

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE *Pyrus* spp.

ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF "IN VITRO" *Pyrus* spp. CULTIVARS

DANTAS, Adriana C. de M.¹; NESI, Adriano N.¹; MACHADO, Lilia B.¹, HAERTER, Janni¹, FORTES, Gerson Renan de L.²

RESUMO

O cultivo de meristemas, ápices caulinares e gemas axilares, é o método de estabelecimento "in vitro", mais seguro para obtenção de "cópias uniformes", isentas de variações e viroses indesejáveis. Este trabalho objetivou estabelecer e multiplicar "in vitro" cinco cultivares de pereira, Housui, Carrick, Século XX (Nijisseiki), Packham's Triumph e Red Bartlet. Foram utilizadas 25 gemas e 25 meristemas de cada cultivar, nas quais foram realizadas desinfestação com imersão de álcool etílico 70% por 20 segundos, seguida em solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 20 minutos. Os explantes foram inoculados em meio MS, suplementados com mio-inositol (100,0 mg.L⁻¹), sacarose (30,0 g.L⁻¹), ágar (6,0 g.L⁻¹), BAP (1,0 mg.L⁻¹), AG₃ (0,1 mg.L⁻¹) e ANA (0,01 mg.L⁻¹). Para a fase de multiplicação, utilizou-se três cultivares: Século XX, Red Bartlett e Housui. Microestacas de 0,5 cm de comprimento, obtidas do estabelecimento "in vitro", foram inoculadas em meio MS, com N₂ reduzido a ¾, suplementado de BAP (1,6 mg.L⁻¹) e ANA (0,16 mg.L⁻¹). Observou-se maiores contaminações nas gemas (71,5%), aos sete de cultivo "in vitro". Todas as cultivares apresentaram acima de 70% de contaminação nas gemas. Nos meristemas, observou-se oxidação nas cultivares Carrick e Packham's. Em relação a multiplicação, a cv. Red Bartlett mostrou-se superior em todas as variáveis analisadas, seguida da cv. Século XX.

Palavras-chave: pereira, cultura de tecidos, meristemas, gemas

INTRODUÇÃO

O gênero *Pyrus* pertence à subfamília Maloideae da família Rosaceae. Nas regiões de clima temperado são cultivadas duas espécies principais, *Pyrus communis* L., a pereira européia, mais comumente cultivada na Europa e América e *Pyrus pyrifolia* (Burn) Nak., a pereira asiática ou Nashi, que é tradicionalmente cultivada no Japão, China, Coreia e Taiwan e está em expansão nos Estados Unidos e Europa (CHEVREAU & SKIRVIN, 1992).

Comercialmente, pode-se dividir as peras em dois tipos: européias e asiáticas. As asiáticas possuem frutos com polpa crocante, formato arredondado, achatado ou mesmo piriforme, sendo as mais plantadas, as cultivares Século XX, Suisei, Shinsui, Housui, Shinseiki, entre outras. As peras européias possuem polpa macia, amanteigada, e os frutos são piriformes. As mais cultivadas são: Bartlett, Red Bartlet, Packham's Triumph, Beurré Bosc, Carrick entre outras (FAORO, 1991). A cultura da pereira tem grande potencial de expansão no sul do Brasil, podendo aproveitar a infra-estrutura

de processamento e armazenagem já instaladas para a cultura da macieira, sendo portanto, uma opção para a diversificação da fruticultura (RIBEIRO et al., 1991). Desta forma, a produção de mudas assume papel imprescindível na melhoria destes fatores, considerando que há grande deficiência no Brasil, e um dos maiores problemas está na falta de mudas sadias sobre porta-enxertos promissores, para melhorar a produção frutícola. Assim, a produção de mudas através da micropropagação constitui-se num dos métodos de produção de mudas com uma série de vantagens sobre os métodos tradicionais (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Segundo LEE & KO (1984) a cultura *in vitro* possibilita a propagação de cultivares livres de doenças em curto período de tempo.

