormente à inoculação em meio de cultura, em câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi desinfestado em solução de álcool 70% por 20 segundos, recebeu dupla lavagem com água destilada e esterilizada, hipoclorito de sódio 1,5% por 15 minutos e tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.

Após a desinfestação, os segmentos nodais, com aproximadamente 1,5cm, contendo uma gema axilar, foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com redução de 25% dos macro e micro nutrientes, acrescido das vitaminas do meio MS, mio-inositol (100mg dm^{-3}), sacarose (30g dm^{-3}), BAP ($0,5\text{mg dm}^{-3}$), AIB (ácido indolil-butírico) ($0,01\text{mg dm}^{-3}$), ágar Vetec® (7g dm^{-3}), com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Nesta fase foram utilizados tubos de ensaio contendo 5,0mL de meio.

Feita a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, permanecendo no escuro por sete dias e com posterior transferência para fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de $48\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 35 dias (Fig. 2A, B, C, D e E).

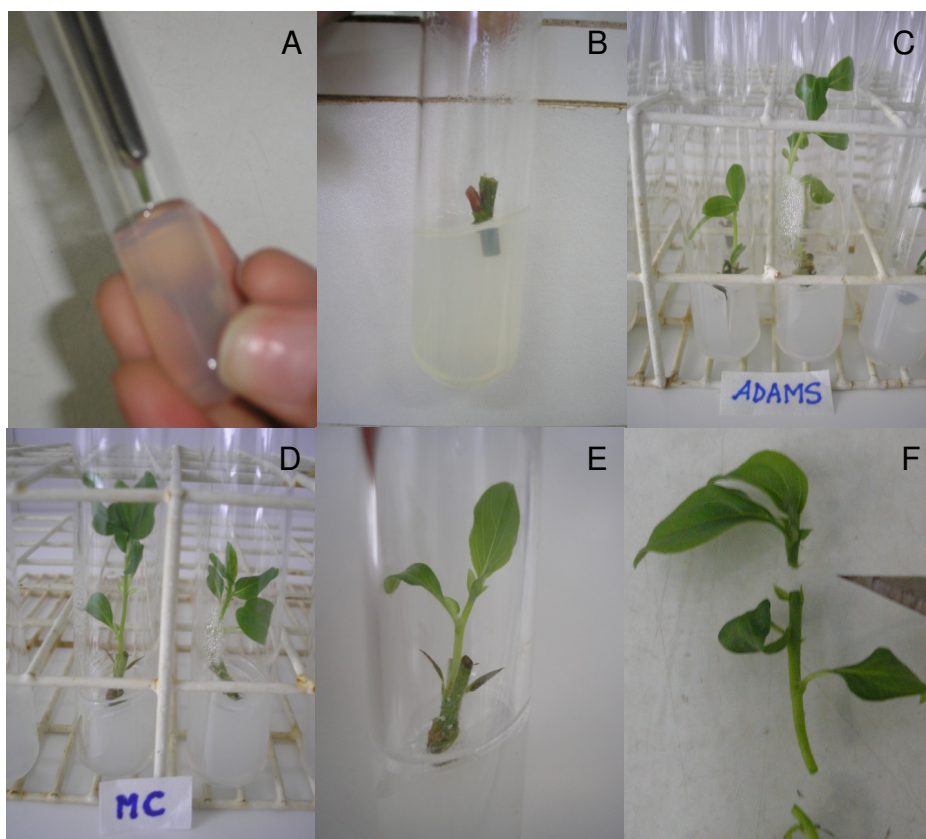


Figura 2 - Estabelecimento *in vitro* de explantes *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams e MC, durante a inoculação (A e B) e após 35 dias de cultivo na luz (C, D e E) e inoculação em meio de multiplicação (F).

Para os experimentos de multiplicação, foram realizados testes preliminares visando definir meios e condições para diminuir a vitrificação dos explantes, usando-se o meio MS, conforme citado por Vinterhalter e Neskovic (1992) e Donini et al. (2008), e suas reduções de sais, bem como de nitrogênio.

As brotações apicais, com aproximadamente 1,5cm de comprimento, utilizadas como explantes iniciais nos experimentos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.2.1 e 2.2.2, tiveram seus meristemas apicais excisados (Fig. 2F) e foram provenientes de cultivos intermediários em meio de multiplicação composto pelo meio MS modificado ($\frac{3}{4}$ da concentração normal de NH_4NO_3 e KNO_3 e Ferro na forma de EDTA-Férrico), suplementado de $0,6\text{mg dm}^{-3}$ de BAP.

Assim, os estudos foram conduzidos em experimentos, sendo estes divididos de acordo com a cultivar, conforme segue.

2.1 Multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill. cv. Adams

2.1.1 Efeito das concentrações de sais e de BAP no meio de cultura

Com objetivo de determinar a melhor concentração de sais e de BAP na multiplicação *in vitro* da cultivar Adams, utilizou-se o meio MS^{1/2} e MS^{3/4} (com redução de 50% e 25% da sua concentração plena, respectivamente, e Ferro na forma de EDTA-Férrico), suplementados com BAP (0,0; 0,34; 0,68 e 1,02mg dm⁻³), AIB (0,02mg dm⁻³), mio-inositol (100mg dm⁻³), sacarose (25g dm⁻³), ágar (8,5g dm⁻³) e pH 5,8.

Brotações apicais com ápices excisados (Fig. 2F), de aproximadamente 1,5cm e, provenientes da fase de estabelecimento, foram utilizadas como explantes iniciais. Após inoculação, estes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 48µmol m⁻² s⁻¹, permanecendo nestas condições por 40 dias. Posteriormente, analisaram-se as variáveis: número de brotações por explante, comprimento das brotações, número de nós por brotação e percentagem de explantes com hiperidricidade.

2.1.2 Interação BAP x AG₃ na multiplicação *in vitro*

A fim de verificar o efeito da interação entre BAP e ácido giberélico (AG₃) na multiplicação *in vitro* do marmeleiro 'Adams', brotações apicais foram inoculadas em meio MS modificado (¾ da concentração normal de NH₄NO₃ e KNO₃ e Ferro na forma de EDTA-Férrico), contendo BAP (0,0; 0,6 e 1,2mg dm⁻³), AG₃ (0,0; 0,5 e 1,0mg dm⁻³), AIB (0,02mg dm⁻³), mio-inositol (100mg dm⁻³), sacarose (30g dm⁻³), ágar (7g dm⁻³) e pH 5,8, sendo as demais condições de cultivo e as variáveis analisadas as mesmas do experimento anterior (2.1.1).

2.1.3 Influência das concentrações de BAP na multiplicação *in vitro*

Objetivou-se, neste experimento, verificar a influência das concentrações de BAP sobre a indução de brotações *in vitro* do porta-enxerto 'Adams'. Brotações apicais, oriundas de multiplicações prévias, foram utilizadas como explantes iniciais, sendo inoculados em meio MS modificado (¾ da concentração normal de NH₄NO₃ e KNO₃ e Ferro na forma de EDTA-Férrico), suplementado com concentrações de BAP (0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2mg dm⁻³), 100mg dm⁻³ de mio-inositol, 30g dm⁻³ de sacarose, 7,5g

dm⁻³ de ágar e pH 5,8. As demais condições de cultivo e as variáveis analisadas foram as mesmas do primeiro experimento (2.1.1).

2.1.4 Efeito do aumento na concentração de BAP na multiplicação *in vitro* da cv Adams

Com a finalidade de aumentar a proliferação *in vitro* do marmeleiro 'Adams', brotações apicais foram inoculadas em concentrações de BAP superiores em relação ao experimento 2.1.3, ou seja, 0,0; 0,7; 1,4; 2,1 e 2,8mg dm⁻³ de BAP. A composição básica do meio, bem como as condições de cultivo e as variáveis analisadas foram as mesmas do experimento anterior (2.1.3).

2.2 Multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC

2.2.1 Interação BAP x AG₃ na multiplicação *in vitro*

Neste experimento, buscou-se verificar a interação entre BAP e AG₃ na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto 'MC', utilizando-se, como fonte de explantes, brotações apicais oriundas de multiplicações prévias.

As brotações foram inoculadas em meio MS modificado (³/₄ da concentração normal de NH₄NO₃ e KNO₃ e Ferro na forma de EDTA-Férrico), contendo diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,6 e 1,2mg dm⁻³) e AG₃ (0,0; 0,5 e 1,0mg dm⁻³), AIB (0,02mg dm⁻³), mio-inositol (100mg dm⁻³), sacarose (30g dm⁻³), ágar (7g dm⁻³) e pH 5,8, sendo as demais condições de cultivo e as variáveis analisadas as mesmas do primeiro experimento (2.1.1).

2.2.2 Efeito das concentrações de BAP na indução das brotações

Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito do BAP na indução de brotações *in vitro* do marmeleiro cv. MC. Brotações apicais foram utilizadas como explantes iniciais, sendo inoculados em meio MS modificado (³/₄ da concentração normal de NH₄NO₃ e KNO₃ e Ferro na forma de EDTA-Férrico), suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2mg dm⁻³), 100mg dm⁻³ de mio-inositol, 30g dm⁻³ de sacarose, 7,5g dm⁻³ de ágar e pH 5,8, sendo as demais condições de cultivo e as variáveis analisadas as mesmas do experimento 2.1.1.

2.3 Delineamento experimental e análise estatística

Todos experimentos foram conduzidos com o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os experimentos 2.1.1 e 2.1.2, referentes à cv. Adams, e o experimento 2.2.1, da cv. MC, com três repetições e cada unidade experimental constituída por um frasco contendo quatro explantes.

No experimento 2.1.1, o fatorial foi 2x4, sendo os fatores utilizados: meio de cultura ($MS^{1/2}$ e $MS^{3/4}$) e concentrações de BAP (0,0; 0,34; 0,68 e $1,02\text{mg dm}^{-3}$) e um arranjo fatorial 3x3 nos experimentos 2.1.2 e 2.2.1, ou seja, três níveis do fator concentração de BAP (0,0; 0,6 e $1,2\text{mg dm}^{-3}$) e três níveis do fator concentração de AG_3 (0,0; 0,5 e $1,0\text{mg dm}^{-3}$).

Os experimentos 2.1.3 e 2.1.4, da cv. Adams, e o experimento 2.2.2, da cv. MC, foram compostos por apenas um fator de tratamento, sendo avaliada a concentração de BAP com cinco níveis (0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e $1,2\text{mg dm}^{-3}$) para 2.1.3 e 2.2.2 e quatro níveis para 2.1.4 (0,0; 0,7; 1,4; 2,1 e $2,8\text{mg dm}^{-3}$). Entretanto, os experimentos 2.1.3 e 2.2.2 foram conduzidos com quatro repetições por tratamento, sendo a unidade experimental um frasco contendo quatro explantes e o experimento 2.1.4 com quatro repetições por tratamento, com cinco explantes por unidade experimental.

Para análise estatística, os dados de cada experimento foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, ou analisados por regressão polinomial, utilizando o Software Sanest (ZONTA; MACHADO, 1984). Os dados de número de brotações por explante e número de nós por brotação 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.

3 Resultados e Discussão

3.1 Multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams

3.1.1 Efeito das concentrações de sais e de BAP no meio de cultura

Houve efeito isolado dos fatores para as variáveis número de brotações por explante e número de nós por brotação (Apêndice 1).

No cultivo em diferentes concentrações de sais, obteve-se um maior número de brotações por explante em meio $MS^{3/4}$ do que em $MS^{1/2}$. Porém, estes meios não proporcionaram variação significativa no número de nós por brotação (4,69) (Tab. 1).

Observações similares foram constatadas por Silveira et al. (2001), em que o porta-enxerto de pessegueiro GxN-22 apresentou maior número de brotações quando cultivados em meio MS^{3/4} em relação ao meio MS completo.

Tabela 1 – Número de brotações por explante e número de nós por brotação obtidos na multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams, em meio de cultivo MS^{3/4} e MS^{1/2}.

MEIOS DE CULTURA	Nº de brotações por explante	Nº de nós por brotação
MS ^{3/4}	3,31 a	4,55 a
MS ^{1/2}	2,28 b	4,84 a
CV (%)	7,507	3,860

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste estatístico de Tukey a 5%.

Muitos autores têm relatado a possibilidade de reduzir as concentrações de sais do meio MS visando o melhor desenvolvimento das plantas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984; SILVEIRA et al., 2001), sendo que as atenções têm-se voltado para o nitrogênio e, em especial, ao nitrogênio reduzido (AMMIRATO, 1985). Uma das razões para a importância do nitrogênio reduzido no metabolismo vegetal é a participação da amônia na rota primária de síntese de compostos orgânicos importantes (GREY et al., 1987). O nitrogênio é, algumas vezes, absorvido pelas plantas na forma orgânica, mas geralmente é suplementado na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- . Embora a maioria das plantas absorva preferencialmente o NO_3^- ao NH_4^+ , em alguns casos observa-se o oposto. Portanto, é necessário encontrar o balanço $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ adequado para se obter ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro* (SATO et al., 2001).

Com relação às concentrações de BAP, embora pela análise estatística verificou-se uma resposta quadrática para as variáveis número de brotações e número de nós por brotação, com 3,17 brotações e 5,05 nós por explante, respectivamente, nas concentrações estimadas de $0,63\text{mg dm}^{-3}$ e $0,54\text{mg dm}^{-3}$ de BAP (Fig. 3). Estes resultados não representam um efeito biológico importante da adição do BAP principalmente na multiplicação da cv. Adams, pois o incremento foi de apenas 0,8 brotações por explante, valor este bastante inferior ao incremento de

2,59 brotações por explante do porta-enxerto 'Julior' obtido por Wagner Júnior et al. (2003), utilizando $0,6 \text{ mg dm}^{-3}$ de BAP.

Caldas et al. (1998) afirmam que a composição e concentração de reguladores de crescimento no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos.

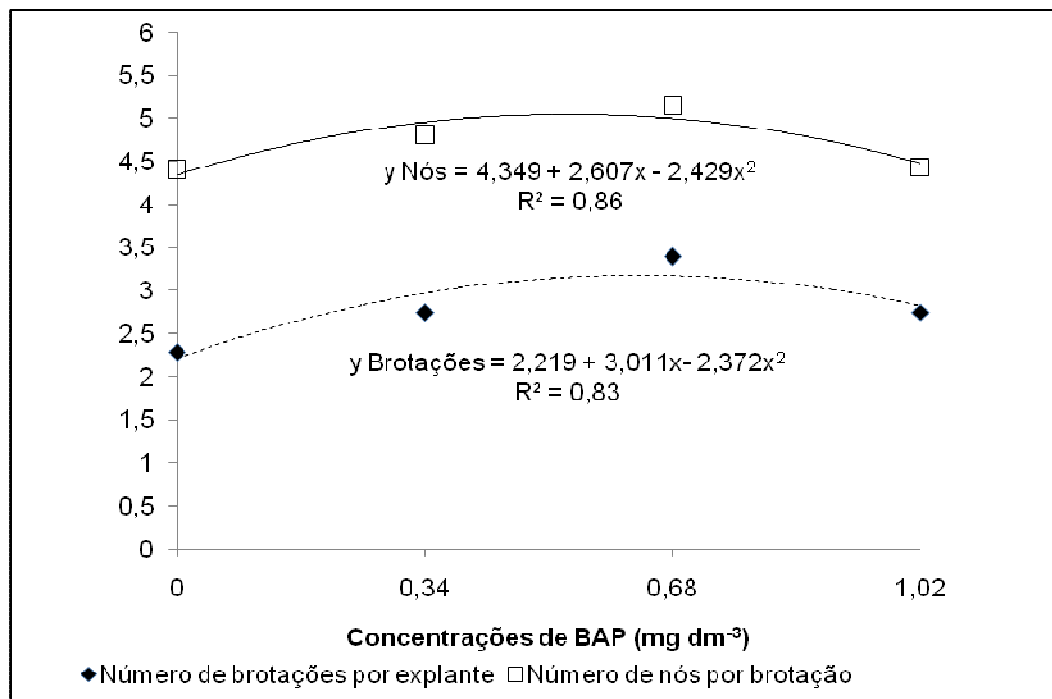


Figura 3 – Número de brotações e número de nós por brotação, obtidos na multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams, sob diferentes concentrações de BAP.

