

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MACIEIRA (*Malus domestica* BORKH.) CV. GALAXY: MEIO DE CULTURA E AGENTES SOLIDIFICANTES ALTERNATIVOS

“*IN VITRO*” MULTIPLICATION OF APPLE PLANTS (*Malus domestica* BORKH.) CV. GALAXY: CULTURE MEDIUM AND ALTERNATIVE GELLING AGENTS

ERIG, Alan C.¹; SCHUCH, Márcia W.²; SILVA, Luciane C. da³

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar o melhor meio de cultura e avaliar a eficiência de agentes solidificantes alternativos na multiplicação *in vitro* de macieira cv. Galaxy. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, sendo testados dois diferentes meios de cultura (MS e WPM), com cinco diferentes agentes solidificantes com substituição parcial ou total do ágar: solidificante 1) ágar (6 g L⁻¹) (testemunha), 2) ágar (3 g L⁻¹) + amido de mandioca (50 g L⁻¹), 3) ágar (3 g L⁻¹) + amido de milho (50 g L⁻¹), 4) ágar (1,5 g L⁻¹) + amido de milho (75 g L⁻¹), e 5) amido de milho (100 g L⁻¹). Os meios de cultura foram suplementados com mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹), BAP (6-benzilaminopurina) (3,5 µM) e ANA (ácido naftalenoacético) (0,03 µM). Concluiu-se que, na multiplicação *in vitro* de macieira cv. Galaxy, a substituição parcial do ágar pelo amido de milho como solidificante, é tecnicamente viável, igualando-se ao ágar (testemunha), e a maior taxa de multiplicação é obtida com meio de cultura MS.

Palavras-chave: cultura de tecidos, amido de milho, amido de mandioca, ágar, *Malus domestica*.

INTRODUÇÃO

As cultivares de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) mais plantadas no sul do Brasil são a Gala e a Fuji, com 46% e 45% de participação, respectivamente (TSUCHIYA, 2001). No entanto, o plantio de cultivares derivadas de mutações tem aumentado significativamente no mundo, devido principalmente ao mercado que exige um produto sempre de melhor qualidade (STAINER et al., 2001).

A busca por mutações somáticas da cv. Gala visa principalmente a obtenção de frutos mais uniformes quanto a coloração, mesmo aqueles sombreados (CAMILO & DENARDI, 2002). Existe um número relativamente grande de mutantes coloridas da cv. Gala (WALSH & VOLZ, 1990), sendo a Galaxy uma das cultivares atualmente difundidas derivadas de mutações.

Para atender às demandas por material vegetativo de uma nova cultivar de macieira, é requerida uma grande quantidade de material propagativo. A micropropagação tem sido aplicada extensivamente na propagação de espécies frutíferas, sendo bastante eficiente na multiplicação tanto das cultivares copa, quanto de porta-enxertos.

Entre todos os meios de cultura relatados para a multiplicação *in vitro* de brotações, o mais utilizado é o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), como nos trabalhos de ISHIDA et al. (1993), CENTELLAS et al. (1997), MODGIL et al. (1999), SCHWENGBER et al. (1999), SCHWARTZ et al. (2000) e LIMA-NISHIMURA et al. (2003), com cultivares copa e porta-enxertos de macieira. Formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas, como o meio WPM – Wood Plant Media (LLOYD & McCOWN, 1980), têm sido descritas e utilizadas como alternativa ao meio MS (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). HUTCHINSON (1984) e ZIMMERMAN & FORDHAM (1989), utilizaram o meio LS (LINSMAIER & SKOOG, 1965) na micropropagação de cultivares de macieira.

Durante os diferentes estádios da micropropagação, os explantes são geralmente cultivados em meios de cultura solidificados com ágar. No Brasil, o ágar é importado, e seu alto custo é um desagrado econômico para a pesquisa e para os laboratórios comerciais (LIMA-NISHIMURA et al., 2003), visto que é um dos ingredientes mais caros do meio de cultura, pela quantidade utilizada (FERRI et al., 1998).