Segundo MOSELLA & ASCUI (1991), a regeneração de plantas a partir de cultivo *in vitro* de certos vegetais lenhosos exige a busca de técnicas complexas e seu emprego acertado. Essas técnicas devem possibilitar aos explantes sobreviver às freqüentes dificuldades de oxidação, à heterogeneidade de respostas, à presença de inibidores de crescimento e, sobretudo, a sobrevivência ao transplante para condições autotróficas. Cultura de tecidos em muitas espécies e cultivares de pereira tem sido estudadas e por diversos autores, os quais tem observado diferenças entre os genótipos, quanto à composição básica do meio de cultura e reguladores de crescimento (CHENG, 1978; STIMART & HARBAGE, 1989; DOLCET-SANJUAN et al., 1990; BERNARDI et al., 1993).

O cultivo de meristemas, ápices caulinares (MARGARA, 1988), e gemas axilares (PIERIK, 1990), resultam nos métodos de multiplicação *in vitro* mais facilmente utilizados e mais seguros para obtenção de "cópias uniformes ou semelhantes", isentas de variações indesejáveis (MARGARA, 1988). Estes métodos também têm sido utilizados com êxito na superação de contaminação patogênica (CALDAS et al., 1990), na recuperação de plantas livres de vírus ou na conservação e intercâmbio de germoplasmas. Em resumo, o ápice meristemático é uma estrutura organizada, que pode desenvolver-se diretamente da parte aérea em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo (TORRES et al., 1998).

Com isso, este trabalho objetivou estabelecer e multiplicar *in vitro* cinco cultivares de pereira e obter material sadio para posterior enraizamento e aclimatização.

¹ Departamento de Fitotecnia FAEM/UFPEL, Caixa Postal 354 CEP: 96010-900 Pelotas - RS acmdantas@bol.com.br

² Embrapa Clima Temperado, C.P. 403, 96001-970, Pelotas, RS.

(Recebido para publicação em 26/06/2001)

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de pereira (*Pyrus* spp.) das cultivares Housui, Carrick, Século XX (Nijisseiki), Packham's Triumph, Red Bartlett, fornecidas pelo pesq. Darcy Camelatto, do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, da Embrapa, em Pelotas. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa de Clima Temperado.

Tratamento a campo e desinfestação do material

As plantas foram identificadas e pulverizadas duas semanas antes da coleta dos ramos, fazendo-se uma pulverização intercalada com fungicida benomil (1 mg.L^{-1}) e bactericida agrimicina ($2,4 \text{ mg.L}^{-1}$) a cada dois dias, cobrindo os ramos com sacos pretos furados, da metade dos ramos que foram utilizados de cada uma das cultivares em estudo, para diminuição de agentes contaminantes nos ramos.

Dos ramos cortados com duas gemas, foram retiradas as folhas e colocados em frascos protegidos com papel alumínio. No laboratório de Cultura de Tecidos da EMBRAPA, Pelotas, realizou-se a desinfestação dos ramos com imersão em álcool etílico 70% por 20 segundos, seguida em imersão em solução de hipoclorito de sódio à 1%, durante 20 minutos. Durante este processo o frasco foi mantido sob agitação contínua. Posteriormente, retirou-se o hipoclorito de sódio, enxaguando-se os explantes três vezes em água esterilizada.

Estabelecimento *in vitro*

Utilizou-se 25 gemas (0,5 cm) e 25 meristemas (0,5 mm) para cada cultivar testada. O isolamento de gemas e meristemas tanto apicais como axilares efetuado com ajuda de estereomicroscópio.

Os explantes foram transferidos para tubos de ensaio (2,5 x 15,0 cm) contendo 5,0 ml de sais e vitaminas MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}), ágar (6 g.L^{-1}), suplementados com benzilaminopurina (BAP) ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), ácido giberélico (AG_3) ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e ácido naftaleno acético (ANA) ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$). O pH foi ajustado para 5,9 antes da colocação do ágar.

O material foi mantido no escuro por 48 horas e, após este período, foi conduzido para sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e $19 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação luminosa fornecidas por lâmpadas fluorescentes branca fria. Após 30 dias os explantes foram avaliados quanto a percentagem de contaminação, percentagem de oxidação e número de gemas iniciais, e recultivados para meio de multiplicação.