No que diz respeito às concentrações de BAP e os meios utilizados, observou-se interação entre os fatores para a variável comprimento das brotações (Apêndices 2 e 3), onde o meio $\text{MS}\frac{1}{2}$ induziu a uma resposta linear, com brotações de 2,55cm na concentração de $1,02 \text{ mg dm}^{-3}$ de BAP. No meio $\text{MS}\frac{3}{4}$ pode-se observar um comportamento quadrático, onde verificou-se o maior valor estimado (2,69cm) na concentração de $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ de BAP, porém na concentração de $1,02 \text{ mg dm}^{-3}$ de 6-Benzilaminopurina (BAP) as brotações formadas apresentavam-se com comprimento inferior (1,71cm) aos das cultivadas no meio sem BAP (1,85cm) (Fig. 4).

Tabachnik e Kester (1977) observaram que concentrações de até $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ de BAP foram melhores para a multiplicação de híbridos de amendoeira e pessegueiro. Por outro lado, concentrações maiores inibiram o alongamento das brotações, enquanto a concentração de $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ proporcionou incremento.

Marino (1982) verificou que a concentração de BAP de $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ possibilitou maiores taxas de multiplicação de *Prunus*, porém o tamanho das brotações foi muito pequeno, dificultando a separação dos explantes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), concentrações crescentes de citocinina podem reduzir ou inibir o crescimento das brotações. Esse regulador de crescimento é eficaz na indução de brotações, porém quando em excesso é tóxico, caracterizando-se principalmente pela falta de crescimento das culturas, engrossamento do caule e vitrificação generalizada.

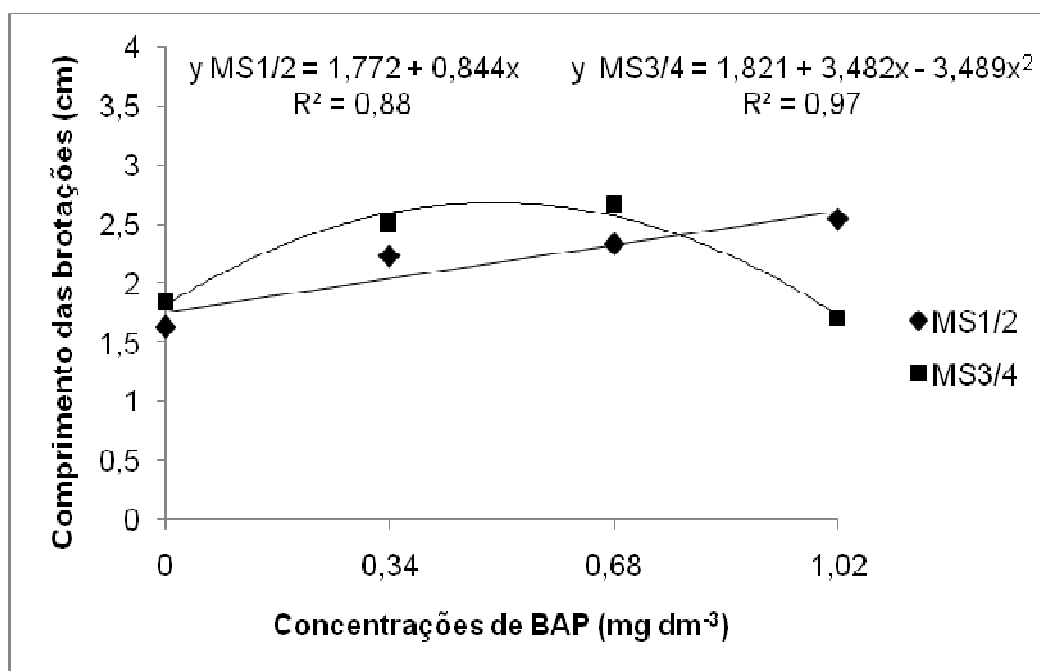


Figura 4 – Comprimento das brotações (cm) de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams, obtido em meio de cultivo $\text{MS}^{3/4}$ e $\text{MS}^{1/2}$, acrescido de diferentes concentrações de BAP.

Segundo os resultados de análise de variância, não houve diferenças significativas para a variável percentagem de vitrificação, apresentando uma média de 61,46% de explantes hiperídricos, o que pode ter influenciado os resultados obtidos para as demais variáveis estudadas, pois, de acordo com Ziv (1991) e Santos-Serejo et al., (2006), a hiperidricidade é um evento que pode ocorrer na cultura de tecidos, gerando anormalidades fisiológicas e morfológicas no tecido vegetal, afetando os processos de fotossíntese e trocas gasosas da planta (Fig. 5).

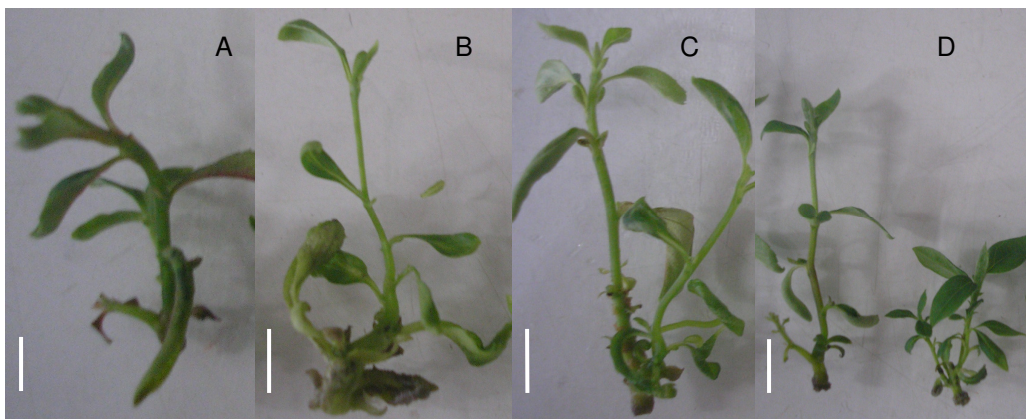


Figura 5 – Explantes de *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams e MC, apresentando hiperidricidade (A, B e C) e comparação entre explante hiperídrico e normal (D). Barra = 1cm.

3.1.2 Interação BAP x AG₃ na multiplicação *in vitro*

Neste experimento verificou-se interação entre os fatores para todas as variáveis estudadas, exceto para a percentagem de vitrificação, a qual apresentou uma média de 35,18% de explantes vitrificados (Apêndice 4).

A combinação das concentrações de 0,6mg dm⁻³ de BAP e 1,0mg dm⁻³ de AG₃ foi a mais significativa para o número de brotações (6,25) e comprimento das mesmas (3,08cm), porém esta não diferiu estatisticamente da combinação de 0,6mg dm⁻³ de BAP e 0,5mg dm⁻³ de AG₃ (2,93cm) (Tab. 2).

O número de brotações por explante foi muito baixo quando o meio não foi suplementado com BAP (1,25), demonstrando a necessidade de adição desta citocinina ao meio de cultivo para a multiplicação do porta-enxerto 'Adams'. Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa (2006), na multiplicação de morangueiros 'Burkley' e 'Dover', os quais na ausência de BAP apresentaram a formação de apenas 1,5 e 1,8 brotações, respectivamente. Conforme Grattapaglia e Machado (1998), nesta etapa o uso de citocinina é indispensável para a redução da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, onde o tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro*.

No que se refere ao uso de giberelina, houve um incremento no comprimento e no número das brotações quando utilizada a concentração de 1,0mg dm⁻³ de AG₃, o que está condizente com Grosser e Gmitter Júnior (1990), que também obtiveram alongamento satisfatório em brotações de híbridos somáticos de citros, utilizando

1,0mg dm⁻³ de AG₃ no meio de cultura. Já em trabalhos realizados por Fráguas et al. (2004), com *Ficus carica* L., o maior comprimento foi observado com 6mg dm⁻³ de AG₃. Esta diferença de resultados reforça a importância de adequar o tipo e concentração de reguladores de crescimento, bem como a composição do meio, para cada espécie em estudo.

Observou-se também que o número de nós por brotação foi maior quando suplementado com 1,0mg dm⁻³ de AG₃ sem adição de BAP (4,25), porém este resultado não é tão superior ao encontrado quando utilizada a concentração de 1,2mg dm⁻³ de BAP sem adição de AG₃ (3,81).

Tabela 2 – Número de brotações por explante, número de nós por brotação e comprimento das brotações (cm) obtidos na multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams, em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP e AG₃.

Concentrações AG ₃ (mg dm ⁻³)	Concentrações BAP (mg dm ⁻³)		
	0,0	0,6	1,2
Número de brotações por explante			
0,0	1,25 c B	3,62 b B	4,50 a B
0,5	1,87 c A	3,12 b C	5,25 a A
1,0	1,87 c A	6,25 a A	5,50 b A
CV (%) = 2,667			
Número de nós por brotação			
0,0	3,25 b B	3,47 ab A	3,81 a A
0,5	3,26 b B	3,62 a A	2,87 c B
1,0	4,25 a A	3,42 b A	3,54 b A
CV (%) = 1,841			
Comprimento das brotações (cm)			
0,0	1,83 b B	2,62 a B	2,55 a AB
0,5	1,88 c B	2,93 a A	2,35 b B
1,0	2,80 a A	3,08 a A	2,69 b A
CV (%) = 4,776			

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste estatístico de Tukey a 5%.

3.1.3 Influência das concentrações de 6-Benzilaminopurina na multiplicação *in vitro*

De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo para o fator concentração de BAP para todas as variáveis analisadas, exceto para percentagem de vitrificação, a qual apresentou uma média de 16,25% de explantes hiperídricos (Apêndices 5 e 6). Estudos realizados por Vinterhalter e Neskovic (1992), na multiplicação *in vitro* de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MA, demonstraram que a concentração de $2,03\text{mg dm}^{-3}$ de BAP e $0,1\text{mg dm}^{-3}$ de AIB propiciou o maior desenvolvimento de brotações, porém com presença de vitrificação. Trabalhos desenvolvidos por Radmann et al. (2009a), com o porta-enxerto de pessegueiro 'Tsukuba 1' também mostraram o surgimento de explantes hiperídricos (20%) em meio MS.

A adição de BAP ao meio de cultivo proporcionou uma resposta linear crescente para o número de brotações por explante (3,3), número de nós por brotação (4,19) e no comprimento das brotações (2,09cm) (Fig. 6A, 6B e 6C, respectivamente).

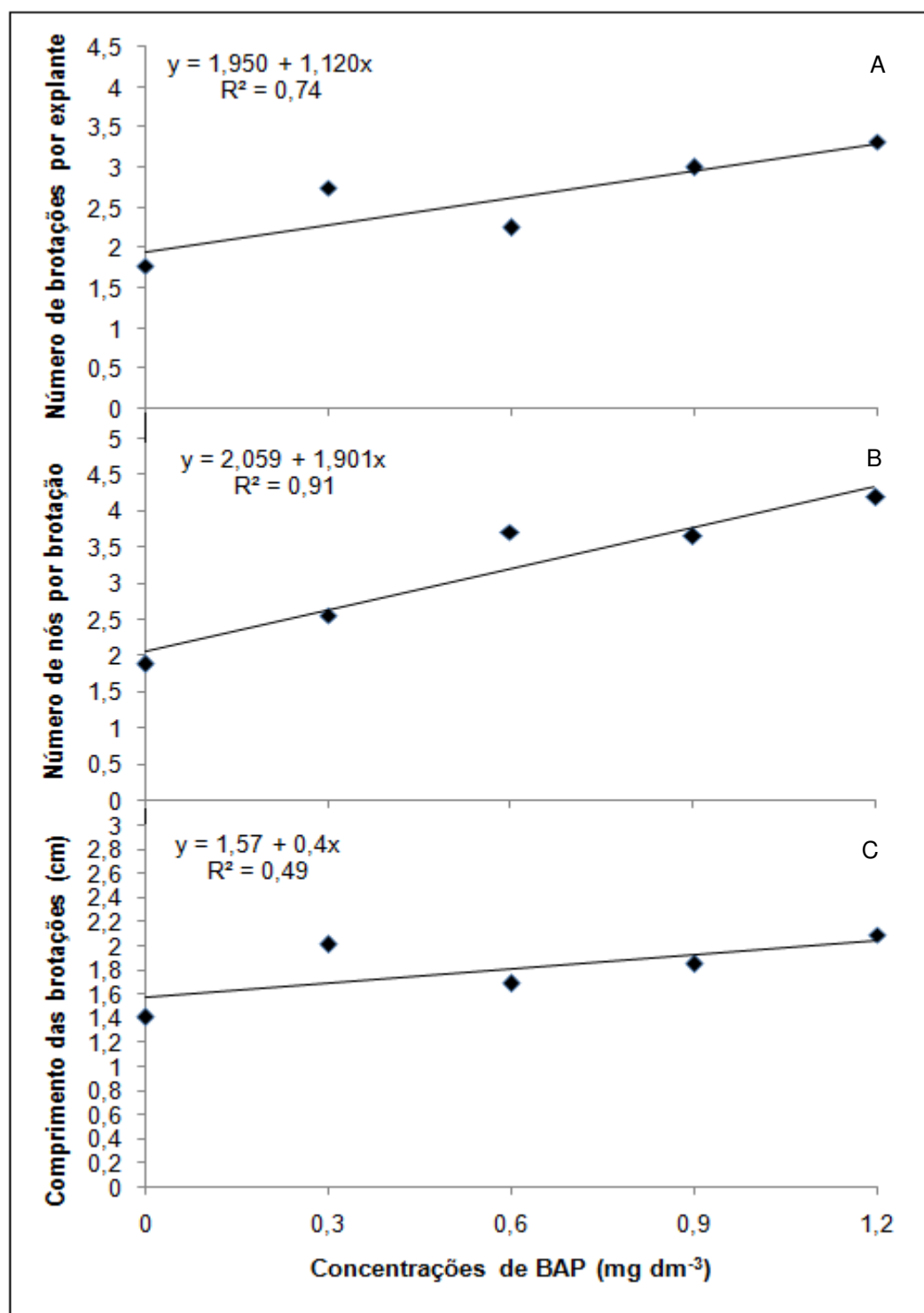


Figura 6 – Número de brotações por explante (A), número de nós por brotação (B) e comprimento das brotações (cm) (C) de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams, obtidos em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP.

