

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE BROTOS DE MACIEIRA (*Malus domestica* Borkh.) A PARTIR DE FRAGMENTOS DELGADOS DE FOLHAS

In vitro morphogenesis of shoots of apple tree (*Malus domestica* Borkh.)
starting from thin fragments of leaves

Alan Cristiano Erig¹, Márcia Wulff Schuch²

RESUMO

O pré-requisito para se obter sucesso na transformação genética de plantas, e também para a multiplicação rápida do genótipo modificado pela micropropagação, é um protocolo de regeneração eficiente. Objetivou-se com este trabalho estudar a expressão do potencial morfogenético de fragmentos delgados de folhas de macieira e otimizar um protocolo de regeneração visando futuros trabalhos de transformação genética. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 x 6, com três cultivares de macieira (Galaxy, Maxigala e Mastergala), dois tipos de explantes (fragmentos finos de folhas cortados no sentido transversal e longitudinal), e seis concentrações de thidiazuron (TDZ) no meio de cultura (0; 4,54; 9,08; 13,62; 18,16 e 22,7 µM), totalizando 36 tratamentos. Os sais e vitaminas do meio MS foram acrescidos de mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (6 g.L⁻¹) e adicionados de 1,6 µM ácido naftalenoacético (ANA). Foram utilizados frascos com capacidade para 150 mL com 6 mL de meio de cultura. Os explantes foram obtidos de plantas cultivadas *in vitro*, em fase de multiplicação, 45 dias após a repicagem, e se constituíram de finos fragmentos da parte mediana de folhas, cortados no sentido transversal (comprimento de 8 a 10 mm) ou longitudinal (comprimento de 10 a 12 mm), ambos com largura aproximada de 1 mm. A porcentagem de regeneração, a intensidade de formação de calo e o número de brotos por explante foram avaliados aos 45 dias de cultivo. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que a expressão do potencial morfogenético dos fragmentos delgados de folhas cortados no sentido transversal é maior do que o daqueles cortados no sentido longitudinal, e o seu cultivo em meio de cultura com 4,54 µM de TDZ, propicia, simultaneamente, elevada porcentagem de regeneração, maior número de brotos e menor intensidade de calo.

Termos para indexação: Cultura de tecidos, regeneração de brotos, reguladores de crescimento, thidiazuron, tipo de explante.

ABSTRACT

The prerequisite to obtain success in the plants genetic transformation, and also for the fast multiplication of the modified genotype through the micropropagation, it is a efficient regeneration protocol. The objective of this work was to study the expression of the morphogenetic potential of thin fragments of apple tree leaves, and to optimize a regeneration protocol seeking futures works of genetic transformation. The completely randomized experimental design was used, in factorial outline 3 x 2 x 6, with three cultivars of apple tree (Galaxy, Maxigala and Mastergala), two explants types (thin fragments of leaves cut in the transversal and longitudinal direction), and six concentrations of thidiazuron (TDZ) in the culture medium (0; 4.54; 9.08; 13.62; 18.16 and 22.7 µM), totaling 36 treatments. The MS medium salts and vitamins were added of myo-inositol (100 mg.L⁻¹), sucrose (30 g.L⁻¹), agar (6 g.L⁻¹) and 1.6 µM naphthaleneacetic acid (NAA). Flasks with capacity for 150 mL with 6 mL of culture medium were used. The explants were obtained of plants *in vitro* cultivated, in multiplication phase, 45 days after the inoculation, and they were constituted of fine fragments of the medium part of leaves, cut in the transversal direction (length from 8 to 10 mm) or longitudinal (length from 10 to 12 mm), both with approximate width of 1 mm. The regeneration percentage, the intensity of callus formation and the number of shoots formed by explant were evaluated by the 45 days of cultivation. Starting from the obtained results it was ended that the expression of the morphogenetic potential of the thin fragments of leaf cut in the transversal direction is higher than those cut in the longitudinal direction, and its cultivation in culture medium with 4.54 µM of TDZ, propitiates, simultaneously, high regeneration percentage, great number of shoots formation and smaller callus intensity.