Multiplicação *in vitro*

Utilizou-se brotações de três cultivares, Século XX, Red Bartlett e Housui, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com um explante por tubo de ensaio. Os explantes foram inoculados em meio de cultura de sais e vitaminas MS, com concentração de N reduzido a 3/4, mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}), ágar (6 g.L^{-1}), suplementados com BAP ($1,6 \text{ mg.L}^{-1}$), e ANA ($0,16 \text{ mg.L}^{-1}$). O pH foi ajustado para 5,8 antes da colocação do ágar.

O material permaneceu em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e $19 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação luminosa, fornecidas por lâmpadas fluorescentes branca fria. Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto ao número e comprimento de brotações, número de gemas e taxa de multiplicação.

Delineamento experimental

Para o estabelecimento *in vitro*, o delineamento utilizado foi de blocos casualizados, com 4 (quatro) repetições, sendo a unidade experimental composta por 5 (cinco) tubos de ensaio, cada um contendo 1 (um) explante. Os dados foram analisados pelo teste de Duncan com nível de significância 5%, para os fatores tipos de explante (A) e cultivares (B).

Para o ensaio de multiplicação, o delineamento foi completamente casualizado, com 20 repetições, sendo a unidade experimental composta por 1 (um) tubo de ensaio, cada um contendo 1 (um) explante. Os dados foram analisados pelo teste de Duncan com nível de significância 5%, para o fator cultivares (A).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo de gemas e meristemas

Observou-se que as contaminações *in vitro* foram, principalmente, por bactérias e a maior percentagem ocorreu em gemas (71,5%), já nos primeiros sete dias de cultivo. Em 15 dias, as gemas já apresentavam aproximadamente 100% de contaminação (Figura 1). Neste mesmo explante, todas as cultivares apresentaram contaminações. Destacando a cv. Red Bartlett, que apresentou a maior percentagem de contaminação (95,7%) (Figura 2). Já o mesmo não foi observado para os explantes provenientes de meristemas (Figura 2).

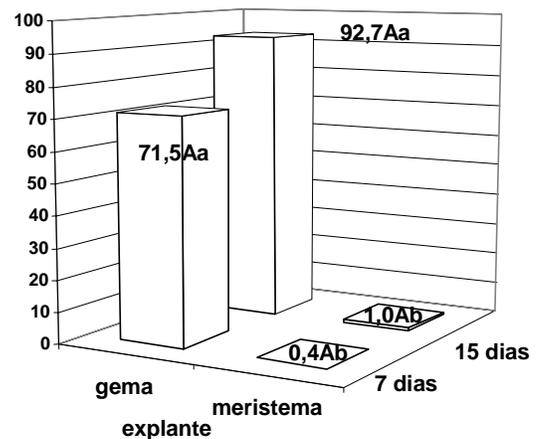


Figura 1 - Percentagem de contaminação *in vitro* em gemas e meristemas apicais aos 7 e 15 dias após inoculação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 1999. (Médias seguidas da mesma letra minúscula comparações para explantes e maiúsculas para dias de cultivo, não diferem significativamente pelo Teste F $\alpha=0,05$).

WILKINS & DODDS (1983), relataram que para o sucesso do cultivo de meristemas e gemas em árvores frutíferas de clima temperado, é necessário estar atento a muitos fatores, entre eles; à esterilização de gemas e meristemas e às condições de cultivo *in vitro*, devendo-se preocupar com as condições do material oriundo do campo. VESCO & GUERRA (1999) observaram em estabelecimento *in vitro* de goiabeira serrana, uma forte relação entre a procedência do material e a ocorrência de altas taxas de contaminações, onde explantes provenientes de plantas

mantidas à campo apresentaram maiores contaminações e oxidações. O mesmo também foi observado por RODRIGUES et al. (1999), em estabelecimento de porta-enxertos de pessegueiro.