Visando reduzir o custo em laboratórios de micropropagação, alguns substitutos para o ágar têm sido testados, como solidificantes preparados a partir da polpa ou massa parenquimática da maçã (TITEL et al., 1987), combinação de ágar e pectina (DE PAOLI, 1989), amido de milho ou de mandioca (STANLEY, 1995; FERRI et al., 1998), ou ainda combinação de ágar e “xyloglucan” (polissacarídeo extraído de sementes de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*) (LIMA-NISHIMURA et al., 2003).

Apesar do amido apresentar algumas desvantagens, como pouca transparência dificultando a detecção de contaminantes no meio de cultura (LIMA-NISHIMURA et al., 2003), entre os polissacarídeos, ele é a substância de maior importância fisiológica, abundantemente encontrado na natureza, de fácil obtenção (FERRI et al., 1998) e principalmente, de baixo custo. A preferência por um ou outro agente de solidificação depende da espécie de planta e, talvez, das condições de cultivo (CALDAS et al., 1998), incluindo aí, o meio de cultura.

Com o presente trabalho, objetivou-se determinar o melhor meio de cultura e avaliar a eficiência de agentes solidificantes alternativos com substituição parcial ou total do

¹ Eng^o. Agrônomo., M.Sc., Doutorando do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPEL. Cx. P. 354, CEP 96010-900. Pelotas - RS. Bolsista CAPES. E-mail: acerig@ufpel.tche.br. *

² Eng^a. Agrônoma, Dr^a., Professora do Departamento de Fitotecnia da FAEM/UFPEL. Cx. P. 354, CEP 96010-900. Pelotas - RS. E-mail: marciaws@ufpel.tche.br.

³ Aluna do curso de Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPEL. Bolsista de I.C. FAPERGS. Apoio do MCT/CNPq.

(Recebido para Publicação em 11/07/2003, Aprovado em 14/07/2004)

ágar, na multiplicação *in vitro* de macieira (*M. domestica*) cv. Galaxy.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas, RS. Segmentos caulinares com duas ou três gemas, sem o ápice, e com comprimento de 0,8 a 1 cm, provenientes de brotações de macieira da cv. Galaxy cultivadas *in vitro*, foram utilizados como explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, sendo testados dois diferentes meios de cultura: MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM – Wood Plant Media (LLOYD & McCOWN, 1980), e cinco diferentes agentes solidificantes, com substituição parcial ou total do ágar: solidificante 1) 6 g L⁻¹ de ágar - testemunha, 2) 3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de mandioca, 3) 3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de milho, 4) 1,5 g L⁻¹ de ágar + 75 g L⁻¹ de amido de milho, e 5) 100 g L⁻¹ de amido de milho, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição se constituiu de um frasco com cinco explantes.

Os meios de cultura foram acrescidos de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, e adicionados de 3,5 µM de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,03 µM de ANA (ácido naftalenoacético). O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão dos agentes solidificantes e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos. Foram utilizados frascos de 250 mL com 30 mL de meio de cultura.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 42 µmol m⁻² s⁻¹.

Foram realizadas cinco avaliações com intervalos semanais, sendo observado, o número de gemas e o número de brotações. Na última avaliação, anotou-se o comprimento médio das brotações e o comprimento da brotação mais desenvolvida. A partir do número de gemas determinou-se a taxa de multiplicação, dividindo-se o número de gemas por explante, obtido aos 35 dias de cultivo, pelo número inicial de gemas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan e por regressão polinomial, para os diferentes períodos de avaliação, através do uso do pacote estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987). Os dados do número médio de gemas e do número médio de brotações foram transformados segundo raiz quadrada de $x + 0,5$, onde x é o número obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambos os meios de cultura solidificados com 3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de mandioca formaram, quanto à aparência, uma goma pouco consistente (trêmula quando da manipulação dos frascos), porém aderente. A partir dos sete dias de cultivo, as folhas dos brotos apresentaram-se cloróticas, aumentando-se em todo período avaliado. Ao final de 35 dias de cultivo, grande parte da superfície das folhas já apresentavam coloração esbranquiçada. Efeito semelhante,