Index terms: tissue culture, shoots regeneration, growth regulators, thidiazuron, explant type.

(Recebido para publicação em 28 de abril de 2004 e aprovado em 30 de março de 2005)

INTRODUÇÃO

As espécies frutíferas, em geral, são perenes, de longo ciclo vegetativo, de porte relativamente grande e

com alto nível de heterozigossidade, características estas que dificultam e aumentam o tempo necessário para um programa de melhoramento genético por meio do método convencional de hibridização. A biotecnologia,

1. Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Doutorando do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas – Caixa Postal 354 – 96.010-900 – Pelotas, RS – Bolsista CAPES – acerig@ufpel.tche.br
 2. Engenheira Agrônoma, Dr^a, Professora do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas Caixa Postal 354 – 96.010-900 – Pelotas, RS – marciaws@ufpel.tche.br
- Apoio do MCT/CNPq.

através da cultura de tecidos, da biologia molecular e das técnicas de transferência de genes, além de reduzir o tempo do processo de melhoramento genético de plantas, também possibilita que problemas agrônômicos e ambientais de difícil solução, que ocorrem quando se utilizam os métodos genéticos convencionais, sejam superados. Várias características já foram introduzidas estavelmente em plantas através da transformação genética, incluindo a resistência a herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos, e também melhorias na qualidade do produto (MANSUR & MARGIS-PINHEIRO, 1995).

Cultivares de macieira (*Malus domestica* Borkh.) como as mutações coloridas da 'Gala', entre elas a 'Galaxy', a 'Maxigala' e a 'Mastergala', atualmente difundidas no mundo, também podem ser melhoradas via transformação genética. Uma possibilidade é a transformação destas cultivares com o gene que codifica a ACC oxidase em orientação "antisense", o que resultará em plantas que apresentam síntese de etileno reduzida e com conseqüente retardamento no amadurecimento das frutas (SCHUCH, 2000), aumentando seu período de conservação pós-colheita.

O pré-requisito para se obter sucesso na transformação genética de plantas, e também para a multiplicação rápida do genótipo modificado pela micropropagação, é um protocolo de regeneração eficiente (NHUT et al., 2003), em que, além de fatores como o balanço entre auxinas e citocininas no meio de cultura, outros também são importantes em muitas espécies (HANDRO & FLOH, 1990), como a cultivar e o tipo de explante utilizado (RAO et al., 1996). Muitas vezes os explantes utilizados na indução da regeneração são excessivamente grandes, e a capacidade das células transformadas e não transformadas de um tecido morfogênico regenerarem é a mesma, especialmente quando o nível de seleção é baixo, ou quando o broto regenerado surge do interior do explante ou da superfície que não entrou em contato com o meio seletivo, ou ainda quando o agente seletivo não teve tempo de difundir-se pelo explante e exercer uma pressão de seleção (NHUT et al., 2003).

Diante disto, a utilização de explantes menores pode diminuir a presença de células não transformadas, expondo um maior número de células ao meio seletivo, e assim, minimizar a incidência de escapes. Objetivou-se com este trabalho estudar a expressão do potencial morfogênico de fragmentos delgados de folhas de macieira das cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala, e otimizar um protocolo de regeneração visando futuros trabalhos de transformação genética.

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. Os tratamentos consistiram da combinação de três cultivares de macieira (Galaxy, Maxigala e Mastergala), de dois tipos de fragmentos de folhas - explantes (cortados no sentido transversal e longitudinal da folha), e de seis concentrações de TDZ (thidiazuron) no meio de cultura (0; 4,54; 9,08; 13,62; 18,16 e 22,7 μM), totalizando 36 tratamentos.