Resultados semelhantes foram encontrados por Silveira et al (2001), com trabalhos sobre multiplicação de porta-enxertos de *Prunus* sp., os quais observaram que à medida que aumentava a concentração de BAP, ocorria incremento no

número de brotações nos porta-enxertos Marianna e Mr.S 2/5 até a concentração de $0,7\text{mg dm}^{-3}$ de BAP.

Com relação ao efeito das concentrações de BAP na proliferação de brotações, foi possível a obtenção dos melhores resultados com o uso de $0,2\text{mg dm}^{-3}$ de BAP em trabalhos realizados com o porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' (GIACOBBO et al., 2003), $0,5\text{mg dm}^{-3}$ na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira 'Mirabolano' (SCZEPANSKI, 2001) e de *Prunus laurocerasus* L. (PONCHIA; GARDIMAN, 1993), $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de BAP e $0,1\text{mg dm}^{-3}$ de ANA em estudos com pessegueiros 'Diamante' e 'Flordaprince' (MATIAS, 1995) e $2,0\text{mg dm}^{-3}$ de BAP na micropropagação de ameixeira 'Santa Rosa' (ROGALSKI et al., 2003) e pessegueiros 'Evergreen', 'Suncrest' e 'Belle of Georgia' (HAMMERSCHLAG et al. 1987). Com isso verifica-se que para a micropropagação é necessário otimizar as condições de cultivo para cada espécie e/ou variedade, sendo que o fator genético vai determinar a intensidade da resposta aos reguladores de crescimento, em especial as citocininas, como a 6-Benzilaminopurina (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000a; LEONTIEV-ORLOV et al., 2000b; PÉREZ-TORNERO et al., 2000b).

Sendo assim, a partir dos resultados encontrados, experimentos adicionais buscando testar maiores concentrações de BAP se fizeram necessários, conforme 3.1.4, a fim de verificar até que concentração de BAP é possível obter uma resposta positiva para estas variáveis estudadas.

3.1.4 Efeito do aumento na concentração de BAP na multiplicação *in vitro*

Conforme a análise de variância, houve efeito significativo para o fator concentração de BAP para todas as variáveis, exceto para a percentagem de vitrificação, que apresentou uma média de 33% de explantes vitrificados (Apêndices 7 e 8).

Para a variável número de brotações observou-se uma resposta linear crescente, com média de 6,3 brotações por explante (Fig. 7A). Este resultado está condizente com Marino (1984), que trabalhando com *Pyrus* sp., cv. William, obteve aumento nas taxas médias de multiplicação de quase 400% correspondendo a um aumento na concentração de BAP no meio de $0,5$ a $2,0\text{mg dm}^{-3}$.

Em relação ao número de nós por brotação (Fig. 7B) e comprimento das mesmas (Fig. 7C), obteve-se um comportamento quadrático, sendo que a primeira

variável apresentou um ponto de máxima na concentração de $1,88\text{mg dm}^{-3}$ com 3,98 nós por brotação.

Entretanto, para o comprimento das brotações a concentração de $0,92\text{mg dm}^{-3}$ foi aquela que proporcionou os melhores resultados, ou seja, brotações com cerca de 1,71cm. Na concentração de BAP em que se registrou o máximo valor estimado para a variável número de nós por brotação ($1,88\text{mg dm}^{-3}$ de BAP), o comprimento das brotações apresentou-se praticamente igual ou inferior ao tratamento sem a presença de BAP, com um acentuado declínio em concentrações de BAP superiores a esta, o que dificulta o manuseio das brotações; uma vez que, de acordo com Radmann et al. (2009b), o crescimento das brotações formadas durante a fase de multiplicação é uma variável determinante na qualidade do material destinado a fase de enraizamento.

Embora o aumento na concentração de BAP tenha proporcionado um incremento no número de brotações, observou-se uma redução no comprimento e no tamanho das folhas nas concentrações mais altas de BAP, acarretando numa maior dificuldade de separação, manuseio e utilização dos explantes, o que não é desejável no cultivo *in vitro* (Fig. 8). De acordo com Dantas et al. (2002), embora o maior objetivo na fase de multiplicação *in vitro* seja produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos importantes devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas multiplicativas, e sim obter uma taxa média satisfatória entre eles, buscando qualidade e homogeneidade, pois isso vai contribuir para o sucesso da fase de enraizamento.

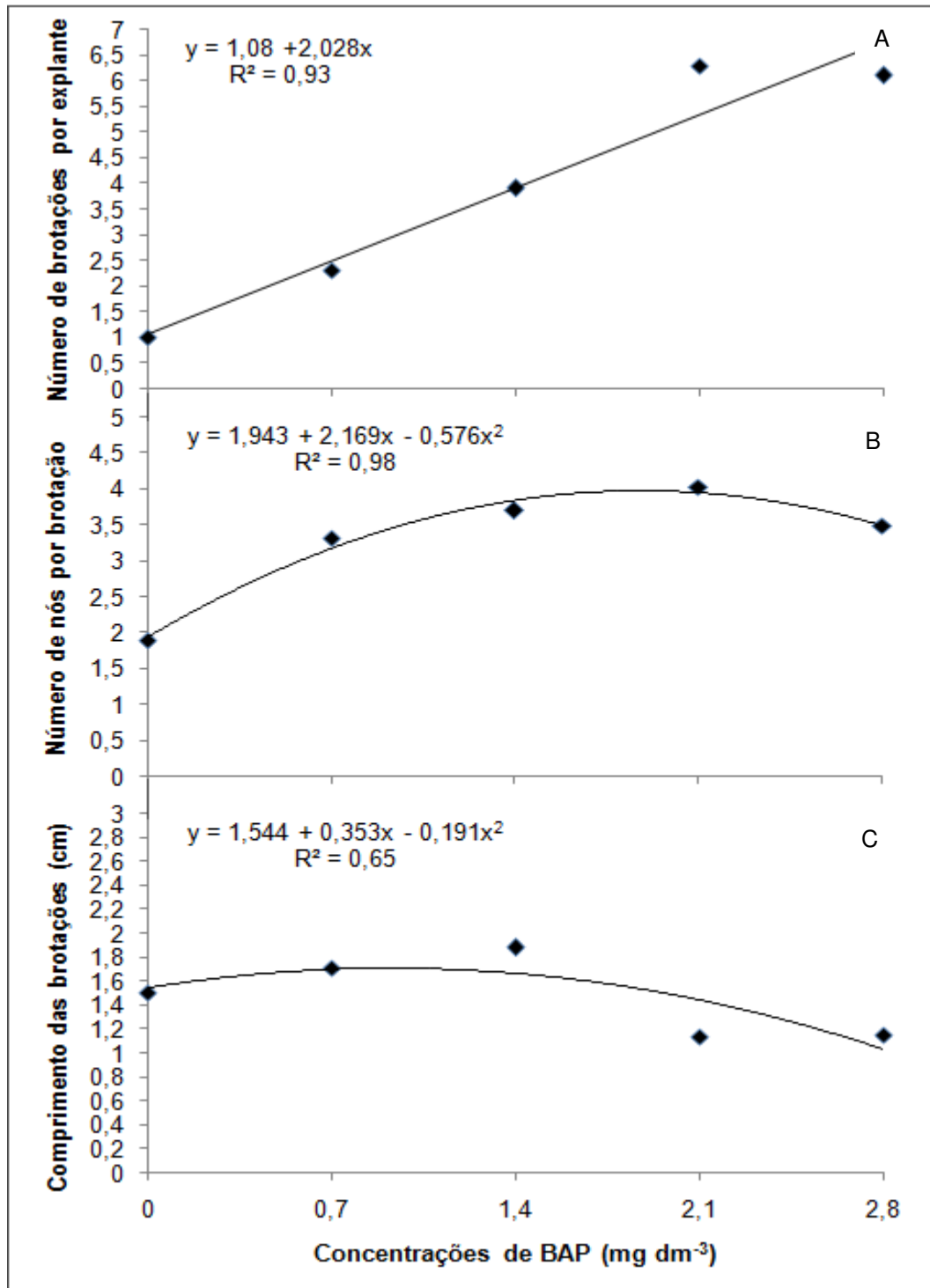


Figura 7 – Número de brotações por explante (A), número de nós por brotação (B) e comprimento das brotações (cm) (C) de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams, obtidos em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP.



Figura 8 – Brotações de *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams, obtidas na multiplicação *in vitro*, em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP.

3.2 Multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC

3.2.1 Interação BAP x AG₃ na multiplicação *in vitro*

Verificou-se interação entre os fatores somente para a variável comprimento das brotações, sendo que para as demais variáveis o efeito significativo ocorreu de forma isolada (Apêndice 9).

O maior número de brotações (4,29) foi observado na concentração de 1,2mg dm⁻³ de BAP (Tab. 3), enquanto que, com o uso de AG₃ os melhores resultados foram encontrados nas concentrações de 0,5 e 1,0mg dm⁻³, diferindo somente de brotações que foram cultivadas em meio com ausência de giberelina. Em contrapartida, em relação ao número de nós por brotação, a concentração de 0,6mg dm⁻³ de BAP foi a que propiciou melhor resultado (5,18), não havendo influência do AG₃ para esta variável, onde se obteve uma média de 4,15 nós formados por explante.

Ainda na Tab. 3, em relação à percentagem de explantes vitrificados, pode-se observar que na medida em que ocorreu incremento na concentração de BAP houve um aumento na percentagem destes. Entretanto, quando usada giberelina, não houve diferença significativa, apresentando uma média de 41,67% de explantes vitrificados.

Tabela 3 – Número de brotações por explante, número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) obtidos na multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC, em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP e AG₃.

Número de brotações por explante		
Concentrações BAP (mg dm ⁻³)	0,0	1,58 c
	0,6	3,61 b
	1,2	4,29 a
Concentrações AG ₃ (mg dm ⁻³)	0,0	2,60 b
	0,5	3,61 a
	1,0	3,28 a
CV (%) = 5,523		
Número de nós por brotação		
Concentrações BAP (mg dm ⁻³)	0,0	2,76 c
	0,6	5,18 a
	1,2	4,52 b
Concentrações AG ₃ (mg dm ⁻³)	0,0	4,02 a
	0,5	4,24 a
	1,0	4,21 a
Média		4,15
CV (%) = 3,098		
Percentagem de vitrificação (%)		
Concentrações BAP (mg dm ⁻³)	0,0	25,00 b
	0,6	33,33 ab
	1,2	66,67 a
Concentrações AG ₃ (mg dm ⁻³)	0,0	41,67 a
	0,5	38,89 a
	1,0	44,44 a
Média		41,67
CV (%) = 59,773		

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste estatístico de Tukey a 5%.

Barbosa (2006), em estudos com morangueiros 'Burkley' e 'Dover', relatou que o meio de cultivo MS com $0,5\text{mg dm}^{-3}$ de BAP promoveu menor formação de hiperidricidade, não afetando a multiplicação dos explantes. Segundo Ziv (1991) e Paek e Hahn (2000), entre os fatores externos promotores da hiperidricidade estão os reguladores de crescimento, em particular as citocininas, que estimulam maior produção da parte aérea, porém seu excesso pode ser tóxico, comprometendo o desenvolvimento das culturas. Isto está condizente com os resultados encontrados por Dunstan et al. (1985), os quais verificaram que a utilização de altas concentrações de BAP (acima de $3,0\text{ mg dm}^{-3}$) no meio de cultivo afetaram a qualidade dos brotos de macieira 'M-4', produzindo brotações atrofiadas.

Conforme pode ser observado na Tab. 4, as brotações que não foram suplementadas com reguladores de crescimento apresentaram comprimento de 2,18cm, não diferindo estatisticamente de quando suplementadas com $0,6\text{mg dm}^{-3}$ de BAP sem adição de AG_3 (2,18cm) ou com $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de AG_3 sem adição de BAP (2,01cm).

Ainda na Tab. 4 é possível visualizar que a combinação das concentrações de $0,6\text{mg dm}^{-3}$ de BAP e $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de AG_3 foi a que proporcionou maior incremento no crescimento das brotações (2,72cm). Entretanto, em trabalhos realizados por Channuntapipat et al. (2003), com amendoeira (*Prunus dulcis*) cv. Nonpareil, houve acréscimo no crescimento das brotações até a concentração $0,67\text{mg dm}^{-3}$ de BAP. Já Villa et al. (2007), em estudos com o porta-enxerto de videira 'P1103', observaram que a concentração de $2,0\text{mg dm}^{-3}$ de BAP foi a que desencadeou o maior comprimento das brotações. Estes dados evidenciam o efeito benéfico do BAP na multiplicação e desenvolvimento das brotações, pela sua influência sobre a divisão celular e superação da dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (BRUM et al., 2002). Em contrapartida, segundo Grattapaglia e Machado (1998), o efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* é no alongamento das partes aéreas.

O aumento do tamanho da muda proveniente da cultura de tecidos é de interesse prático, pois em razão do seu tamanho reduzido, o manuseio torna-se mais difícil e o tempo para a produção comercial da muda é prolongado (HOFFMANN et al., 2001).

Tabela 4 – Comprimento das brotações (cm) obtido na multiplicação *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC, em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP e AG₃.

Comprimento das brotações (cm)			
Concentrações AG ₃ (mg dm ⁻³)	Concentrações BAP (mg dm ⁻³)		
	0,0	0,6	1,2
0,0	2,18 a A	2,18 a B	1,61 b A
0,5	1,84 b A	2,27 a B	1,78 b A
1,0	2,01 b A	2,72 a A	1,68 b A
CV (%) = 9,132			

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem pelo teste estatístico de Tukey a 5%.

3.2.2 Efeito das concentrações de BAP na indução das brotações

Verificou-se efeito significativo para o fator concentração de BAP para todas as variáveis analisadas, exceto para comprimento das brotações, a qual apresentou uma média de 1,52cm (Apêndices 10 e 11) (Fig. 9).



Figura 9 – Brotações de *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC, obtidas na multiplicação *in vitro*, em meio de cultivo acrescido de 0,3mg dm⁻³ de BAP.

Para as variáveis número de brotações por explante e número de nós por brotação, observou-se uma resposta quadrática, com ponto de máxima na concentração de 0,71mg dm⁻³ de BAP, com 3,1 brotações por explante (Fig. 10A) e 3,24 nós por brotação formada (Fig. 10B). Em contrapartida, estudos realizados por Vinterhalter e Neskovic (1992) e Ramos et al. (1996) demonstraram que as concentrações de 2,03mg dm⁻³ de BAP, em combinação com 0,1mg dm⁻³ de AIB, e

2,37mg dm⁻³ de BAP propiciaram os melhores resultados na multiplicação *in vitro* de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MA e o porta-enxerto de tangerineira 'Sunki', respectivamente.

Entretanto, observou-se uma tendência linear crescente para a porcentagem de vitrificação, obtendo 100% de explantes vitrificados com 1,2mg dm⁻³ de BAP (Fig. 10C). Dados semelhantes foram encontrados por Barbosa (2006), em estudos com morangueiros 'Burkley' e 'Dover' na concentração de 3,0mg dm⁻³ de BAP. De acordo com Santos-Serejo et al., (2006), a ocorrência de vitrificação pode estar associada a diversos fatores, entre eles a aplicação exógena de BAP ao meio de cultivo.