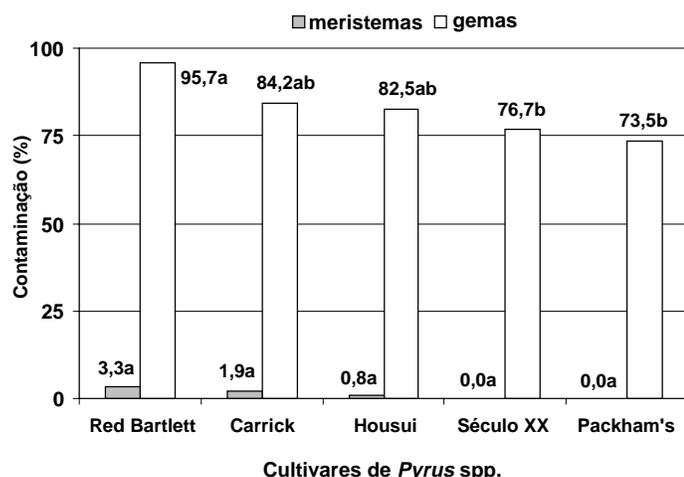


Figura 2 - Percentagem de contaminação *in vitro* em gemas e meristemas apicais em cinco cultivares de pereira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 1999. (Médias seguidas da mesma letra minúscula, dentro de cada explante, não diferem significativamente pelo teste $F_{\alpha=0,05}$).

A maior percentagem de oxidação foi observada nos explantes meristemáticos, nas cvs. Carrick (80,4%) e Packham's (39,2%). Os explantes oriundos das gemas, praticamente não apresentaram oxidação, exceto para as cvs. Housui (3,4%) e Packham's (3,4%) (Figura 3).

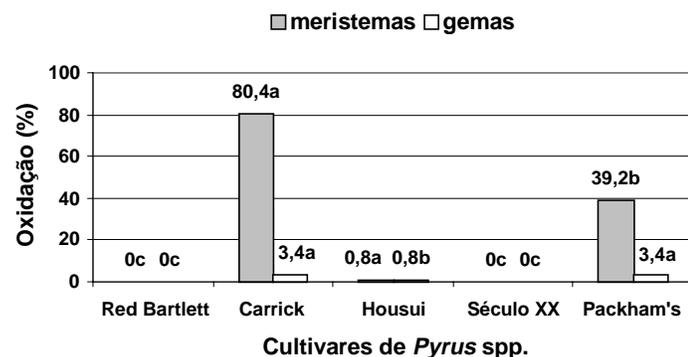


Figura 3 - Percentagem de oxidação *in vitro* de gema e meristema apical em cinco cultivares de pereira após 30 dias de inoculação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 1999. (Médias seguidas da mesma letra minúscula, dentro de cada explante, não diferem significativamente pelo teste $F_{\alpha=0,05}$).

Provavelmente, a contaminação *in vitro* ocorreu devido ao estágio fenológico das plantas matrizes, na época da coleta do material. Uma vez que as mesmas, encontravam-se em início de dormência, época em que o baixo metabolismo dificulta a circulação da seiva e de produtos sistêmicos,

impedindo desta forma, a desinfestação dos tecidos. Também foi observado que, em explantes meristemáticos, as contaminações foram menores quando comparados aos explantes de gemas. Segundo BONGA (1987), quanto menor o tamanho do explante isolado, ou quanto mais isolado das regiões subjacentes vasculares, maior a chance de sucesso no estabelecimento *in vitro*. O tamanho do explante também determina suas possibilidades de sobrevivência e sua capacidade de crescimento. O que de fato ocorreu no presente trabalho, onde a princípio, observou-se que no cultivo com explante de gemas, maior proliferação de novas gemas iniciais foram desenvolvidas do que no meristemático.

As cultivares Housui, Século XX e Red Bartlett apresentaram maior número de gemas iniciais (3,2; 2,6 e 2,0, respectivamente). Conseqüentemente, a proliferação inicial destas gemas, contribuíram para o estabelecimento definitivo destas três cultivares *in vitro* (Figura 4). Já para os explantes meristemáticos, as cvs. Housui e Século XX, apresentaram menor proliferação de gemas, com 1,5 e 1,0 gema/explante, respectivamente (Figura 4). Já as cvs. Carrick e Packham's apresentaram oxidação neste tipo de explante.

De forma geral, os explantes de gemas apresentaram maior número de brotações que os explantes meristemáticos. Assim sendo, meristemas oxidados apresentaram reduzido crescimento de brotos. O mesmo havia sido observado antes, por BHOJWANI et al. (1987) em cultivo *in vitro* de *Feijoa sellowiana*.