Os explantes foram obtidos de plantas cultivadas *in vitro*, em fase de multiplicação, 45 dias após a repicagem em meio de cultura constituído dos sais e vitaminas MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com o nitrogênio reduzido a $\frac{3}{4}$ de sua concentração original, acrescido de 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 30 g.L^{-1} de sacarose, 6 g.L^{-1} de ágar, 3,55 μM de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,03 μM de ANA (ácido naftalenoacético), e se constituíram de finos fragmentos da parte mediana de folhas, cortados no sentido transversal - perpendicular à nervura central da folha (comprimento de 8 a 10 mm) ou longitudinal - paralelo à nervura central da folha (comprimento de 10 a 12 mm) (Figura 1a e 1b, respectivamente), ambos com largura aproximada de 1 mm, que foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura.

O meio de cultura constituiu-se dos sais e vitaminas MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescidos de 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 30 g.L^{-1} de sacarose, 1,6 μM de ANA e adicionado de TDZ, cuja concentração variou com o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L^{-1} e autoclavagem a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos com capacidade para 150 mL com 6 mL de meio de cultura.

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

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 x 6, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição se constituiu de um frasco com cinco explantes.

Aos 45 dias após o início dos tratamentos avaliou-se a porcentagem de regeneração, a intensidade de formação de calo e o número de brotos por explante. Para a variável intensidade de formação de calo foram atribuídas notas de 0 a 3, sendo 0 = ausência, 1 = pouca, 2 = média e 3 = alta intensidade de calo, conforme ilustrado na Figura 1c.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Duncan e analisados por regressão polinomial, utilizando-se o pacote estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987). Os dados da porcentagem de regeneração foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$ e os da intensidade de formação de calo segundo $\log x + K$, sendo x a nota atribuída e $K = 1$. Os dados do número médio de brotos foram transformados segundo raiz quadrada de $x + 0,5$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância verificou-se que não houve efeito significativo para o fator cultivar em nenhuma das três variáveis avaliadas.

Maiores porcentagens de regeneração e intensidade

de formação de calo foram obtidas com o fragmento delgado transversal de folha comparado ao longitudinal (Tabela 1). O fragmento delgado transversal de folha constituiu-se somente de tecidos da parte mediana da folha, e além disto, de parte da nervura central da folha (tecido vascular), enquanto que, o fragmento longitudinal de folha, constituiu-se de tecidos de todo o comprimento da folha (parte apical, mediana e basal) e nenhuma parte da nervura central, pois foi obtido a partir de cortes paralelos à nervura. Os resultados obtidos indicam que a parte mediana da folha com presença de uma porção da nervura central (tecido vascular) apresenta maior capacidade regenerativa, o que de certa forma, já havia sido constatado por outros autores (JAMES et al., 1988; PÉREZ-TORNERO et al., 2000; YEPES & ALDWINCKLE, 1994) os quais relataram que, normalmente, a regeneração está associada com o tecido vascular ou com as extremidades cortadas da folha. No desenvolvimento de brotos adventícios em folhas de cerejeira doce (*Prunus avium* L.) e cerejeira azeda (*Prunus cerasus* L.), Tang et al. (2002) observaram que, geralmente, os brotos surgiam a partir da nervura da folha ou em associação com o tecido vascular.