Alguns artifícios foram utilizados no decorrer deste trabalho para reduzir a vitrificação, como uso de carvão ativado, redução da concentração de nitrogênio no meio de cultivo, utilização de tampas plásticas para vedação dos frascos e aumento na concentração de ágar, porém nenhum destes foi eficiente no controle deste distúrbio fisiológico.

Sendo assim, torna-se necessário estudar novas alternativas de cultivo, principalmente para a cv. MC, pois, muito embora não se tenha apresentado uma análise conjunta dos dois porta-enxertos, verificou-se que o cultivo realizado em condições similares, 'Adams' é mais exigente na adição de BAP na fase de multiplicação, comparado ao 'MC', sendo este último mais suscetível à vitrificação.

Segundo Grattapaglia e Machado, (1998), a vitrificação pode estar relacionada com a concentração de nitrogênio. No meio WPM o nitrogênio está presente em sua composição, porém em uma concentração total mais baixa em relação ao meio MS. Então, sugere-se experimentos utilizando este meio de cultivo, bem como baixas concentrações de citocininas a partir do primeiro cultivo. Outro fator de tratamento que poderá ser utilizado refere-se ao aumento nas concentrações de sacarose, pois segundo Fortes (1991) uma baixa relação C/N pode levar a um aumento na vitrificação das brotações. Para Zimmerman (1988), as necessidades das cultivares dentro de uma mesma espécie são diferentes, havendo necessidade de modificação do meio e concentrações de citocinina.

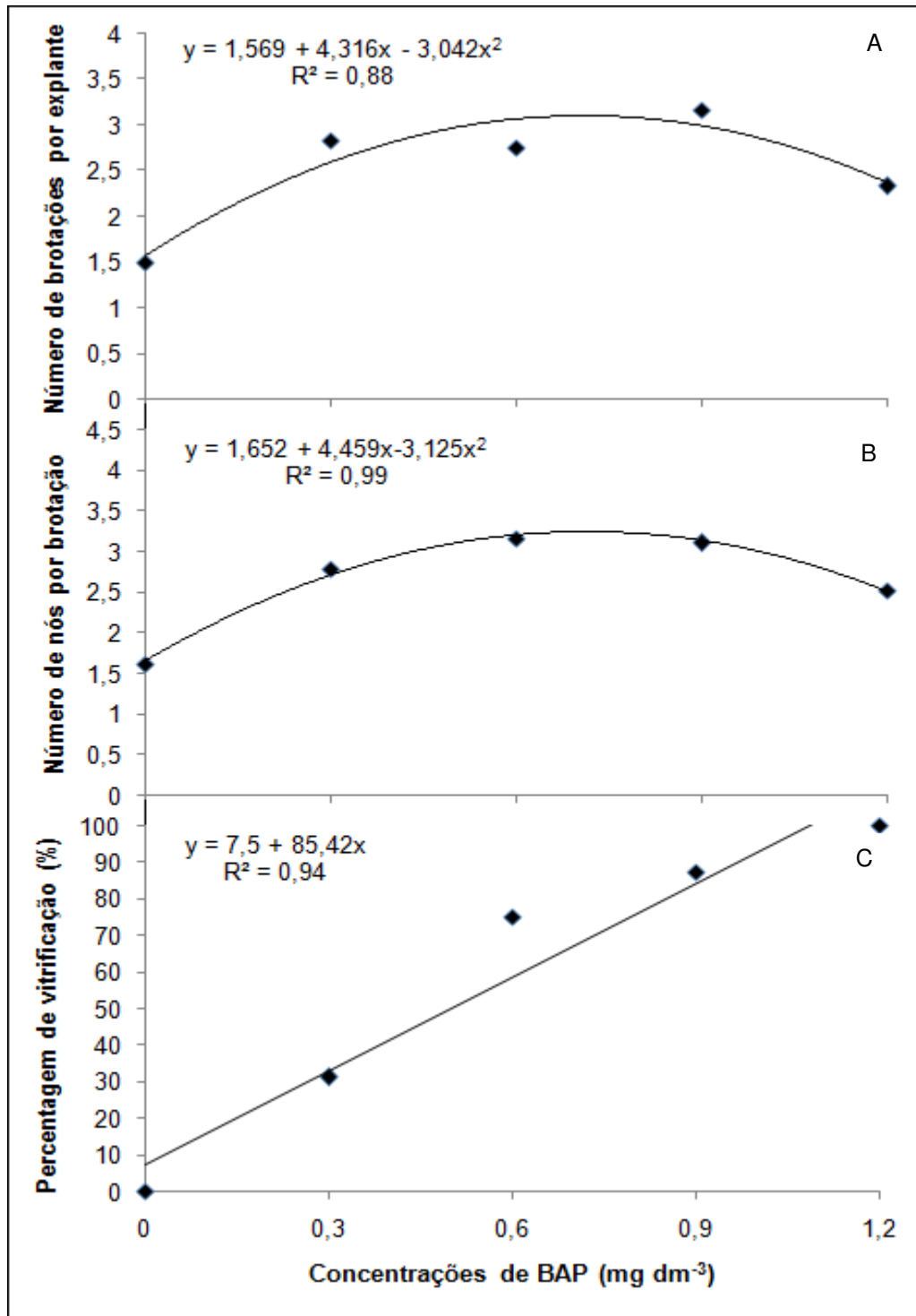


Figura 10 – Número de brotações por explante (A), número de nós por brotação (B) e porcentagem de vitrificação (%) (C) de *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC, obtidos em meio de cultivo acrescido de diferentes concentrações de BAP.

4 Conclusões

Com base nos resultados obtidos no decorrer deste trabalho torna-se possível concluir que:

- O meio MS contendo $\frac{3}{4}$ da concentração de nitrogênio é o mais adequado para a multiplicação *in vitro* da cv. Adams;
- A adição de BAP no meio de cultivo (0,6 e 0,3mg dm⁻³, respectivamente) proporciona incremento na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos 'Adams' e 'MC';
- A adição combinada de BAP e AG₃ (0,6 e 1,0mg dm⁻³, respectivamente) ao meio de cultivo proporciona incremento no número de brotações por explante e no alongamento das brotações do porta-enxerto Adams;
- 'Adams' é mais responsivo à multiplicação *in vitro* do que 'MC';
- 'MC' é mais suscetível à vitrificação que 'Adams';
- Ainda se fazem necessários estudos referentes à multiplicação *in vitro* do porta-enxerto 'MC', para serem estabelecidos meio e concentração de regulador de crescimento adequados.

CAPÍTULO 2 – Regeneração *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams e MC.

1 Introdução

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) vem sendo utilizado, em muitos países, como porta-enxerto para pereira (*Pyrus* spp.), com o objetivo de obter plantas de pequeno porte, rápida frutificação (PREVIATI et al., 2002) e maior uniformidade dos pomares (LEITE, 1992). Além destas características, segundo 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 colheita dos frutos, na resistência a inúmeras pragas e doenças, bem como na capacidade de adaptação da planta às condições edafoclimáticas desfavoráveis, preservando as características fundamentais das copas desejadas.

Recentemente, no Brasil, houve um grande interesse pelo uso de porta-enxertos de marmeleiro para cultura da pereira, entretanto, os genótipos utilizados com maior frequência foram introduzidos de outros países devido à carência de trabalhos de melhoramento que busquem selecionar novos genótipos com potencial para porta-enxertos, principalmente pela falta de bancos de germoplasma com ampla variabilidade. Sendo assim, a indução de variação somaclonal ou a transformação genética a partir de cultivares disponíveis são estratégias viáveis para obtenção de novos porta-enxertos.

Estas estratégias para obter variação podem ser viabilizadas pelo cultivo *in vitro* de tecidos ou células, em meios de cultura especificamente ajustados para os objetivos que se pretende atender.

A cultura de tecidos é uma das técnicas de biotecnologia que possibilita a produção em larga escala de genótipos superiores livres de pragas e doenças (ZIMMERMANN; FORDHAM, 1985). Por meio dela, alguns protocolos regenerativos

foram estabelecidos para vários porta-enxertos de marmeleiro (DOLCET-SANJUAN et al., 1991; BAKER; BHATIA, 1993; D'ONOFRIO; MORINI, 2003/4; D'ONOFRIO; MORINI, 2005; STANIENE, STANYS, 2004; ERIG; SCHUCH, 2005; MINGOZZI; MORINI, 2009). Desta forma, células, tecidos ou órgãos com intensidade variada de determinação, podem adquirir novas competências por meio da ação de determinados sinais químicos, que podem ser reguladores de crescimento, pois estes ativam seletivamente determinados genes, os denominados epigenes (GUERRA; NODARI, 2006).

A regeneração ou morfogênese *in vitro* é o processo de formação de órgãos, podendo ocorrer através da embriogênese somática ou organogênese. Na organogênese *in vitro* vários são os fatores que a influenciam, entre eles, a espécie, a cultivar, o tipo de explante, os componentes nutricionais do meio de cultura, os fitorreguladores, o ambiente de cultivo, e também fatores inerentes ao material vegetal, como o estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem (ERIG; SCHUCH, 2005; MANTOVANI et al., 2001). A escolha do melhor explante é, geralmente, em função da sua capacidade de regeneração *in vitro* (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Na regeneração de plantas lenhosas, geralmente os explantes mais utilizados são folhas e entrenós de plantas desenvolvidas *in vitro*, como mostram os trabalhos de Cassana et al. (2007) e Pérez-Tornero et al. (2000a). Diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* são encontradas ao se variar 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). O thidiazuron (TDZ), um composto do grupo das feniluréias com atividade de citocinina, pode ser utilizado com sucesso na regeneração de plantas lenhosas (CHEVREAU et al., 1989).

A eficiência do sistema de cultura de tecidos *in vitro* é indispensável quando se quer fazer melhoramento genético vegetal por métodos não sexuais, como a transformação genética, pois um dos pré-requisitos é o estabelecimento de um protocolo de organogênese eficiente, de modo que as células ou tecidos regenerem novas plantas (SARWAR; SKIRVIN, 1997; YANCHEVA et al., 2003; RAO et al., 1996).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de regeneração a partir de folhas de brotações cultivadas *in vitro* dos porta-enxertos de

Cydonia oblonga, cvs. Adams e MC, para futuros trabalhos de transformação genética.

2 Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, durante o período de outubro 2008 a janeiro de 2010. Como fonte de explantes foram utilizadas folhas provenientes de brotações de porta-enxertos de *Cydonia oblonga* Mill., cultivares Adams e MC, cultivadas *in vitro*, durante 40 dias, em meio de multiplicação composto pelo meio MS modificado ($\frac{3}{4}$ da concentração normal de NH_4NO_3 e KNO_3 e Ferro na forma de EDTA-Férrico), suplementado de $0,6\text{mg dm}^{-3}$ de BAP. Em todos os experimentos, as folhas foram escarificadas no limbo e na nervura central e colocadas com a face abaxial em contato com o meio de cultivo.

Os estudos foram conduzidos em diversos experimentos, todos com o objetivo de verificar a influência de diferentes concentrações de TDZ sobre a indução de regeneração *in vitro* dos porta-enxertos 'Adams' e 'MC', os quais foram estudados em conjunto, com exceção do Experimento 6 (no qual foi utilizada somente a cv. Adams), conforme segue.

2.1 Experimento 1

Foram utilizados como explantes iniciais folhas inteiras, inoculados em placas de Petri contendo meio MS, suplementado com TDZ (0, 1, 2 e 3mg dm^{-3}), ANA (ácido naftaleno acético) ($0,1\text{mg dm}^{-3}$), mio-inositol (100mg dm^{-3}), sacarose (30g dm^{-3}) e solidificados com Gelrite ($1,8\text{g dm}^{-3}$), após o pH ter sido ajustado para 5,8.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, permanecendo no escuro por 40 dias. Posteriormente, foram transferidos para meio MS contendo $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ e colocados na luz ($48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons e fotoperíodo de 16 horas), onde foram mantidos por mais 30 dias. Aos 70 dias após a inoculação avaliou-se a percentagem de explantes regenerados, número de brotações por explante regenerante e tipo de organogênese formada. Gemas e brotações incipientes menores que 3 milímetros foram desconsideradas neste trabalho, por serem muito pequenas e de difícil manuseio.

As brotações formadas após o período de 70 dias foram repicadas e inoculadas em meio de multiplicação MS modificado ($\frac{3}{4}$ da concentração normal de NH_4NO_3 e KNO_3 e Ferro na forma de EDTA-Férrico), suplementado de $0,6\text{mg dm}^{-3}$ de BAP.

2.2 Experimento 2

Folhas inteiras, sem pecíolo, foram inoculadas em meio MS, contendo concentrações de TDZ (0, 1, 2, 3 e 4mg dm^{-3}) e ANA ($0,1\text{mg dm}^{-3}$), sendo que a composição básica do meio, as condições de cultivo e as variáveis analisadas foram as mesmas do experimento anterior (2.1).

2.3 Experimento 3

O material vegetal, folhas inteiras com pecíolo, foi inoculado em meio MS, com TDZ (0, 1, 2, 3 e 4mg dm^{-3}) e ANA ($0,1\text{mg dm}^{-3}$). A composição básica do meio, bem como as condições de cultivo e as variáveis analisadas foram as mesmas do primeiro experimento (2.1).

2.4 Experimento 4

Como explantes iniciais foram utilizados terços basais de folhas jovens, com pecíolo, inoculados em meio MS, suplementado com TDZ (0, 1, 2, 3 e 4mg dm^{-3}) e ANA ($0,1\text{mg dm}^{-3}$). A composição básica do meio, bem como as condições de cultivo e as variáveis analisadas foram as mesmas do primeiro experimento (2.1).

2.5 Experimento 5

Folhas adultas inteiras, com pecíolo, foram inoculadas em meio MS, contendo TDZ (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e $0,8\text{mg dm}^{-3}$) e ANA ($0,1\text{mg dm}^{-3}$), sendo que a composição básica do meio, bem como as condições de cultivo e as variáveis analisadas foram as mesmas do primeiro experimento (2.1).

2.6 Experimento 6

Terços basais de folhas adultas da cultivar Adams, com pecíolo, foram inoculados em meio MS, com TDZ (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e $0,8\text{mg dm}^{-3}$) e ANA ($0,1\text{mg dm}^{-3}$). A composição básica do meio, bem como as condições de cultivo e as variáveis analisadas foram as mesmas do primeiro experimento (2.1).

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

Todos experimentos foram conduzidos com o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo o primeiro (2.1), o segundo (2.2) e o terceiro (2.3) com três repetições por tratamento e cada unidade experimental constituída por uma placa contendo 10 explantes; o quarto experimento (2.4) com 4 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental uma placa contendo 10 explantes e o quinto e sexto experimentos (2.5 e 2.6) contendo 3 repetições por tratamento, com cinco explantes por unidade experimental. Os experimentos 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, e 2.5 foram bifatoriais, compostos pelos fatores cultivar (MC e Adams) e concentração de TDZ com quatro níveis (0, 1, 2 e 3mg dm^{-3}) no primeiro experimento, cinco níveis (0, 1, 2, 3 e 4mg dm^{-3}) no segundo, terceiro e quarto experimentos e também cinco níveis (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e $0,8\text{mg dm}^{-3}$) no quinto experimento. Já o sexto experimento foi composto por um fator de tratamento, sendo avaliado o fator concentração de TDZ com cinco níveis (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e $0,8\text{mg dm}^{-3}$).