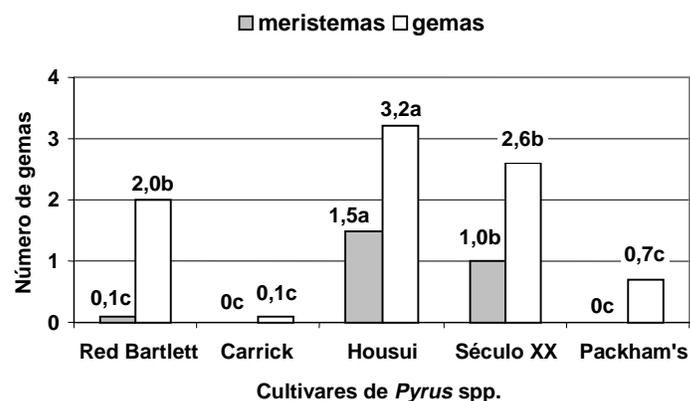


Figura 4 - Número de gemas desenvolvidas nos explantes gemas e meristemas em cinco cultivares de pereira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 1999. (Médias seguidas da mesma letra minúscula, dentro de cada explante, não diferem significativamente pelo teste $F_{\alpha=0,05}$).

Multiplicação das microestacas

Na concentração utilizada de BAP e ANA, a cultivar Red Bartlett mostrou-se superior em todas as variáveis analisadas, mostrando bom desenvolvimento de brotações e de gemas (Figura 5), seguidas das cultivares Século XX e Housui (Figura 6). Entretanto, para as variáveis número de brotações e taxa de multiplicação, as cvs. Século XX e Housui apresentaram valores aproximados, não diferindo estatisticamente (Figura 6).

De uma forma geral, observou-se um baixo rendimento quanto ao número de brotações (0,9 a 2,2) nas três cultivares testadas. A cv. Housui se destaca, por apresentar pouco

desenvolvimento dos brotos, com pouco comprimento, além de tornarem-se vitrificados e/ou necrosados (Figura 6).

Este baixo rendimento havia sido observado anteriormente por SHEN & MULLINS (1984), em pereira, onde observaram de 4 a 6 brotações por explante, considerando um baixo rendimento, comparado com 12 ou mais brotos/explante que são obtidos em macieira. Entretanto, PASQUAL et al. (1987) obtiveram melhores resultados, de 9,9 a 12,9 brotos em média, para cada gema cultivada, após 40 dias de subcultivo. Assim como, MARINO (1984), com a 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 mg.l⁻¹.

O uso excessivo de reguladores de crescimento é a primeira hipótese para explicar a ocorrência de vitrificação (BEAUCHESNE, 1981). O surgimento de plantas vitrificadas e com características anormais, segundo LESHEM & SACHS (1985), é devido a um desbalanço entre auxinas e citocininas. Fato este, observado neste trabalho.

Resultados promissores já haviam sido realizados no estabelecimento *in vitro* de outras cvs. de pereira, através da cultura de meristemas, tais como cvs. Bartlett (LANE, 1980), Seckel (SINGHA, 1982) e com porta-enxerto Old Home x Farmingdale 97 (LEITE et al., 1997).

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 em alguns explantes, e sim obter uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante, assim como a qualidade, a homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois vai determinar o sucesso na fase de enraizamento.



Figura 5 - Proliferação de brotos na cv. Red Bartlett, obtidas do estabelecimento *in vitro* de explantes de gemas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 1999.