porém menos intenso, foi observado a partir dos 14 dias de cultivo nos explantes inoculados em meios solidificados com 100 g L⁻¹ de amido de milho. Estas observações indicam que a disponibilidade dos nutrientes do meio de cultura pode ter sido afetada pelo agente solidificante, em vista dos sintomas observados nas plantas, como a clorose e o esbranquiçamento das folhas. Segundo PODWYSZYNSKA & OLSZEWSKI (1995), o agente solidificante pode influenciar a disponibilidade dos sais minerais do meio de cultura. BERUTO et al. (1995) mencionam que um meio de cultura muito sólido pode reduzir a disponibilidade de água e de sais minerais para o explante. É possível que as concentrações ótimas de sais dos meios solidificados com 3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de mandioca e 100 g L⁻¹ de amido de milho, deveriam ser mais elevadas do que as concentrações ótimas para o crescimento nos meios solidificados com os outros agentes solidificantes, em virtude das restrições na velocidade de difusão de nutrientes que estes solidificantes impuseram ao meio, diminuindo, desta forma, a disponibilidade dos nutrientes aos explantes e, conseqüentemente, surgindo então os sintomas de deficiência nutricional (clorose).

O número médio de gemas apresentou um comportamento linear crescente durante todo o período de cultivo, alcançando o maior valor (6,75 gemas) aos 35 dias (data da última avaliação) (Figura 1).

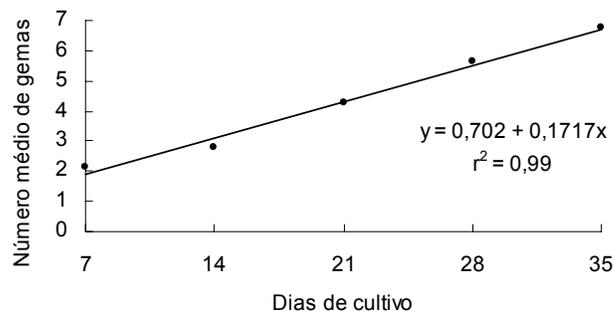


Figura 1 – Número médio de gemas em macieiras cv. Galaxy, multiplicadas *in vitro* no período de 35 dias. UFPel, Pelotas, RS, 2003.

Em meio de cultura MS, os melhores resultados obtidos para o número médio de gemas foram com a utilização de ágar (testemunha) ou sua substituição parcial pelo amido de milho (Figura 2). Quando se substituiu totalmente o ágar pelo amido de milho (100 g L⁻¹) ou parcialmente pelo amido de mandioca (3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de mandioca), os valores foram inferiores (3,97 e 3,52, respectivamente). Em meio de cultura WPM, os melhores resultados foram obtidos com a utilização de ágar (testemunha) ou sua substituição parcial pelo amido de milho ou de mandioca (Figura 2). Com a substituição total do ágar pelo amido de milho (100 g L⁻¹) obteve-se um número médio de gemas de 3,48. Estes resultados indicam que a utilização do amido de milho como solidificante, substituindo parcialmente o ágar, é tecnicamente viável, igualando-se ao ágar (testemunha) no que diz respeito ao número médio de gemas.

Para a taxa de multiplicação o melhor resultado foi obtido com meio de cultura MS (3,49) (Figura 3). As taxas de

multiplicação são variáveis nas cultivares de macieira, estando, geralmente, entre 3 e 6, num período de quatro semanas (ZIMMERMAN, 1984).

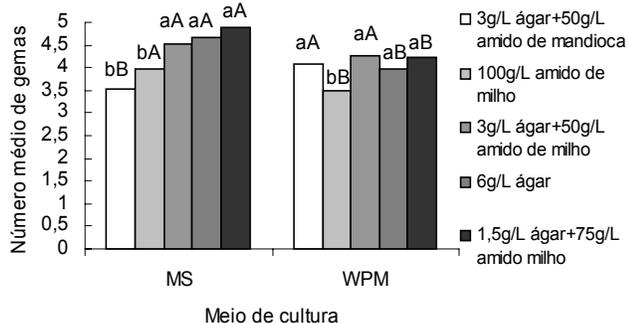


Figura 2 – Número médio de gemas em macieiras cv. Galaxy, multiplicadas *in vitro*, em meio de cultura MS e WPM, solidificados com diferentes agentes solidificantes. UFPel, Pelotas, RS, 2003. Médias não seguidas de mesma letra minúscula para mesmo meio de cultura e maiúscula entre meios de cultura, diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