Para análise estatística, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, ou analisados por regressão polinomial, utilizando o Software Sanest (ZONTA; MACHADO, 1984). Dados do número de brotações por explante regenerado foram transformados segundo $(x+0,5)^{1/2}$ e dados expressos em percentagem foram transformados em arco seno de $(x/100)^{1/2}$, onde x é o número obtido. Entretanto, para a variável tipo de organogênese formada foi realizada apenas a análise descritiva.

3 Resultados e Discussão

3.1 Experimento 1

Após análise de variância dos dados verificou-se interação significativa para as variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante (Apêndice 12).

A cultivar Adams apresentou 16,66% de explantes regenerados na concentração de $3,0\text{mg dm}^{-3}$, não ocorrendo regeneração em concentrações inferiores (Fig. 1A). Em contrapartida, a cultivar MC apresentou uma resposta quadrática, com ponto de máxima na concentração de $1,6\text{mg dm}^{-3}$, com 9,2% de explantes regenerados.

Ibrahim e Deberg (2001) observaram que os melhores resultados de regeneração para rosa (*Rosa hybrida* L.) foram obtidos em meio MS contendo 1,5mg dm⁻³ de TDZ e 0,1mg dm⁻³ de AIB no escuro por 7 dias e após transferidos para meio MS com 0,5mg dm⁻³ de BAP e 0,1mg dm⁻³ de AIB. Para esses autores, a calogênese foi significativamente afetada pela duração da cultura no escuro, concentração de TDZ no meio de indução como também pelo genótipo.

Martinelli et al. (2009), em estudos com o porta-enxerto de pereira 'Pyrodwarf', obtiveram 65% de explantes regenerados utilizando 3,3mg dm⁻³ de TDZ e 0,2mg dm⁻³ de ANA, sendo que os explantes foram mantidos por 3 semanas no escuro. Porém Erig e Schuch (2003), trabalhando com folhas de pereira (*Pyrus communis* L.), não obtiveram a regeneração de brotações com o uso de TDZ nas concentrações de 2,0 ou 2,93mg dm⁻³, independentemente do tempo de permanência no meio de cultura. Segundo Hulme et al. (1992), a influência do genótipo na regeneração de plantas tem sido relatado em diversas espécies.

Para a variável número de brotações por explante regenerante, o porta-enxerto Adams apresentou uma média de 4,75 brotos na concentração em que ocorreu regeneração (3mg dm⁻³ de TDZ). Entretanto, o porta-enxerto MC apresentou uma resposta quadrática, com o ponto de máxima na concentração de 1,57mg dm⁻³ de TDZ, com uma média de 3,03 brotos formados (Fig. 1B). Para estas mesmas cultivares, resultados similares foram obtidos por Erig e Schuch (2005), que registraram uma média de 1,2 brotos por explante com a utilização de 1,32mg dm⁻³ de TDZ. Ibrahim e Debergh (2001) obtiveram 3,8, 2,4 e 2,6 brotações por explante, nas cultivares de roseira RUI 317, RUI 319 e Inka, respectivamente, adicionando 1,5mg dm⁻³ de TDZ no meio de cultura. Entretanto, D'Onofrio e Morini (2005), com 1,0mg dm⁻³ de TDZ e 0,1mg dm⁻³ de ANA observaram a formação de 11 brotos por explante, em estudos com o marmeleiro, cv. BA 29.

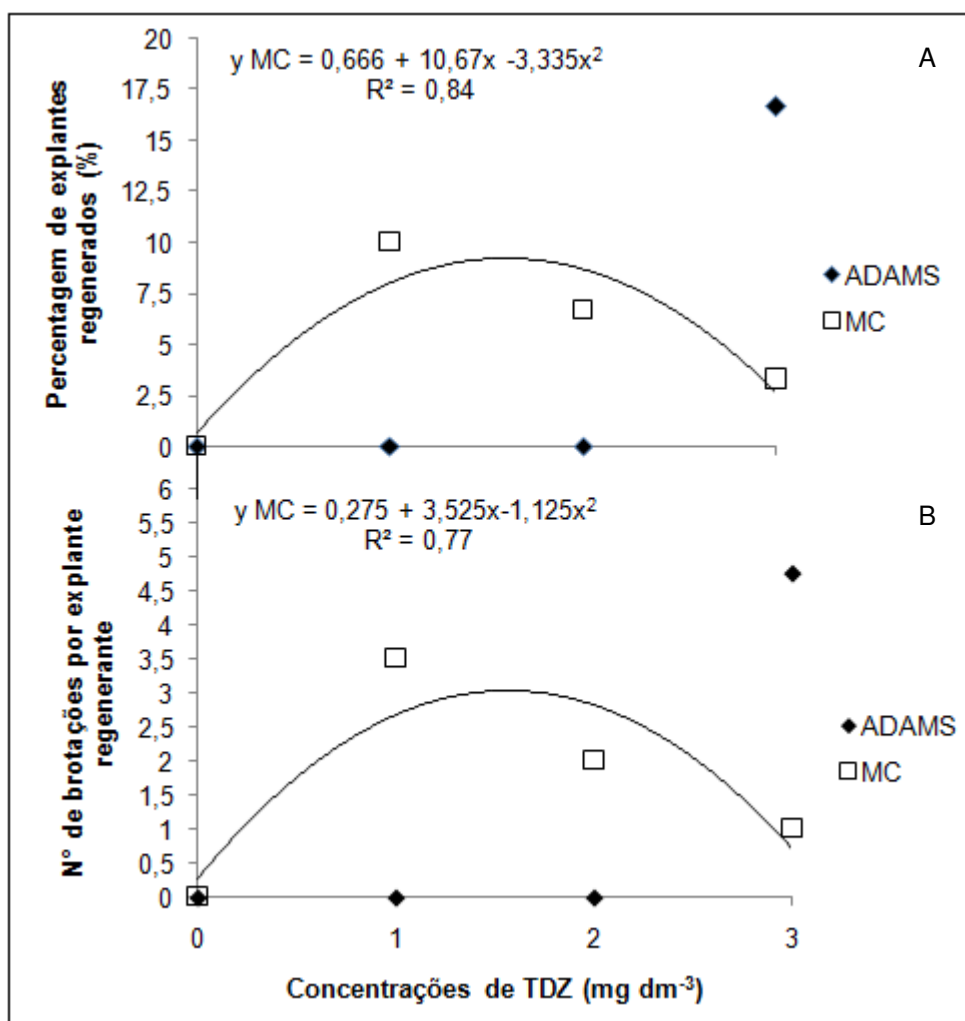


Figura 1 – Percentagem de explantes regenerados (%) (A) e número de brotações por explante regenerante (B), obtidos na regeneração *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams e MC, cultivados em meio contendo TDZ.

Na cv. Adams, 20% dos brotos regenerados desenvolveram-se a partir de calos friáveis presentes na base do explante e 80% a partir da formação de gemas na base do explante, na região do pecíolo, sem a prévia formação de calos, ou seja, originando-se por organogênese direta, como pode ser visualizado na Fig. 2.

Dubois e De Vries (1995), utilizando meio MS^{1/2} suplementado de 1,5mg dm⁻³ de TDZ e 0,05mg dm⁻³ de ANA, induziram regeneração direta em brotos adventícios de folhas de rosa das cultivares Madelon, Only Love, Presto, Sonia e Tineke, dados estes que condizem com os encontrados neste trabalho.

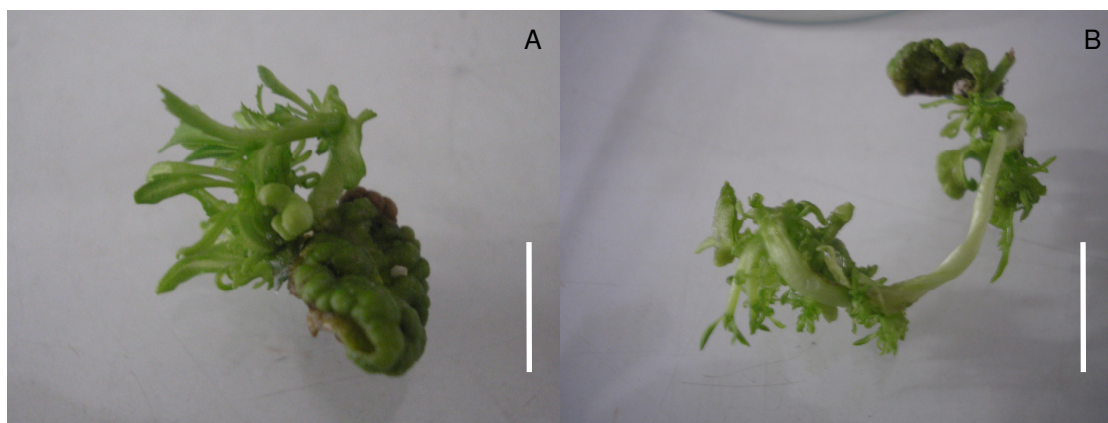


Figura 2 – Organogênese direta de *Cydonia oblonga* Mill., cultivar Adams, aos 70 dias de cultivo. Barra = 1cm.

Na cultivar MC, observou-se que 50% dos brotos regenerados foram oriundos de calos situados na base do explante e o restante (50%) provenientes de regeneração direta do tecido vegetal, também na base dos explantes, como pode ser visualizado na Fig. 3A e 3B, respectivamente. A concentração de TDZ e a duração do período de escuro também foram essenciais para a formação de calos a partir de folha de macieira da cultivar Orine (GAMAGE et al., 2000), pois a formação de calos é considerada uma forma potencial de propagação em massa (LANDA et al., 2000), embora este processo aumente o tempo para a regeneração e o risco de variação somaclonal (TAO et al., 1997).

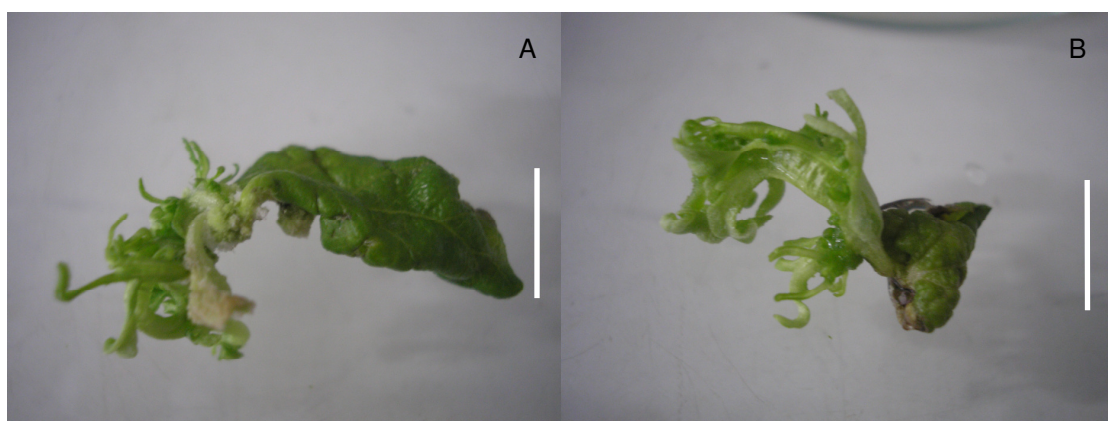


Figura 3 – Organogênese indireta (A) e direta (B) de *Cydonia oblonga* Mill., cultivar MC, aos 70 dias de cultivo. Barra = 1cm.

3.2 Experimento 2

Verificou-se interação entre os fatores para as variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante (Apêndice 15).

Conforme pode ser observado na Fig. 4A, ocorreu, na cultivar Adams, 9,5% de explantes regenerados somente na concentração de $2,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ, enquanto que na cultivar MC observou-se, em resultados absolutos, 26% de explantes regenerados na concentração de $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ, porém, estatisticamente, apresentou uma resposta quadrática, com ponto de máxima na concentração de $2,17\text{mg dm}^{-3}$, com 22,08% de explantes com capacidade organogênica. Esses resultados foram pouco expressivos se comparados aos de Erig e Schuch (2005), que trabalhando com as cultivares Adams e MC, conseguiram alta percentagem de regeneração de brotos a partir de explantes foliares (45,29%) com a utilização de $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ e D'Onofrio e Morini (2005), que obtiveram 100% de regeneração com a cv. BA 29, utilizando $1,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ e $0,1\text{mg dm}^{-3}$ de ANA. Estes resultados tão discrepantes podem estar relacionados às condições de cultivo, ao tempo de permanência nos meios de indução e expressão ou à idade dos explantes utilizados, pois Thorpe e Patel (1984) concluem que no material jovem é mais fácil de ocorrer a formação de órgãos *in vitro*, devido às células de folhas jovens terem maior atividade metabólica, com maior responsividade hormonal e nutricional, podendo melhorar a organogênese.

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 'MC' obteve uma resposta quadrática, com ponto de máxima na concentração de $2,8\text{mg dm}^{-3}$, com 2,31 brotações por explante (Fig. 4B). Já Pérez-Tornero et al. (2000a) e Feijó (2002), em estudos de regeneração de folhas de damasqueiro, cv. Helena e do porta-enxerto de macieira, cv. M-9, obtiveram o maior número médio de brotações na concentração de $2,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ e de BAP, respectivamente.