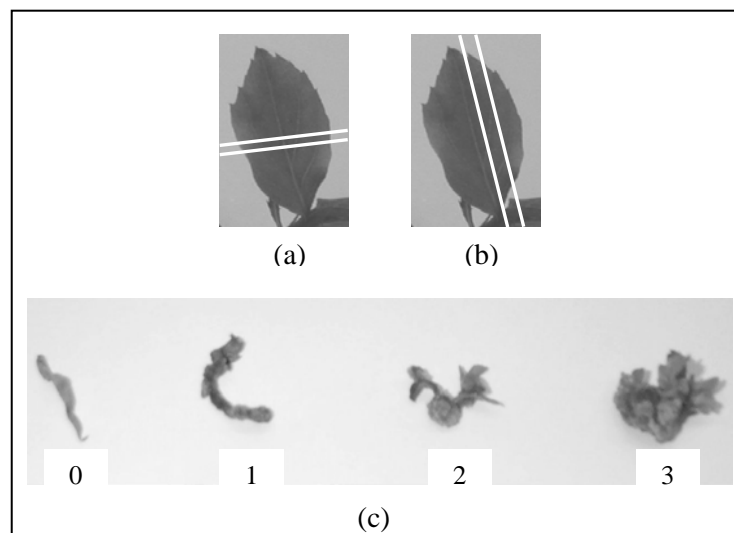


FIGURA 1 – Folhas de macieira com ilustração do corte para obtenção dos fragmentos delgado transversal (a) e longitudinal (b) utilizados como explantes para a morfogênese *in vitro*, e diferentes intensidades de formação de calo nos explantes (notas: 0 = ausência; 1 = pouca; 2 = média; e 3 = alta intensidade de calo) (c). UFPel, Pelotas, RS, 2004.

TABELA 1 – Porcentagem de regeneração e intensidade de formação de calo em explantes obtidos de folhas de macieira cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em função do tipo de fragmento delgado de folha. UFPel, Pelotas, RS, 2004.

Fragmento delgado de folha	Porcentagem de regeneração *	Intensidade de formação de calo *
Transversal	81,66a	1,59a
Longitudinal	71,35b	1,30b
Média	61,14	0,89
CV (%)	29,36	15,97

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A importância da parte do segmento da folha, utilizado como explante, também foi constatada por Sarwar & Skirvin (1997). Estes autores utilizaram folhas de macieira das cvs. McIntosh, Macspur e Wijeik cortadas em três segmentos: parte basal, mediana e apical, e verificaram que os segmentos diferiram em sua capacidade regenerativa, sendo que em todos os casos, a parte mediana apresentou a maior regeneração, seguida pela parte basal, e por último, pela parte apical. De acordo com Tang et al. (2002), é sabido que quando um órgão completo da planta é cortado em partes, os vários segmentos diferem na sua capacidade de expressão morfogênica. Segundo estes autores, a capacidade regenerativa aumenta substancialmente da secção distal para a secção proximal da folha, e isto poderia estar relacionado à presença de um gradiente de fitoreguladores endógenos ou à interação e balanço entre os fitoreguladores endógenos e os reguladores de crescimento exógenos, o que poderia ser responsável pela diferente regeneração dos distintos segmentos da folha.

Em relação à concentração de TDZ no meio de cultura, observou-se efeito quadrático para as três variáveis analisadas (Figura 2a, 2b e 2c). Para a porcentagem de regeneração, o ponto de máxima eficiência calculado em função da equação de regressão foi obtido com 14,69 μM de TDZ (Figura 2a). No entanto, observando-se as médias verifica-se que não houve diferença significativa para esta variável adicionando-se 4,54; 9,08; 13,62; 18,16 ou 22,7 μM de TDZ no meio de cultura. Assim, ao utilizar-se a concentração mais baixa (4,54 μM de TDZ) consegue-se o mesmo resultado que seria obtido com as concentrações mais elevadas, reduzindo-se, portanto, o gasto com TDZ que tem custo elevado. Sem TDZ no meio de cultura (0 μM), no presente trabalho, a

porcentagem de regeneração foi nula, o que está de acordo com a afirmativa de Davies (1990), de que as citocininas constituem o grupo de fitoreguladores indispensáveis para promover a divisão celular e a diferenciação dos tecidos. Schuch & Peters (2002) obtiveram a maior porcentagem de regeneração de brotos, utilizando folhas inteiras de macieira cv. Gala (85,57%), com 18,16 μM (4 mg.L⁻¹) de TDZ no meio de cultura.

A maior intensidade de formação de calo (nota de 2,27) foi obtida utilizando-se 15,26 μM de TDZ (Figura 2b). De acordo com Huetteman & Preece (1993), o TDZ é uma potente substância com efeito de citocinina para estimular a formação de calos em explantes lenhosos, especialmente quando usado em concentração igual ou superior a 1 μM . Na indução e manutenção de calos de *Cordia verbenacea* L., a partir de segmentos caulinares, Lameira et al. (1997) verificaram que os tratamentos com as menores concentrações de TDZ foram menos eficientes, apresentando explantes com 50% da área coberta com calo, não ocorrendo a proliferação de brotos neste trabalho.