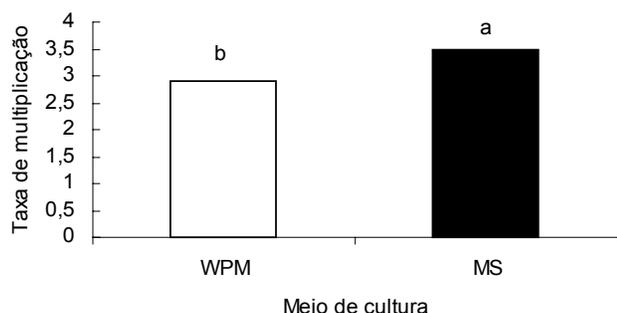


Figura 3 – Taxa de multiplicação de macieiras cv. Galaxy, multiplicadas *in vitro* no período de 35 dias, em meio de cultura MS e WPM. UFPel, Pelotas, RS, 2003. Médias não seguidas de mesma letra diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

Os maiores resultados para o número médio de brotações foram obtidos utilizando-se 6 g L⁻¹ de ágar (testemunha) e 3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de mandioca (1,82 e 1,79, respectivamente) como solidificantes do meio de cultura (Figura 4). Para o meio solidificado com ágar este resultado já era esperado, em vista dele ser tradicionalmente o solidificante mais utilizado. Além disso, o ágar é um agente solidificante que pode ter um efeito sobre o crescimento e desenvolvimento das culturas *in vitro* (SCHOLTEN & PIERIK, 1998), sendo que a maioria das espécies tem demonstrado bons resultados na multiplicação *in vitro* utilizando o ágar. No entanto, o número médio de brotações obtidos com a substituição parcial do ágar pelo amido de mandioca, também foi positivo, apesar da péssima aparência dos brotos aos 35 dias de cultivo (quando grande

parte da superfície das folhas apresentava-se de coloração esbranquiçada), e dele não ter proporcionado, de maneira geral, resultados superiores para o número médio de gemas.

O bom desempenho da substituição parcial do ágar pelo amido de mandioca para o número médio de brotações, pode estar relacionado a posição que o explante permaneceu sobre o meio de cultura, em virtude da consistência do meio, que neste caso mostrou-se como uma goma pouco consistente, não sustentando o explante na posição vertical (o explante permanecia na horizontal ou inclinado sobre o meio de cultura). Alguns trabalhos com macieira mostram que o explante na posição horizontal sobre o meio de cultura tende a aumentar a proliferação de brotos (ERIG & SCHUCH, 2002; TUROVSKAYA, 1994; ZIMMERMAN & FORDHAN, 1989; YAE et al., 1987). Isto, provavelmente se deve, ao maior contato do explante com o meio de cultura, não apenas através da base cortada, mas de toda sua superfície, favorecendo a maior absorção de água, de nutrientes e de fitorreguladores do meio, dentre os quais o BAP que é muito eficaz na promoção da multiplicação e indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

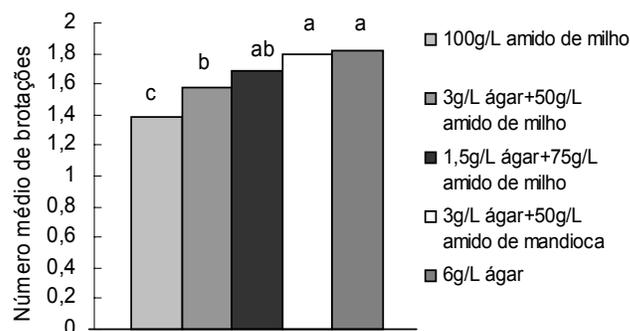


Figura 4 – Número médio de brotações em macieiras cv. Galaxy, multiplicadas *in vitro* em meios de cultura solidificados com diferentes agentes solidificantes. UFPel, Pelotas, RS, 2003. Médias não seguidas de mesma letra diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação aos meios de cultura, para o número médio de brotações ajustou-se uma curva de regressão polinomial ao longo dos 35 dias de cultivo (Figura 5). Para ambos os meios de cultura o ponto de máxima eficiência foi alcançado por volta dos 27 dias de cultivo, com um número médio de brotações de 2,07 e 1,74 para o meio WPM e MS, respectivamente. Número de brotações semelhante (1,84) foi obtido por SCHWENGBER et al. (1999) aos 42 dias de cultivo da macieira cv. Mark, em meio de cultura MS. HARADA & MURAI (1996) observaram que o meio WPM, com concentração de sais menor do que MS, possibilitou a obtenção de melhores resultados na micropropagação de *Prunus mume*.