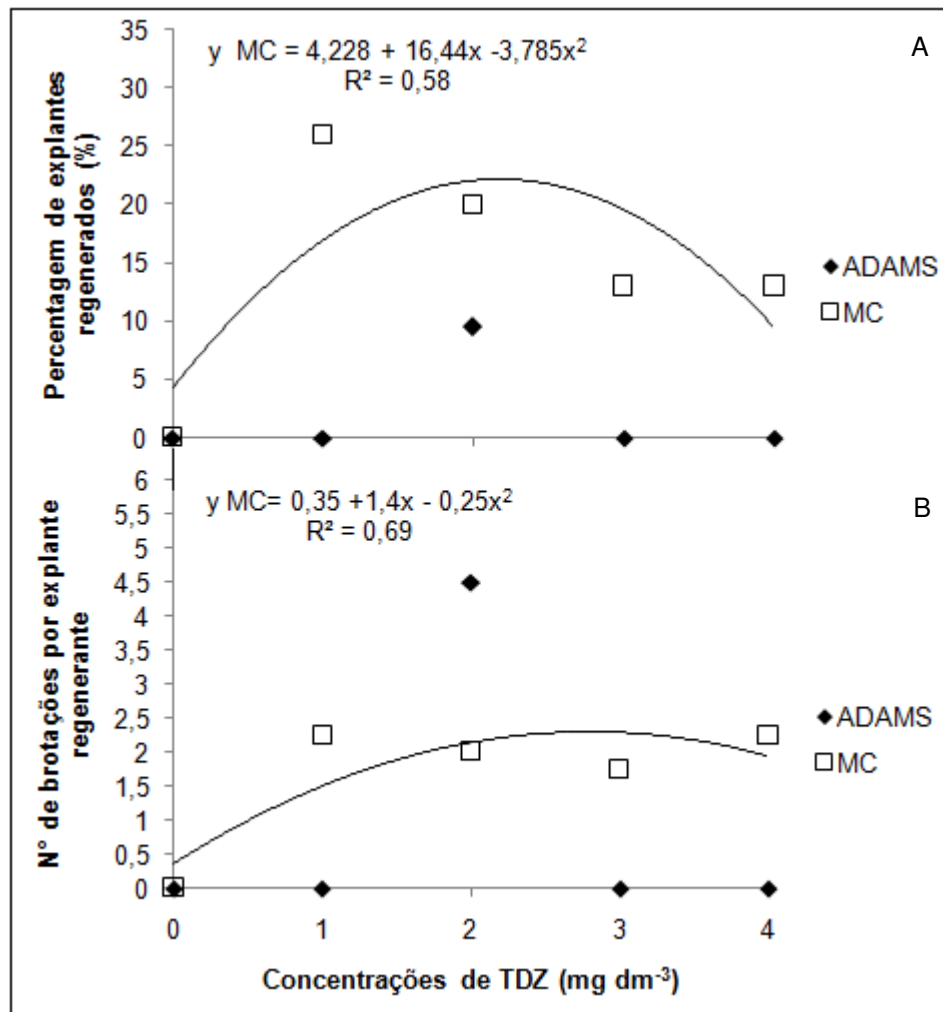


Figura 4 – Percentagem de explantes regenerados (%) (A) e número de brotações por explante regenerante (B), obtidos na regeneração *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams e MC, sob diferentes concentrações de TDZ.

Conforme pode ser observado na Fig. 5, o porta-enxerto Adams apresentou 66,67% de explantes cuja regeneração deu-se de forma direta, sendo o restante a partir da formação de calos, ou seja, de forma indireta, todos formados na parte basal do explante foliar. Para Handro e Floh (1990), a organogênese é controlada pela concentração de reguladores de crescimento e pelo balanço citocinina/auxina presentes no meio de cultura.

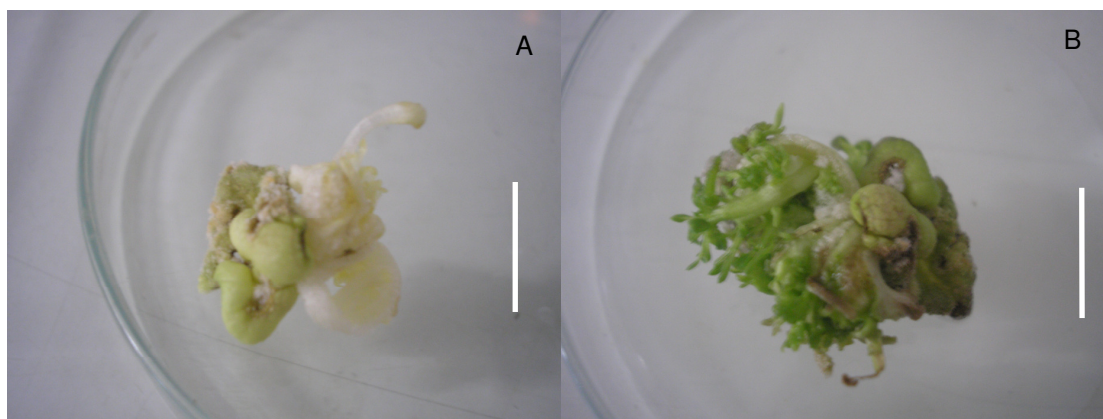


Figura 5 – Organogênese indireta em *Cydonia oblonga* Mill., cultivar Adams, aos 40 dias (A) e aos 70 dias de cultivo (B). Barra = 1cm.

Por sua vez, como pode ser visualizado na Fig. 6, o porta-enxerto MC desenvolveu estruturas organogênicas sem a formação de calos em 59,09% dos explantes regenerados (A). Em contrapartida, apresentou 40,91% desenvolvidos a partir da formação destes (B). A regeneração ocorreu na porção basal dos explantes. Estudos realizados por Alves et al. (2004), quando se utilizou folhas como fonte de explantes de clones micropropagados de *Eucalyptus sp.*, demonstraram que a regeneração de gemas ocorre na região basal da folha, assim como Hervé et al. (2001), os quais também observaram organogênese oriunda da base de explantes foliares de *Eucalyptus gunnii*.

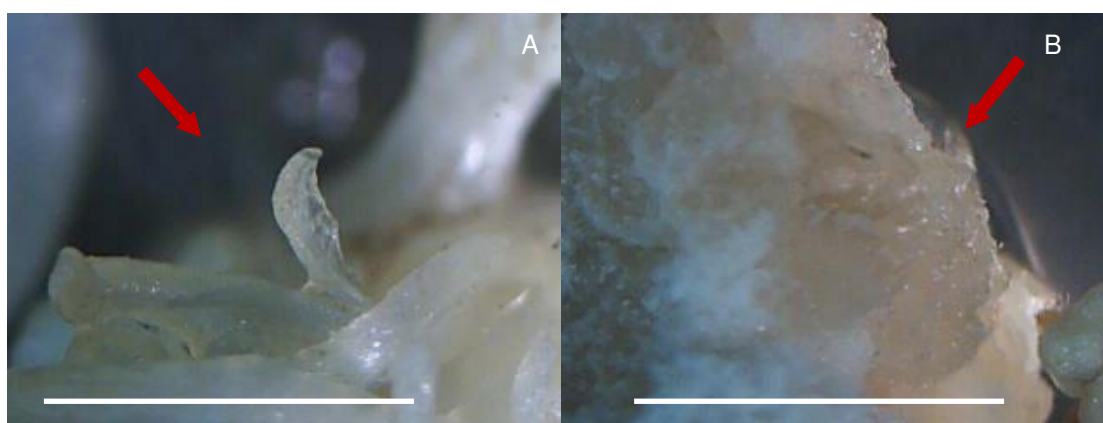


Figura 6 – Regeneração em *Cydonia oblonga* Mill., cultivar MC: Organogênese direta (A) e indireta (B) aos 40 dias de cultivo. Barra = 0,5cm.

3.3 Experimento 3

Houve efeito isolado dos fatores para as variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante. (Apêndice 18).

Em relação à percentagem de explantes regenerados, a adição de TDZ ao meio de cultivo resultou numa tendência linear crescente, com maior incremento na concentração de $4,0\text{mg dm}^{-3}$, com 10% de explantes regenerados (Fig. 7A). Schuch e Peters (2002), utilizando TDZ no meio de cultura, alcançaram uma maior percentagem de regeneração de folhas de macieira, cv. Gala, na concentração de $4,0\text{mg dm}^{-3}$, enquanto De Bondt et al. (1996) obtiveram um melhor resultado com $5,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ no meio de cultivo, também para a regeneração de explantes foliares de macieira, porém cultivar Jonagold.

Dolcet-Sanjuan et al. (1991), em estudos de regeneração de marmeleiro, obtiveram 48% de regeneração utilizando meio de cultura suplementando $7,05\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ e $0,55\text{mg dm}^{-3}$ de ANA, assim como Staniene e Stanys (2004), que conseguiram 33,3% de explantes regenerados no marmeleiro 'K19', com o uso de $7,05\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ.

De acordo com a Fig. 7B, obteve-se uma resposta linear crescente para a variável número de brotações por explante regenerante, com 2,25 brotações na concentração de $4,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ. Conforme acima citado, dados semelhantes foram obtidos por Schuch e Peters (2002), os quais obtiveram o maior número de brotações por explante de macieira cv. Gala utilizando $4,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ no meio de cultivo. Entretanto, Martinelli et al. (2009), em estudos realizados com o porta-enxerto de pereira 'Pyrodwarf', obtiveram a maior formação de brotações por explante regenerante utilizando a concentração de $3,3\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ.

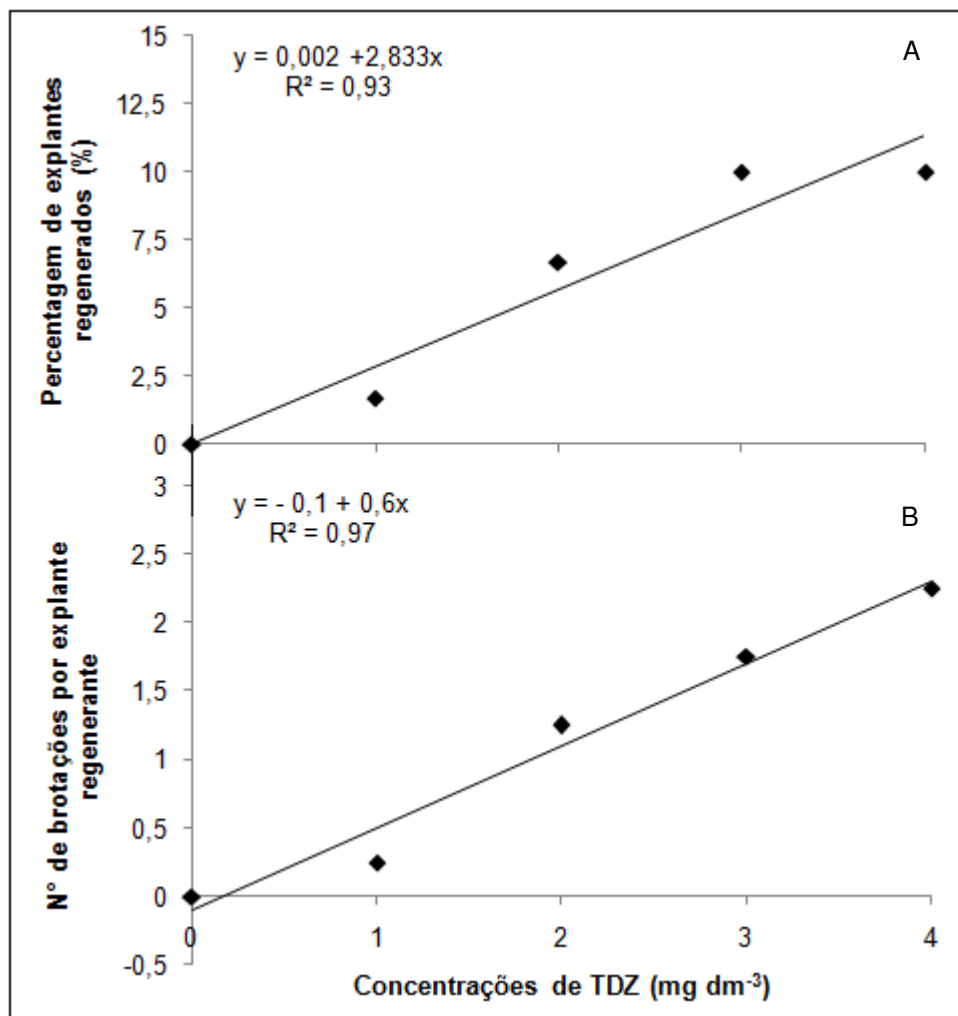


Figura 7 – Percentagem de explantes regenerados (%) (A) e número de brotações por explante regenerante (B), obtidos na regeneração *in vitro* de *Cydonia oblonga* Mill., cvs. Adams e MC, cultivados em meio contendo TDZ.

Observando-se os explantes com capacidade organogênica, na cultivar Adams verificou-se 100% de brotações de forma direta e na base do explante (como pode ser visualizado na Fig. 8A), enquanto que na cultivar MC esta ocorreu de forma direta e na base do explante em 75% dos explantes foliares (Fig. 8B), seguidas de 25% originados de forma indireta, sendo que destes, 16,67% tiveram origem na base foliar e o restante a partir da escarificação do limbo.

Em trabalhos realizados por Vighi (2003), utilizando gemas axilares e entrenós de mini-roseira, cv. Mínima, observou-se somente regeneração direta, ou seja, a partir de tecidos do explante, e 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, 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). Por outro lado, se o objetivo é a transformação genética, a regeneração direta é preferível, a fim de evitar variação genética.

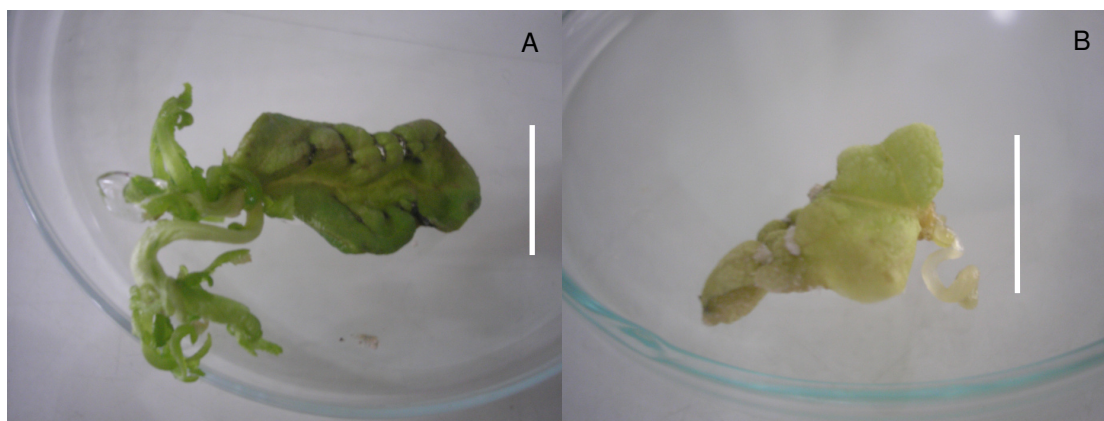


Figura 8 – Organogênese direta em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams aos 70 dias de cultivo (A) e cv. MC aos 40 dias de cultivo (B). Barra = 1cm.

3.4 Experimento 4

Os explantes do porta-enxerto Adams, nas condições em que foi desenvolvido o experimento, não desenvolveram nenhuma estrutura organogênica. Resultados semelhantes foram descritos por Faria (1996), em relação ao porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’, o qual praticamente não regenerou.

Para o porta-enxerto MC, de acordo com a análise de variância, não houve efeito significativo para o fator concentração de TDZ nas variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante (Apêndice 19). Obteve-se regeneração de apenas 0,5% de explantes foliares na concentração de $3,0\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ, sendo que este apresentou, aos 70 dias de cultivo, três brotos, correspondendo a uma média de 0,15 brotos por explante regenerante.

Em trabalhos realizados com damasqueiro, Pérez-Tornero et al. (2000a) observaram que houve 60% de regeneração para a cv. Canino, e que para as cvs. Loma e Bulida não houve regeneração. Isto pode justificar os resultados encontrados no presente trabalho, pois a morfogênese é influenciada por vários fatores, entre eles: espécie, cultivar, tipo de explante, componentes nutricionais do meio de cultura, reguladores de crescimento e ambiente de cultivo (RAO et al., 1996).

Como pode ser observado na Fig. 9, a cv. Adams apresentou somente formação de alguns calos não friáveis (A), e a cv. MC organogênese indireta, oriunda da base do explante foliar (B). Segundo Guerra et al. (1999), a interação entre os reguladores de crescimento, o explante e as condições de cultivo determinam a morfogênese do tecido, conduzindo a uma organogênese que pode ser tanto direta como indireta.