A formação de calo nos explantes cultivados em meio de cultura sem TDZ (0 μM) foi nula, indicando que o crescimento de calo nestas cultivares de macieira é dependente de citocinina e auxina (esta última esteve presente em todos os tratamentos na concentração de 1,6 μM de ANA). Segundo Yeoman (1970), o crescimento de calo em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina, dependente de auxina, dependente de citocinina ou dependente de ambas. O mesmo autor relata ainda que certos tecidos mostram uma dependência total da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam.

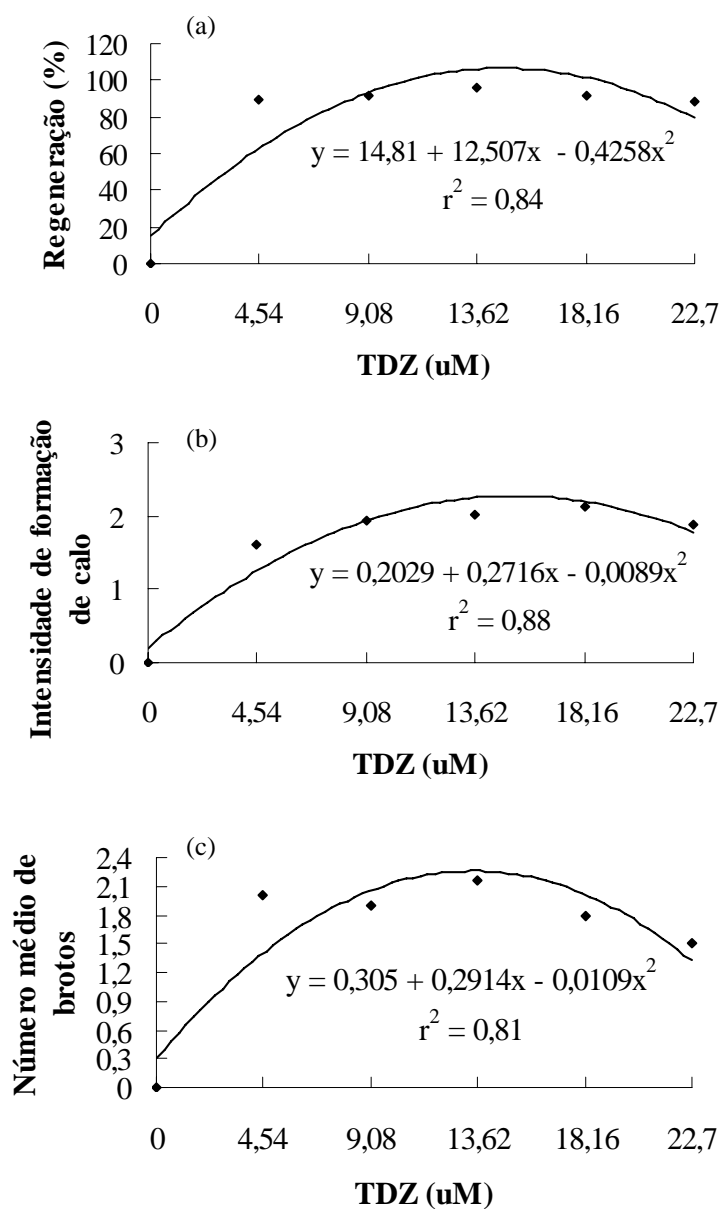


FIGURA 2 – Porcentagem de regeneração (a), intensidade de formação de calo (b), e número médio de brotos (c) em fragmentos delgados de folhas de macieira cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em função da concentração de TDZ no meio de cultura. UFPel, Pelotas, RS, 2004.