Para o comprimento médio das brotações, o melhor resultado foi observado com o meio de cultura solidificado com 3g L⁻¹ de ágar + 50g L⁻¹ de amido de milho (0,54 cm), seguido daqueles solidificados com 6g L⁻¹ de ágar (testemunha) e 1,5g L⁻¹ de ágar + 75g L⁻¹ de amido de milho (0,49cm e 0,48cm, respectivamente) (Figura 6). Para o comprimento da brotação mais desenvolvida, não houve efeito significativo para nenhum dos fatores estudados, alcançando uma média de 0,61cm em todos os tratamentos.

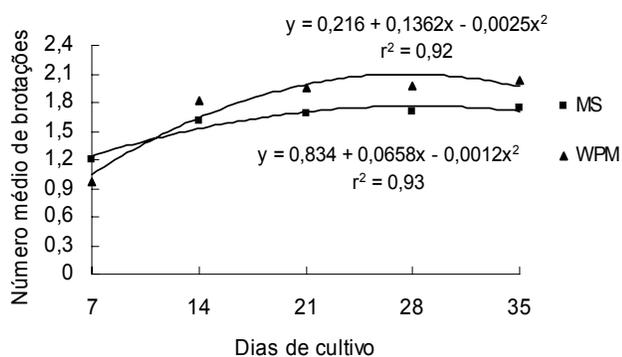


Figura 5 – Número médio de brotações em macieiras cv. Galaxy, multiplicadas *in vitro* no período de 35 dias, em meio de cultura MS e WPM, no período de 35 dias. UFPel, Pelotas, RS, 2003.

Quanto a consistência dos meios de cultura, não houve diferença em relação ao ágar ou na sua substituição parcial pelo amido de milho. A diferença se fez apenas pela transparência do meio de cultura, no qual o amido de milho apresentou um meio mais esbranquiçado (Figura 7). Porém, em o amido de mandioca substituindo o ágar parcialmente, a consistência do meio de cultura se mostrou menor do que

àquele onde se utilizou apenas o ágar (testemunha). Quando se utilizou o amido de milho substituindo totalmente o ágar, a consistência do meio de cultura foi maior. Entretanto, no final do experimento, a consistência de todos os meios de cultura se manteve estável. Meio de cultura solidificado com amido de mandioca em combinação com ágar foi utilizado no enraizamento do porta-enxerto MM 111, e foi observado que este também permaneceu bastante consistente durante todo o período de cultivo (FERRI et al., 1998).

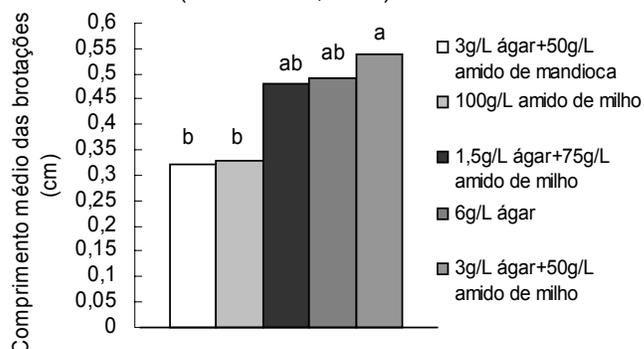


Figura 6 – Comprimento médio (cm) das brotações de macieiras cv. Galaxy, multiplicadas *in vitro* em meios de cultura solidificados com diferentes agentes solidificantes. UFPel, Pelotas, RS, 2003. Médias não seguidas de mesma letra diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