No presente experimento, essa baixa taxa de regeneração poderá estar associada ao tamanho dos explantes, composto por terços basais foliares, pois explantes constituídos por folhas inteiras apresentaram capacidade organogênica nos demais experimentos, quando submetidos às mesmas concentrações de TDZ.

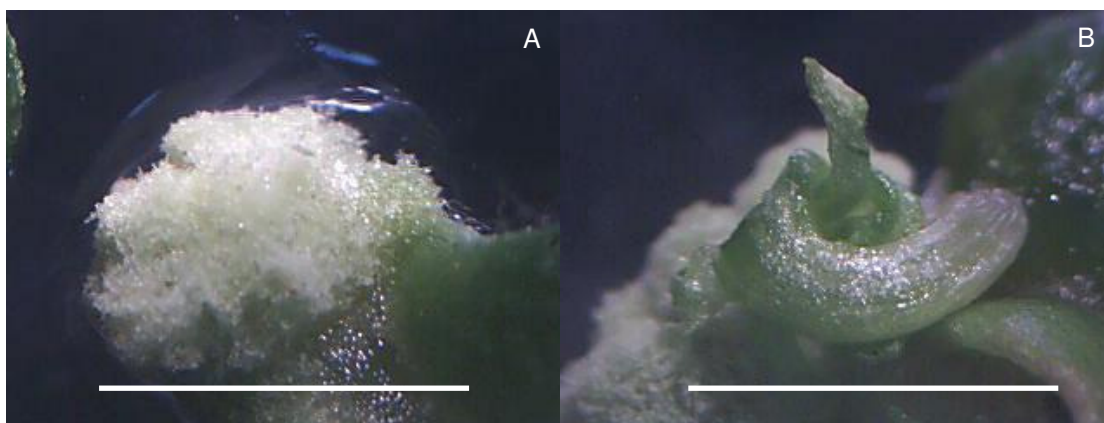


Figura 9 – Formação de calos não friáveis na base de explantes foliares da cv. Adams (A) e organogênese indireta na base de explantes da cv. MC (B), aos 60 dias de cultivo. Barra = 0,5cm.

3.5 Experimento 5

Neste experimento, a cultivar Adams não apresentou capacidade regenerativa nas concentrações de TDZ testadas. Utilizando concentrações similares, Baker e Bhatia (1993) obtiveram os melhores resultados de regeneração com $0,33\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ e $0,46\text{mg dm}^{-3}$ de ANA, em discos foliares do marmeleiro 'A', enquanto que Shibli e Smith (1996), conseguiram 75% de regeneração em explantes foliares de mirtilo com a utilização de $0,6\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ no meio de cultura. Segundo Pérez-Tornero et al. (2000a), estas diferenças entre os genótipos tornam necessário o estudo individualizado para cada cultivar.

Quando trabalhou-se com a cultivar MC, não houve diferenças significativas para as variáveis percentagem de explantes regenerados e número de brotações por explante (Apêndice 20). Obteve-se 33,33% de explantes regenerados na

concentração de $0,6\text{mg dm}^{-3}$ (Figura 10D) e 66,67% de explantes regenerados com $0,8\text{mg dm}^{-3}$, correspondendo a uma média de 4% de explantes regenerados e 0,33 brotações por explante. Estes dados obtidos corroboram com os de Sarwar e Skirvin (1997), que utilizando TDZ em concentrações de $0,44$ e $0,66\text{mg dm}^{-3}$, regeneraram explantes foliares de macieira, cultivares McIntosh, Macspur e Wijcik. Já Staniene e Stanys (2004), em estudos de regeneração de folhas de marmeleiro, cvs. K11 e K16, obtiveram uma taxa regenerativa de 43,8% e 35%, respectivamente, com $2,2\text{mg dm}^{-3}$ de TDZ.

Verificou-se o desenvolvimento de 33,33% das estruturas organogênicas a partir de calos na base do explante, e os demais a partir de organogênese direta, sendo que um explante deu origem a duas estruturas, em locais e épocas diferentes, enquanto que o último apresentou formação de gemas na nervura central (Fig. 10A).

Em relação ao explante foliar que deu origem a duas estruturas, uma desenvolveu-se a partir da nervura central, 20 dias após ser inoculado no meio de cultivo, sendo que foi repicado para meio de multiplicação após 50 dias do início do experimento – MS modificado ($\frac{3}{4}$ da concentração normal de NH_4NO_3 e KNO_3 e Ferro na forma de EDTA-Férrico), suplementado de $0,6\text{mg dm}^{-3}$ de BAP –, devido seu tamanho avantajado (Fig. 10B e C), sendo que aos 70 dias apresentava três brotos (Fig. 10D). Em contrapartida, a outra estrutura formou-se 30 dias após o explante ser inoculado no meio de cultura, na escarificação do limbo, apresentando dois brotos aos 70 dias (Fig. 10E).

No que se refere à regeneração encontrada na nervura do explante, resultados semelhantes foram obtidos por Tang et al. (2002), os quais observaram que em folhas de cerejeira doce (*Prunus avium* L.) e cerejeira azeda (*Prunus cerasus* L.), algumas brotações surgiam a partir da nervura da folha ou em associação com o tecido vascular.

Segundo Tzifira et al. (1997), a organogênese direta é o sistema mais adequado, porém é mais difícil de se obter *in vitro*, para a regeneração de células transformadas, pois evita a formação de escapes e diminui a possibilidade de ocorrer variação somaclonal.

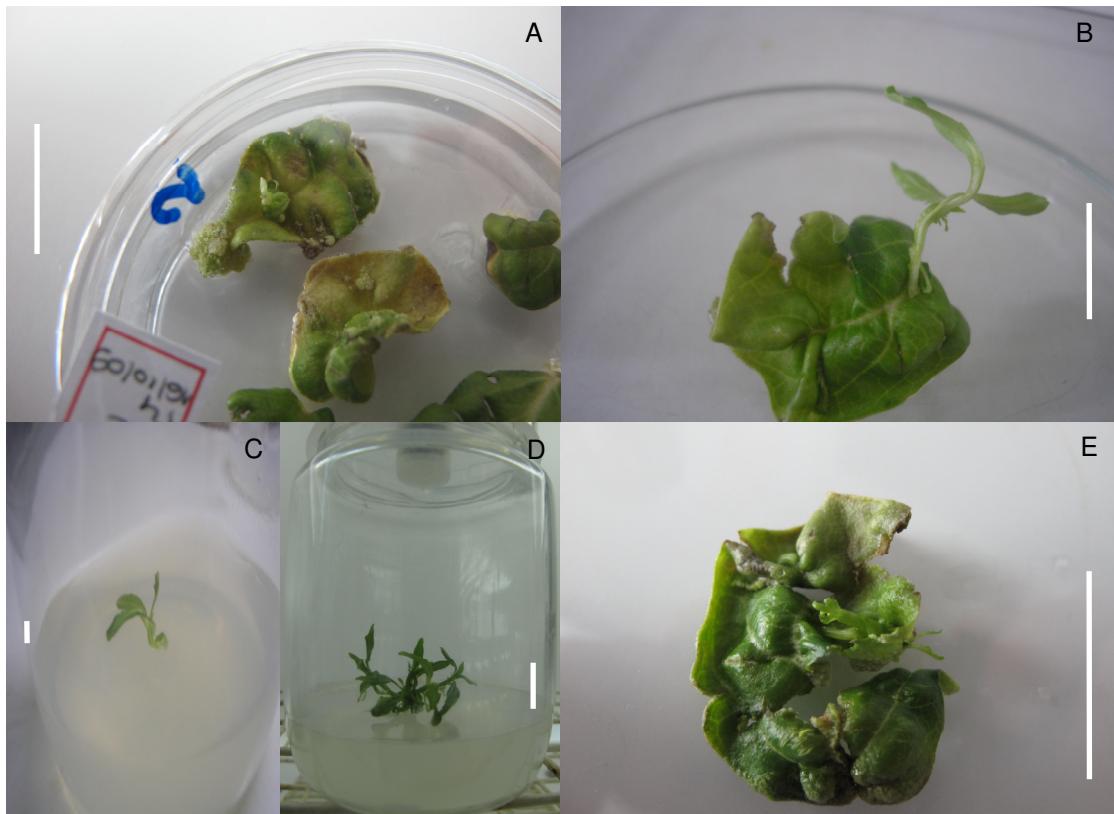


Figura 10 – Brotações regeneradas de *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC, desenvolvidas a partir da nervura central aos 70 dias de cultivo (A), nervural central aos 50 dias de cultivo (B), inoculadas em meio MS modificado aos 50 dias (C) e aos 70 dias de cultivo (D) e explante regenerado a partir de escarificações no limbo, aos 70 dias de cultivo (E). Barra = 1cm.

3.6 Experimento 6

Segundo Huetteman e Preece (1993) e Nayak et al. (1997), o TDZ tem sido utilizado para induzir a formação de brotações e calos em várias espécies de plantas, especialmente as lenhosas, mostrando-se mais efetivo que outros tipos de citocinina, como BAP e Cinetina (KIN) e em concentrações extremamente baixas, especialmente quando usado em concentração igual ou maior que $0,22\text{mg dm}^{-3}$.

Neste experimento não foi possível obter explantes regenerantes na cv. Adams, nem observou-se a formação de calos quando se utilizou baixas concentrações de TDZ. Yepes e Aldwinckle (1994) afirmaram que 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. Entretanto, dentre os fatores que podem estar envolvidos na falta de responsividade dos explantes, está o tamanho do explante, ou seja, terços basais, o que, de repente, pode estar relacionado à

quantidade de nutrientes e reguladores de crescimento disponíveis no explante para desencadear a organogênese, pois folhas inteiras demonstraram melhores resultados em experimentos anteriores.

De uma maneira geral, ainda se fazem necessários estudos referentes à adequação de um protocolo eficiente de regeneração de *Cydonia oblonga* Mill., cultivares Adams e MC, no que tange ao uso de concentrações mais elevadas de TDZ e diferentes citocininas no meio de cultivo, como BAP e KIN, além de testar diferentes explantes, principalmente para Adams.

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 e gemas axilares são mais regenerativas; o que está de acordo com trabalhos realizados por Vighi (2003), com mini-roseira, cv. Mínima, a qual observou melhor percentagem de regeneração para o explante gema axilar (57,62%), seguido do explante entrenó (1,78%), sendo que não houve regeneração para folhas. Erig (2002), trabalhando com pereira, cv. Carrick, também obteve a maior percentagem de regeneração para o explante gema axilar (90,6%), seguido de entrenó, com uma percentagem de regeneração de 36,4%.

4 Conclusões

Nas condições em que os diferentes experimentos de regeneração foram conduzidos, é possível concluir que:

- Os porta-enxertos estudados têm potencial para a regeneração *in vitro*;
- ‘MC’ é mais responsivo à regeneração, com a adição de TDZ no meio de cultivo, em relação ao ‘Adams’;
- A regeneração *in vitro* do marmeleiro ‘MC’ pode ser potencializada com o uso de 1mg dm^{-3} de TDZ no meio de indução;
- O explante folha inteira é mais responsivo à regeneração do que terços basais;
- A regeneração, em ambas cultivares, ocorre principalmente na região basal do explante;
- As cultivares Adams e MC regeneram tanto via organogênese direta como indireta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, E.; SOUZA, M. de; ALVARENGA, A. A. **A cultura do marmeleiro em Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1996. 23 p. (EPAMIG - Boletim técnico, 47).

ALVES, E. C. S. de C. **Organogênese *in vitro* na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.5, p.421-430, 2004.

AMMIRATO, P. V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, v.11, n.1, 1985. p.9-29.

ARENE, L.; PELLEGRINO, C.; GUDIN, S. A comparasion 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/Holanda, v.71, p.83-90, 1993.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p.261- 296.

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.

BARBOSA, L. M. P. **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro***. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BERARDI, G; INFANTE, R.; NERI, D. Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. From seedlings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.53, n.1-2, p.157-165, 1993.

BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de

imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.2, p.177-179, 2003.

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, v.2, 1999. p.679–735.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.2, ed.esp., p.1403-9, 2002.

CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, n.8, p.755-760, 2000.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa – CNPH, v.2, 1998. p.247-260.

CAMPBELL, J. Pear Rootstocks. The State of New South Wales, **NSW Agriculture**, Austrália, Agfact H4.1.15, 1.ed., 2003.

CARPUTO, D.; CARDI, T.; CHIARI, T.; FERRAILOLO, G.; FRUSCIANTE, L. 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.

CASSANA, F. F.; PINTO, L. da S.; POHL, S.; BIANCHI, V. J.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. 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.

CHANNUNTAIPAT, C.; SEDGLEY, M.; COLLINS, G. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan x Nemaguard. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.98, n.4, p.473-484, 2003.

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

COLOMBO, R. **Portinnesti del PERO, un modello vincente**, 2003. Disponível em: <<http://www.ermesagricoltura.it/rivista/2003/settembre/RA030972s.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

COUTO, M. **Propagação *in vitro* dos porta-enxertos híbridos de pessegueiro 'Barrier' e 'Cadman' (*Prunus* sp.)** 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DANTAS, A. C. de M.; NESI, A. N.; MACHADO, L. B.; HAERTER, J.; FORTES, G. R. de L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.1, p.19-23, 2002.

DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I.; GODERIS, I.; BROEKAERT, W. F. 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.

DONINI, L. P.; HIPÓLITO, J. de S.; RIBEIRO, M. de F., SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* de marmeleiro “MC” (*Cydonia oblonga* L.) sob diferentes qualidades de luz e BAP. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...**, Vitória, Espírito Santo, p.38, 2008.

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.

DUBOIS, L. A. M.; DE VRIES, D. P. Preliminary report on the direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of *in vivo* grown glass house rose cultivars. **Gartenbauwissenschaft**, Dordrecht, v.60, p.249–253, 1995.

DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E.; LAZAROFFI, W. R. Propagation “in vitro” of apple rootstock M.4: effect of phytohormones on shoot quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hange, v.4, p.55-60, 1985.

ERIG, A. C. **Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick, e avaliação da fidelidade genotípica por marcadores moleculares**. 2002. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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.

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.

FACHINELLO, J. C.; FRANCESCOTTO, P. Compatibilidade de enxerto e porta-enxerto de pereira. In: XI ENFRUTE (Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado), 28-30 jul. 2009, Fraiburgo, SC. **Anais...** Caçador: EPAGRI, v.1, p.33-42, 2009.

FARIA, J. T. C. **Calogênese e organogênese *in vitro* em porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido**. 1996. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitomelhoramento). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FEIJÓ, E. B. S. **Efeito do tipo de explante e dos meios de indução e de expressão na regeneração *in vitro* dos porta-enxertos de macieira, ‘M-9’ e ‘Marubakaido’**, 2002. 39f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FIORINO, P.; LEVA, A. R. Propagation of apple cultivars. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.131, p.95-99, 1983.

FORTES, G. R. L. Controle da vitrificação na cultura *in vitro* da amoreira (*Rubus* sp.) cv. Ébano, através da manipulação dos compostos nitrogenados, ágar e sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, n.3, p.305-306, 1991.