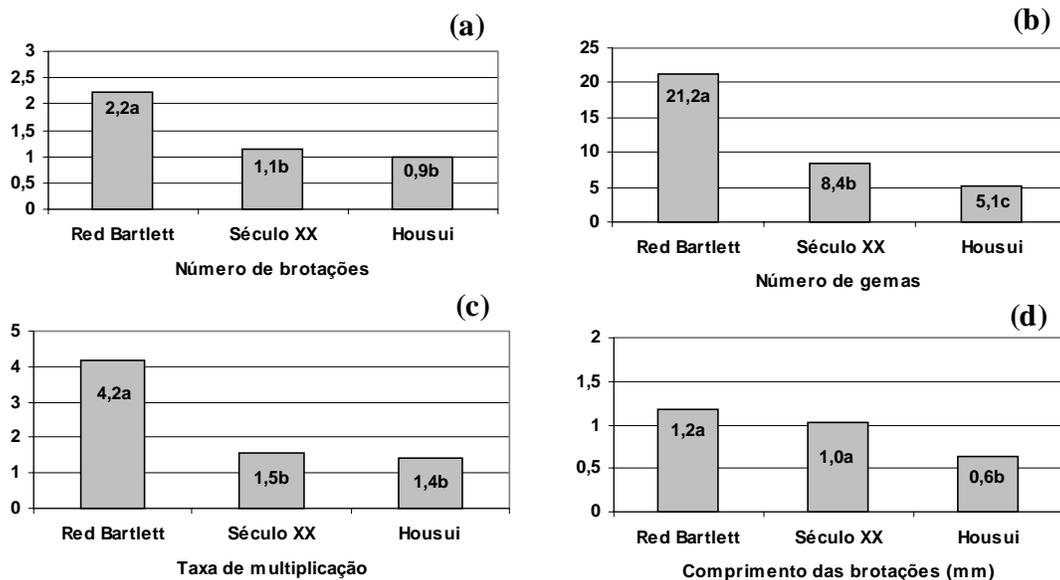


Figura 6 - Variáveis analisadas na fase de multiplicação *in vitro* nas cvs. Red Bartlett, Século XX e Housui. a) número de brotações, b) número de gemas, c) taxa de multiplicação e d) comprimento das brotações. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 1999. (Médias seguidas da mesma letra minúscula, dentro de cada variável, não diferem significativamente pelo teste F $\alpha=0,05$).

Desta forma, este trabalho sugere um conjunto de variáveis a serem manipuladas, para o desenvolvimento de protocolos dirigidos para cada cultivar em particular, com o intuito de otimização nesta fase de estabelecimento *in vitro*. Estas variáveis a serem exploradas, podem ser em relação à composição do meio de cultura, balanceamento de fitorreguladores, assim como o tamanho ideal de explante, o qual esteja livre de microorganismos e ao mesmo tempo,

consiga se estabelecer e crescer em condições *in vitro*. Além disso, investigar uma melhor metodologia de desinfestação do material à campo e em laboratório. Por fim, as condições ótimas de crescimento e proliferação de cultivo de ápices meristemáticos e de gemas é primordial para que se obtenha um sistema rápido de multiplicação *in vitro* em cvs. de pereira.

CONCLUSÕES

1. A manutenção do cultivo asséptico foi mantido com a utilização dos explantes oriundos de meristemas;
2. A resposta morfogênética *in vitro* das cvs. de pereira é dependente do genótipo;
3. As cvs. Carrick e Packham's apresentaram suscetibilidade à oxidação *in vitro*, mostrando-se cvs. de difícil estabelecimento *in vitro*;
4. As cvs. Red Bartlett, Século XX e Housui apresentaram bom estabelecimento *in vitro*;
5. A cv. Red Bartlett mostrou-se superior as demais cultivares, em todas as variáveis analisadas na fase de multiplicação.

ABSTRACT

The culture of meristems, shoot tips and axillary buds leads to the method of *in vitro* multiplication which is easily used and safe to obtain uniform copies with no undesirable variations. This work aimed to propagate five *in vitro* pear cultivars: Housui, Carrick, Nijisseiki, Packham's Triumph and Red Bartlett. The shoots were then cut with two buds with no leaves and desinfested with alcohol 70% for 10 seconds and 1% sodium hypochloride for 20 minutes. 25 buds and 25 meristems, were then inoculated to test tubes containing medium MS, myo-inositol (100.0 mg/l), sucrose (30.0 g/l), agar (6.0 g/l), added to in mg/l : BAP (1.0), GA₃ (0.1) and NAA (0.01). Three pear cultivars were used for *in vitro* multiplication (Nijisseiki; Red Bartlett and Housui) by using the medium MS with N to ¼ strength, added to in mg/l: BAP(1.6), NAA(0.16). The material was kept in growth room under 16-hour photoperiod, 25 +/- 2°C and 19 EU./m²/s of flux radiation. The *in vitro* contaminations were mainly due to bacteria derived from the bud material (71.5%). Higher oxidation for meristem material was observed for Carrick and Packham's. Red Bartlett showed the best results for all the variable studied.