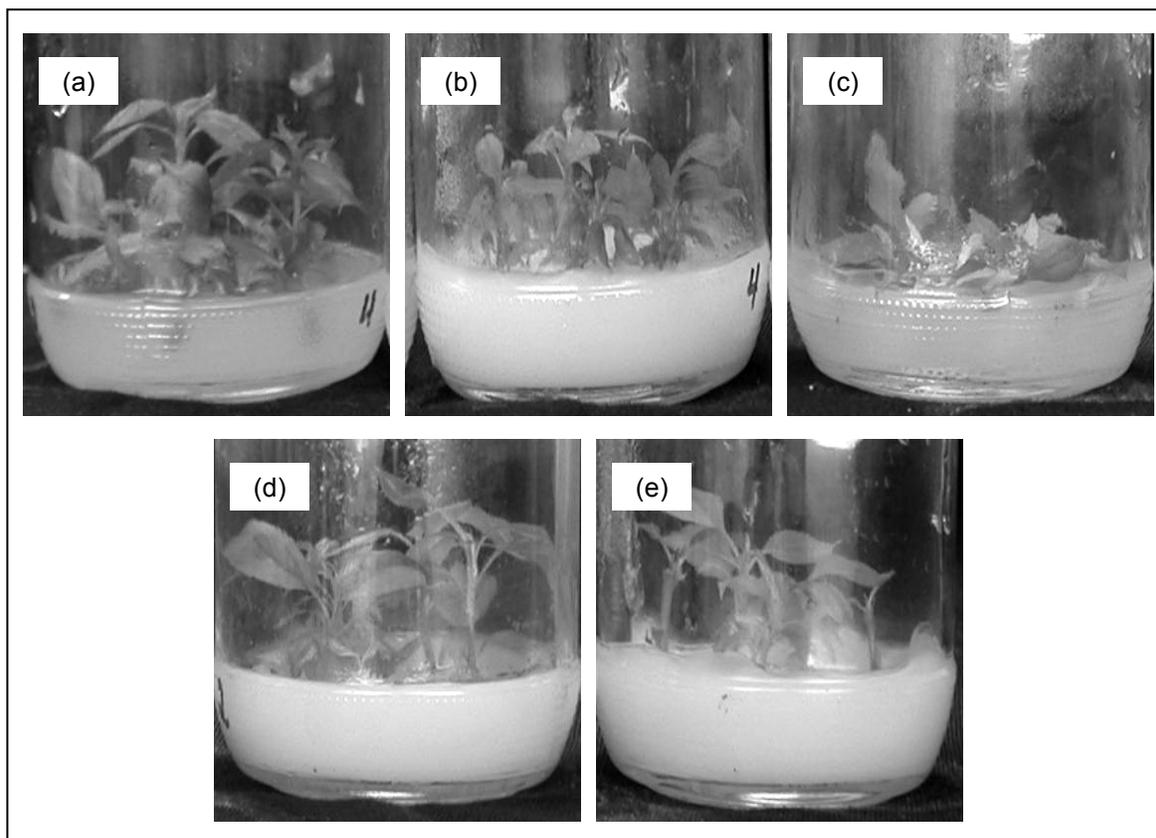


Figura 7 – Macieiras cv. Galaxy, multiplicadas *in vitro* em meio de cultura solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (a), 3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de milho (b), 3 g L⁻¹ de ágar + 50 g L⁻¹ de amido de mandioca (c), 1,5 g L⁻¹ de ágar + 75 g L⁻¹ de amido de milho (d) e 100 g L⁻¹ de amido de milho (e). UFPel, Pelotas, RS, 2003.

CONCLUSÕES

Na multiplicação *in vitro* de macieira cv. Galaxy, a maior taxa de multiplicação é obtida com meio de cultura MS, e a substituição parcial do ágar pelo amido de milho como solidificante, é tecnicamente viável, igualando-se ao ágar (testemunha).