FRÁGUAS, C. B. ; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.49-55, 2004.

GAMAGE, N.; NAKANISHI, T.; PLAS, L. H. W.; VAN, KLERK, G. J. de. *In vitro* shoot regeneration from leaf tissue of apple (cultivar “orine”): high shoot proliferation using carry over effect of TDZ. **Acta Horticulturae**, Bélgica, n.520, p.291-299, 2000.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

GIACOBBO, C.; GOMES, F. R. C.; KROTH, L. L.; CONCEIÇÃO, M. K.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* WILLD, BORKH) com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.1, p.31-33, 2003.

GRATTAPAGLIA, 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.

GREY, D.; STEPAN-SARKISSIAN, B.; POWCER, M. N. Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordredt: Cluwer Academic, v.2, p.31-60, 1987.

GROSSER, J. W.; GMITTER JÚNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v.8, p.339-74, 1990.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material didático de apoio da disciplina de Biotecnologia**. 2006. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Disponível em: <http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm>. Acesso em: 10 de novembro de 2009.

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.

HAMMERSCHLANG, F. A.; BAUCHAN, G. R.; SCORZA, R. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.8, p.235-242, 1987.

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.

HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, n.3, p.265-267, 1996.

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

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, n.2, p.105-120, 2006.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Calcutta, v.161, p.645-653, 2001.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira 'Marubakaido', durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.31-7, 2001.

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.

HULME, J. S.; HIGGINS, E. S.; SHIELDS, R. An efficient genotype independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.31, p.161-167, 1992.

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.

JUNIOR, J. M. da S. **Etligera elatior (Jack) r. M. Smith: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos**. 2007. 33f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). Edição Especial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.56-63, 2000.

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

LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.268-271, 2000a.

LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, n.1, p.63- 67, 2000b.

LORETI, F.; GIL, G. Portainjertos para el peral: situacion actual y perspectivas. **Fruticola**, Italia, v.15, n.2, p.45-50, 1994.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.11, n.2, p. 93-101, 2001.

MARANGONI, B.; MALAGUTI, D. I portinnesti del pero. **L'Informatori Agrario**, Verona, n.1, p.26-29, 2002.

MARANGONI, B.; RIVALTA, L. Orientamenti per la scelta - Pero. **L'Informatore Agrario**, Verona, n.32, p.31-36, 1995.

MARINO, G. Primi risultati sulla moltiplicazione *in vitro* di quattro portinnesti, ibridi di susino e pesco, selezionati in Francia. **Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana**, Firenze, v.66, p.369-375, 1982.

MARINO, G. Moltiplicazione e radicazione *in vitro* del pero cv. "William". **Rivista di Ortoflorofrutticoltura**, Bologna, v.68, p.95-106, 1984.

MARTINELLI, F.; MATTEO, B.; FOGHER, C.; SEBASTIANI, L. Development of an efficient regeneration protocol for pear rootstock 'Pyrodwarf' and assessment of SSR variability in regenerating shoots. **Caryologia**, Firenze/Itália, v.62, n.1, p.62-68, 2009.

MATIAS, A. C. **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch.) cultivares Flordaprince e Diamante**. 1995. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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 an epiphytic orchid, *Acampe traemorsa* (Roxb) Blatter and McCann. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, p.583-586, 1997.

PAEK, K. Y.; HAHN, E. J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Berlin, v.36, p.128-132, 2000.

PERAZZOLO, G. Tecnologia para a produção de pêras européias. In: IX ENFRUTE (Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado), 25-27 jul. 2006, Fraiburgo, SC. **Anais...** Caçador: EPAGRI, v.1, p.109-115, 2006.

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

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.

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

PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J. M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.75, n.3, p.283-286, 2000b.

PIO, R.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; BUENO, S. C. S.; MAIA, M. L. **A Cultura do marmeleiro**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2005. 53p. (Série Produtor Rural, 29).

PIO, R.; CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; SIGNORINI, G.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; CAZETTA, J. O.; ENTELMANN, F.A. Emergência e desenvolvimento de plântulas de cultivares de marmeleiro para uso como porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.133-136, 2007.

PIO, R.; CHAGAS, E. A.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; BARBOSA, W.; PIO, L. B. O. Aspectos da marmelocultura nacional. **Revista Attalea de Agronegócios**, França, p.22-25, 2006.

PONCHIA, G.; GARDIMAN, M. The micropropagation and post-acclimation growth of *Prunus laurocerasus* L. cv. Otto Luyken: additional findings. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.7, p.11-14, 1993.

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

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P. de; FACHINELO, J. C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p.656-663, 2009a.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M.; FACHINELLO, J. C.; OLIVEIRA, R. P. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GxN-9'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.2, p.095-101, 2009b.

RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C. Efeito do triadimenol e da benzilaminopurina na multiplicação de brotos *in vitro* do porta-enxerto 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. Ex. Tan.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.43, n.246, p.345-351, 1996.

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.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.14, n.1, p.91-101, 2004.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.365-367, 2003.

SANSAVINI, S.; MUSACCHI, S. Orchard pear design and HPD management: a review. **VIII International Symposium on Pear**. Bolonha/Itália, p.187-188, 2000.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.80-98.

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.

SATO, A. Y.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R. de; LAMEIRA, O. A.; CASTRO, N. E. A. de. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio, em presença ou ausência de benzilaminopurina, na multiplicação de Gérbera (*Gerbera* sp.) de vaso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1071-1078, 2001.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p.155-173.

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.

SCZEPANSKI, P. H. G. **Propagação in vitro do porta-enxerto de ameixeira Mirabolano (*Prunus cerasifera* Ehrh.)**. 2001. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SEGURA, J. Morfogenesis *in vitro*. In: BIETO, J. A.; TALON, M. (Ed.) **Fisiologia y bioquímica vegetal**. Madrid: Ed. Interamericana, 1993. 625p.

SHIBLI, R. A.; SMITH, M. A. L. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (ohelo) and *V. myrtillus* (Bilberry) leaf explants. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.7, p.1225-1228, 1996.

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; FORTES, G. R. de L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A. C.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.488-492, 2001.

SOUQ, F.; COUTOS-THEVENOT, P.; YEAN, H.; DELBARD, G.; MAZIERE, Y.; BARBE, J. P.; BOULAY, M. 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.

SOUZA, C. M.; BIANCHI, V. J.; ALVARENGA, D. A. Produção e certificação de macieira e pereira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.49-56, 2002.

SOUZA, J. **Propagação in vitro de fruteiras nativas: araçá (*Psidium Cattleianum* Sabine), feijoa (*Acca selowiana* (Berg) Burret) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2007. 125f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v.2, p.61-64, 1999.

TABACHNICK, L.; KESTER, D. E. Shoot culture of almond peach hybrid clones *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.6, p.545-547, 1977.

TANG, H.; REN, Z.; REUSTLE, G.; KRCZAL, G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.93, p.235-244, 2002.

TAO, R.; DANDEKAR, A. M.; URATSU, S. L.; VAIL, P. V.; TEBBETS, J. S. Engineering genetic resistance against insects in Japanese Persimmon using the crystal gene of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.122, n.6, p.764-771, 1997.

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.

THORPE, T. A.; PATEL, K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell Culture and Somatic Cell Genetics Plants**, Academic Press. New York, v.1, 1984. p.49-60.

TZFIRA, T.; JENSEN, C. S.; VAINSTEIN, A.; ALTMAN, A. Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.99, p.554-561, 1997.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira 'Julior'. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.9, n.2, p.121-124, 2003.

WESTWOOD, M. N. Rootstocks: their propagation, function and performance. In: **Temperate Zone Pomology**. San Francisco: Ed. W. H. Freeman & Co., 1988. p.77-107.

VIGHI, I. L. **Regeneração *in vitro* de brotações de mini-roseira (*Rosa chinesis*) cv. Mínima**. 2003. 46f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A.; TEODORO, G. S. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, Viçosa, v.54, n.312, p.118-124, 2007.

VILLALOBOS, A. V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. En: **Cultivo de Tejidos en la Agricultura - Fundamentos y Aplicaciones**. Cali/Colômbia: Centro Internacional de Agricultura, 1991. 969 p.

VINTERHALTER, B.; NESKOVIC, M. Factors affecting *in vitro* propagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v.67, n.1, p.39-43, 1992.

YANCHEVA, S. D.; GOLUBOWICZ, S.; FISHER, E.; LEV-YADUN, S.; FLAISHMAN, M. A. 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**, Hange, v.37, n.3, p.257-269, 1994.

ZIMMERMAN, R. H. Cultivo de tejidos. In: MOORE, J. N., JANICK, J. **Métodos genotécnicos en frutales**. Mexico: AGT, 1988. p.167-182.

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.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.) **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.45-69.

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

APÊNDICES

Apêndice 1 – Resumo da análise de variância e testes de significância para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams. UFPel/2010

		Quadrados médios			
Causas da variação	GL	Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
MEIO (A)	1	0,398*	0,002 ^{ns}	0,025 ^{ns}	9,374 ^{ns}
BAP (B)	3	0,067*	0,702*	0,032*	184,375 ^{ns}
A x B	3	0,066 ^{ns}	0,453*	0,024 ^{ns}	659,375 ^{ns}
Resíduo	16	0,021	0,025	0,008	684,375
Média geral		1,935**	2,194	2,384**	53,125***
CV (%)		7,507	7,218	3,860	49,243

*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

Apêndice 2 – Análise da regressão polinomial para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) da cv. Adams, em meio MS^{1/2}. UFPel/2010

		Quadrados médios			
Causas da variação	GL	Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
Regressão Linear	1	0,089*	1,235*	0,005 ^{ns}	93,750 ^{ns}
Regressão Quadrática	1	0,000 ^{ns}	0,152*	0,003 ^{ns}	918,750 ^{ns}
Resíduo	16	0,021	0,025	0,008	684,375

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 3 – Análise da regressão polinomial para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) da cv. Adams, em meio MS^{3/4}. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
Regressão Linear	1	0,010 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0,022 ^{ns}	1215,000 ^{ns}
Regressão Quadrática	1	0,198*	1,952*	0,125*	75,000 ^{ns}
Resíduo	16	0,021	0,025	0,008	684,375

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 4 – Resumo da análise de variância e testes de significância para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
BAP (A)	2	1,750*	1,120*	0,004 ^{ns}	974,999 ^{ns}
GIB (B)	2	0,241*	0,751*	0,029*	924,999 ^{ns}
A x B	4	0,103*	0,202*	0,032*	400,000 ^{ns}
Resíduo	18	0,003	0,014	0,001	433,333
Média geral		2,128**	2,527	2,119**	33,333***
CV (%)		2,667	4,776	1,841	62,450

*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

Apêndice 5 – Resumo da análise de variância e testes de significância para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
BAP	4	0,108*	0,294*	0,228*	995,625 ^{ns}
Resíduo	15	0,003	0,029	0,002	528,750
Média geral		1,897**	1,809	2,037**	15,750***
CV (%)		3,056	9,459	2,659	145,997

*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

Apêndice 6 – Análise da regressão polinomial para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
Regressão Linear	1	0,317*	0,574*	0,818*	2975,625*
Regressão Quadrática	1	0,000 ^{ns}	0,017 ^{ns}	0,055*	196,875 ^{ns}
Resíduo	15	0,003	0,029	0,003	528,750

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 7 – Resumo da análise de variância e testes de significância para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
BAP	4	1,221*	0,437*	0,176*	1656,841*
Resíduo	15	0,008	0,013	0,002	460,241
Média geral		2,161**	1,477	2,061**	30,346***
CV (%)		4,105	7,883	2,261	70,695

*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)

Apêndice 8 – Análise da regressão polinomial para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
Regressão Linear	1	4,567*	0,643*	0,398*	2013,504 ^{ns}
Regressão Quadrática	1	0,178*	0,488*	0,292*	1172,152 ^{ns}
Resíduo	15	0,008	0,013	0,002	460,241

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 9 – Resumo da análise de variância e testes de significância para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
BAP (A)	2	1,171*	1,087*	0,725*	2799,999*
GIB (B)	2	0,123*	0,079 ^{ns}	0,007 ^{ns}	99,999 ^{ns}
A x B	4	0,033 ^{ns}	0,142*	0,009 ^{ns}	950,000 ^{ns}
Resíduo	18	0,012	0,034	0,005	525,000
Média geral		2,013**	2,031	2,257**	38,333***
CV (%)		5,523	9,132	3,098	59,773

*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

Apêndice 10 – Resumo da análise de variância e testes de significância para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
BAP	4	0,128*	0,094 ^{ns}	0,117*	5298,750*
Resíduo	15	0,005	0,047	0,003	221,250
Média geral		1,867**	1,521	1,901**	51,750***
CV (%)		3,835	14,228	2,980	28,743

*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

Apêndice 11 – Análise da regressão polinomial para as variáveis número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), número de nós por brotação e percentagem de vitrificação (%) em *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios			
		Número brotações	Comprimento brotações (cm)	Número nós	Vitrificação (%)
Regressão Linear	1	0,133*	0,054 ^{ns}	0,143*	20249,999*
Regressão Quadrática	1	0,321*	0,217*	0,322*	787,500 ^{ns}
Resíduo	15	0,005	0,047	0,003	221,250

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 12 – Resumo da análise de variância e testes de significância para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams e MC, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
CULTIV. (A)	1	69,319 ^{ns}	0,179 ^{ns}
TDZ (B)	3	167,060*	0,528*
A x B	3	252,678*	0,871*
Resíduo	8	18,257	0,071
Média geral		8,079***	1,448**
CV (%)		52,889	18,409

*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

Apêndice 13 – Análise da regressão polinomial para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante da cv. Adams, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
Regressão Linear	1	517,945*	1,687*
Regressão Quadrática	1	287,747*	0,937*
Resíduo	8	18,257	0,071

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

Apêndice 14 – Análise da regressão polinomial para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante da cv. MC, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
Regressão Linear	1	36,968 ^{ns}	0,051 ^{ns}
Regressão Quadrática	1	329,577*	1,101*
Resíduo	8	18,257	0,071

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 15 – Resumo da análise de variância e testes de significância para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams e MC, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
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

*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)

Apêndice 16 – Análise da regressão polinomial para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante da cv. Adams, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
Regressão Linear	1	0,000 ^{ns}	0,000 ^{ns}
Regressão Quadrática	1	178,145*	0,999*
Resíduo	10	2,419	0,034

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 17 – Análise da regressão polinomial para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante da cv. MC, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
Regressão Linear	1	214,455 *	0,427*
Regressão Quadrática	1	560,773*	0,239*
Resíduo	10	2,419	0,034

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

Apêndice 18 – Resumo da análise de variância e testes de significância para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante em *Cydonia oblonga* Mill., cv. Adams e MC, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
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

*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

Apêndice 19 – Resumo da análise de variância e testes de significância para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante em *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
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

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

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

^{ns} Não significativo

Apêndice 20 – Resumo da análise de variância e testes de significância para a variável percentagem de explantes regenerados (%) e número de brotações por explante regenerante em *Cydonia oblonga* Mill., cv. MC, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. UFPel/2010

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes regenerados (%)	Número de brotações
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

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

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

^{ns} Não significativo