Key words: Pear, tissue culture, meristem, bud

REFERÊNCIAS

- BEAUCHESNE, G. Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. **Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture**. Paris, v.67, p.1389-1397, 1981.
- BERNARDI, G.; INFANTE, R.; NERI, D. Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. from seedlings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.53, n.1, p.157-165, 1993.
- BHOJWANI, S.S.; MULLINS, K.; COHEN, D. Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. **Acta Horticulturae**, Belgium, n.212, p.69-76, 1987.
- BONGA, J.M. Clonal propagation of mature trees problems and possible solutions. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (ed.) **Cell and Tissue Culture in forestry: general principles and biotechnology**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, p. 249-271.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 433p. 1990.
- CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R.M. Pear. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. ed. **Biotechnology of perennial fruit crops**. Biotechnology n.8., cap. 2, Wallingford: C.A.B. International, 1992. 550p.
- CHENG, T.Y. Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. **Proceedings International Plant Propagation Society**, v.28, p.139-155, 1978.
- DOLCET-SANJUAN, R. MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.21, p.191-199, 1990.
- FAORO, I.D. Cultivo da pereira no mundo. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.4, n.2, 1991.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Exegetic Ltda, 1984, 709p.
- LANE, W.D. Test tube propagation of apple and pear. **Canada Agriculture**, v.25, n.2, p.26-36, 1980.
- LEE, H.J.; KO, C. Effects of culture media and plant hormones on shoot tip culture of Fuji apple cultivar (*Malus domestica*). **Seoul Nat'l Univ. College of Agr. Reserch**, v.9, n.1, p.67-77, 1984.
- LEITE, G.B.; FINARDI, N.L.; FORTES, G.R.L. Efeito da concentração de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* da pereira cv. Bartlett e do clone OH X F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.21, n.4, p.436-441, 1997.
- LESHEM, B.; SACHS, T. Vitrified *Dianthus teratoma* *in vitro* due to growth factor imbalance. **Annals of Botany**, v.56, p.613-617, 1985.
- MARGARA, J. **Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro* - Los meristemas y la organogénesis**. Mundi-prensa. Madrid, 230p. 1988.
- MARINO, G. Multiplicazione e radicazione *in vitro* del pero cv. "William". **Rivista di Ortoflorofrutticoltura**, Bologna, v.68, p.95-106, 1984.
- MOSELLA, L.C.; ASCUI, M.L. **Frutales livres de virus partiendo de ápices mersitemáticos cultivados *in vitro***. In: MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones, CIAT, Colombia, p.513-532, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n.15, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; LOPES, P. A. ; PINTO, J.E: Propagação do porta-enxerto de pereira através da cultura de gemas axilares *in vitro*. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, 1987. **Anais...** Campinas, p.659-662.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Ed. Mundi-prensa. Madrid, 295p. 1990.
- RIBEIRO, P.A.; BRIGUENTI, E.; BERNARDI, J. Comportamento de algumas cultivares de pereira *Pyrus communis* L. e suas características nas condições do Planalto catarinense. **Boletim Técnico**, n.56, Florianópolis, EMPASC, 1991. 53p.
- RODRIGUES, A.C.; FACHINELLO, J.C.; STRELOW, E. FORTES, G.R.L. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.21, n.2, p.229-231, 1999.
- SHEN, X.S.; MULLINS, M.G. Propagation *in vitro* of pear *Pyrus communis* L., cultivars "Williams Bom Chrétien", "Packham's Triumph" and "Beurré Bose". **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, p.52-57, 1984.
- SINGHA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. Almey and *Pyrus communis* Seckel. **Journal American Society of Horticulture Science**, Alexandria, v.107, n.4, p.657-660, 1982.
- STIMART, D.P.; HARBAGE, J.F. *In vitro* shoot proliferation of *Pyrus calleryana* from vegetative buds. **HortScience**, Alexandria, v.24, p.298-299, 1989.
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. **Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA - CNPq, P.133-145, 1998.
- VESCO, L.L.D.; GUERRA, M.G. Organogénesis e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.21, n.1, p.6064, 1999.
- WILKINS, P.; DODDS, J.H. Tissue culture propagation of temperate fruit trees. In: DODDS, J.H. ed. **Tissue Culture of Trees**. Sydney: AVI Publishing Company, 1983, p.56-79.