ABSTRACT

The present work had as objective to determine the best culture medium and to study alternative gelling agents in the *in vitro* multiplication of apple tree cv. Galaxy. The completely randomized experimental design was used, in factorial outline 2 x 5, being tested two different culture mediums (MS and WPM), with five different gelling agents substituting partially or totally the agar: gelling agent 1) agar (6 g L⁻¹) (testimony), 2) agar (3 g L⁻¹) + cassava starch (50 g L⁻¹), 3) agar (3 g L⁻¹) + corn starch (50 g L⁻¹), 4) agar (1.5 g L⁻¹) + corn starch (75 g L⁻¹), and 5) corn starch (100 g L⁻¹). The culture mediums were added with myo-inositol (100 mg L⁻¹), sucrose (30 g L⁻¹), BAP (6-benzylaminopurine) (3.5 μM) and NAA (naphthaleneacetic acid) (0.03 μM). It was concluded that, in the *in vitro* multiplication of apple tree cv. Galaxy, the partial substitution of agar by corn starch as gelling agent, is technically viable, providing similar results to the agar (control), and that the largest multiplication rate is obtained with the MS culture medium.

Keywords: tissue culture, corn starch, cassava starch, agar, *Malus domestica*.

REFERÊNCIAS

- BERUTO, D.; BERUTO, M.; CICCARELLI, C.; et al. Matric potential measurements for gelled substrates. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.94, p.151-157, 1995.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p.87-132.
- CAMILO, A.P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, 2002. p.113-168.
- CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B. et al. Efeito de TDZ na multiplicação *in vitro* da macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Fred Hough. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.3, p.393-396, 1997.
- DE PAOLI, G. Micropropagazione delle varietà di pero. **L'Informatore Agrario**, Verona, v.43, p.71-73, 1989.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.293-295, 2002.
- FERRI, V.C.; CENTELLAS, A.Q.; HELBIG, V.E.; et al. Uso de ágar, amido e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira MM 111. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.4, p.561-565, 1998.
- 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-CNPq, v.1, 1998. p.183-260.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.8, p.265-267, 1996.
- HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.22, p.347-358, 1984.
- ISHIDA, J.S.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J. et al. Reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira [*Malus silvestris* (L.) Mill cv. MM-106]. **Ciência e Prática**, Lavras, v.17, n.1, p.58-63, 1993.
- LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y.G.; et al. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Reports**, New York, v.21, p.402-407, 2003.
- LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.18, p.100-127, 1965.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PODWYSZYNSKA, M.; OLSZEWSKI, T. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.64, p.77-84, 1995.
- SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.77, p.109-116, 1998.
- SCHWARTZ, E.; RONCATTO, G.; FORTES, G.R.L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido utilizando 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.77-79, 2000.
- SCHWENGBER, J.E.; RODRIGUES, A.C.; RUFATO, L.; et al. Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação de microestacas do porta-enxerto de macieira cv. Mark. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.200-203, 1999.
- STAINER, R.; WOHLGEMUTH, H.; GUMMERER, K. Risch e opportunità dei mutanti di melo. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofrutticoltura**, Bologna, n.9, p.19-23, 2001.
- STANLEY, D. Tissue-culturing plants on corn starch. **Agricultural Research**, Washington, v.47, p.11, 1995.
- TITEL, C.; EHWALD, R.; ZOGLAUER, K.; et al. A parenchymatic medium solidifier for plant *in vitro* culture. **Plant Cell Reports**, New York, v.6, p.473-475, 1987.
- TSUCHIYA, S. Perspectivas das novas cultivares japonesas de maçã no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 4., 2001, Fraiburgo. **Anais... Fraiburgo, SC: ENFRUTE**, 2001. p.58-68.
- TUROVSKAYA, N.I. *In vitro* micropropagation of apple and pear. **Sadovodstvo I Vinogradarstvo**, Moscow, n.1, p.10-12, 1994.
- WALSH, C.S.; VOLZ, R. 'Gala' and the Red 'Gala' sports: A preliminary comparison of fruit maturity. **Fruit Varieties Journal**, Urbana, v.1, n.45, p.2-3, 1990.
- YAE, B.W.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I.; et al. Influence of photoperiod, apical meristem, and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. **Journal of**

the American Society for Horticultural Science, Alexandria, v.112, p.588-592, 1987.
ZIMMERMAN, R.H. Apple. In: SHARP, W.R.; YAMADA, Y. **Handbook of Plant Cell Culture**, New York: MacMillan, v.2, 1984. p.369-395.
ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Explant orientation affects

axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.2, p.351-352, 1989.
ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPEl, 1987. 138p.