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

O principal obstáculo em utilizar a fase de calo está no tempo necessário para que o processo de regeneração ocorra, aumentando o risco de variação somaclonal (TAO et al., 1997). Além disto, na transformação genética o calo dificulta a seleção de células transformadas, favorecendo a formação de escapes. Neste trabalho, apesar de ter ocorrido formação de calo,

observou-se que a maioria das brotações regeneradas originou-se via regeneração direta, isto é, a partir de tecidos do explante (dados não mostrados).

O ponto de máxima eficiência calculado pela equação para o número médio de brotos (2,25), foi obtido com 13,37 μM de TDZ no meio de cultura (Figura 2c). No entanto, observando-se as médias, verifica-se que não houve diferença no número de brotos com 4,54 e 13,62 μM de TDZ (2,01 e 2,16 brotos, respectivamente). Assim, da mesma maneira que para a porcentagem de regeneração, recomenda-se utilizar a concentração mais baixa (4,54 μM de TDZ), obtendo-se o mesmo resultado que seria obtido com uma concentração mais elevada e, ao mesmo tempo, reduzindo o custo com TDZ. Além disto, com esta concentração, observou-se a menor intensidade de formação de calo (com exceção do tratamento sem TDZ), o que é desejável quando o objetivo é a regeneração de brotos. Schuch & Peters (2002) obtiveram o maior número de brotações a partir de folhas inteiras de macieira cv. Gala (2,59 por explante) com 18,16 μM (4 mg.L^{-1}) de TDZ.

No presente trabalho, em muitos explantes observou-se a formação de múltiplas gemas adventícias próximas uma das outras, que devido ao reduzido tamanho não foram contabilizadas como brotos. Muitos brotos formados também se apresentaram pequenos e agrupados. Segundo Huetteman & Preece (1993), o aumento na concentração de TDZ tende a estimular a formação de calos à custa do crescimento dos brotos. Kim et al. (1997) relatam que a formação de brotos, com a utilização de TDZ é grande em concentrações elevadas (5 a 10 mg.L^{-1} ou 22,7 a 45,4 μM), mas com tamanho muito reduzido.

CONCLUSÕES

O fragmento delgado transversal de folha apresenta maior expressão do potencial morfogênético do que àquele cortado no sentido longitudinal da folha, e o seu cultivo em meio de cultura com 4,54 μM de TDZ propicia, simultaneamente, elevada porcentagem de regeneração, grande número de brotos e menor intensidade de calo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVIES, P. J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Netherlands: Kluwer Academic, 1990. 681 p.

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-CNPq, 1990. p. 203-212.

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

JAMES, D. J.; PASSEY, A. J.; RUGINI, E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 132, p. 148-154, 1988.

KIM, M. S.; SCHUMANN, C. M.; KLOPFENSTEIN, N. B. Effects of thidiazuron and benzyladenine on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 48, p. 45-52, 1997.

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

MANSUR, E.; MARGIS-PINHEIRO, M. Plantas geneticamente modificadas: um caminho para o melhoramento vegetal. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 23, p. 2-7, 1995.

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

NHUT, D. T.; SILVA, J. A. T.; LE, B. V.; VAN, K. T. Thin cell layer (TCL) morphogenesis as a powerful tool in woody plant and fruit crop micropropagation and biotechnology, floral genetics and genetic transformation. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 783-814.

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

- RAO, C. D.; GOH, C. J.; KUMAR, P. P. High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 204-209, 1996.
- SARWAR, M.; SKIRVIN, R. M. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus X domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, p. 95-100, 1997.
- SCHUCH, M. W. **Regeneração e transformação de macieira, cultivar Gala, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, visando a obtenção de plantas com o gene antisense da ACC Oxidase.** 2000. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.
- 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.
- 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 cryIA[©] gene of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 122, n. 6, p. 764-771, 1997.
- YEOMAN, M. M. Early development in callus culture. **International Review of Cytology**, New York, v. 29, p. 383-409, 1970.
- 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**, The Hague, v. 37, p. 257-269, 1994.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores.** Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138 p.