

Multiplikasi Tunas Belimbing Dewi (*Averrhoa carambola*) melalui Kultur *In Vitro*

Yati Supriati, Ika Mariska, dan Mujiman

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor

ABSTRACT

Star fruit (*Averrhoa carambola*) is one of tropical fruits which had a high content of vitamin C, which was higher than that in apple and grape. As fresh consumption, star fruit had a good role in decreasing human blood pressure. Main constraints of star fruit development weather for conservation purpose and or for cultivation were still limited due to lack of seedlings availability. *In vitro* culture technique was one of the alternative technologies capable of producing seedlings in a large quantity, uniform growth and relatively in a short period. One of the important keys in micropropagation work was the step of shoot initiation and multiplication. In this study we used two kind of explant, namely shoot with single node and shoot from germinated embryo. Experiment I, shoot with single node and shoot from germinated embryo were planted at WPM media + citric acid 100 mg/l. The next activities was focused on single node shoots which was subcultured at WPM + BAP 0.5 mg/l. In experiment II *in vitro* shoots from previous experiment was subcultured at WPM + BA (1 and 2 mg/l) + thidiazuron (0.1 and 0.2 mg/l). To stimulate shoot multiplication rate, shoot was subcultured at WPM or MS media in combination with IAA 0.5 mg/l and zeatin 2 mg/l. To improve vigourity of the plant, *in vitro* shoots resulted from multiplication media was planted at WPM or MS media containing paclobutrazol (0.4 and 0.8 mg/l) + BA 2 mg/l + thidiazuron 0.2 mg/l. Result showed that the use of single node shoot as an explant better than shoot comes from germinated embryo. Sub culture of star fruit shoot on WPM basal media containing BAP of 0.5 mg/l produce the shoot number about 4, and the shoot number could be increased until 18 by using IAA 0.5 mg and zeatin 2 mg/l. The treatment of shock temperature at 4-5°C during 4 days before planting could fasten shoot initiation time from 3 months to 1 months. An addition of 0.4 mg/l paclobutrazol on MS or WPM media containing 2 mg/l BA and 0.2 mg/l thidiazuron could improve vigourity of plantlet.

Key words: *Averrhoa carambola*, shoot multiplication, *in vitro* culture.

ABSTRAK

Belimbing (*Averrhoa carambola*) merupakan tanaman buah tropik yang mengandung vitamin C lebih tinggi daripada apel dan anggur. Buah belimbing segar sangat berguna untuk menurunkan tekanan darah. Pengembangan tanaman ini untuk keperluan budi daya ataupun untuk tujuan konservasi masih

belum optimal karena terbatasnya bibit. Teknik kultur jaringan merupakan alternatif teknologi yang mampu menyediakan bibit secara massal, seragam, dan relatif cepat. Salah satu tahap yang harus ditempuh dalam perbanyakan bibit melalui kultur jaringan adalah multiplikasi tunas yang menjadi kunci dalam keberhasilan teknik perbanyakan ini. Percobaan terdiri atas beberapa kegiatan menggunakan dua jenis eksplan, yaitu tunas dengan nodus tunggal dan tunas dari perkecambahan embrio. Pada percobaan I eksplan tunas dengan nodus tunggal ditanam pada media WPM + asam sitrat 100 mg/l kemudian disubkultur pada media WPM + BAP 0,5 mg/l. Pada percobaan II, tunas *in vitro* disubkultur kembali pada media WPM + BA (1 dan 2 mg/l) + thidiazuron 0,1 dan 0,2 mg/l). Untuk lebih memacu tingkat pertunasan dilakukan subkultur kembali pada media WPM atau MS yang ditambah dengan IAA 0,5 mg/l dan zeatin 2 mg/l. Untuk meningkatkan ketegaran, tunas hasil multiplikasi ditanam pada media WPM atau MS + BA 2 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l dan paclobutrazol (0; 0,4; dan 0,8 mg/l). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan eksplan tunas dengan nodus tunggal lebih baik dibandingkan dengan tunas yang berasal dari perkecambahan embrio. Subkultur yang dilakukan pada media WPM yang mengandung 0,5 mg/l BAP dapat menginisiasi dan menghasilkan rata-rata empat tunas. Subkultur tunas belimbing pada media MS + IAA 0,5 mg/l + zeatin 2 mg/l dapat memacu pembentukan tunas yang banyak, mencapai 18 buah. Penambahan paclobutrazol 0,4 mg/l ke dalam media MS atau WPM yang telah mengandung BA 2 mg/l dan thidiazuron 0,2 mg/l dapat memperbaiki ketegaran biakan.

Kata kunci: *Averrhoa carambola*, multiplikasi tunas, kultur *in vitro*.

PENDAHULUAN

Dewasa ini masyarakat menyadari pentingnya hidup sehat. Oleh karena itu, mereka membutuhkan sayuran dan buah-buahan sebagai sumber vitamin. Menurut Biro Pusat Statistik (2001), pada tahun 2000 penduduk Indonesia berjumlah lebih dari 200 jiwa. Dengan perkiraan konsumsi buah sebanyak 40 kg/kapita/tahun, maka Indonesia memerlukan buah sebanyak 8,24 juta ton setiap tahun (Nuhung 2002). Sayangnya di pasar swalayan, toko buah, pasar tradisional, bahkan di kaki limapun saat ini banyak dibanjiri oleh buah-buahan subtropik seperti apel,

jeruk, dan anggur dengan harga yang sulit terjangkau oleh masyarakat menengah ke bawah. Sementara itu, buah-buahan tropis walaupun banyak dijumpai, kualitasnya masih belum memenuhi standar konsumsi. Kondisi ini menunjukkan bahwa arus buah impor akan mendesak pengembangan buah-buahan lokal yang umumnya merupakan buah tropik.

Belimbing (*Averrhoa carambola*) merupakan tanaman buah tropik yang mengandung vitamin C lebih tinggi dibandingkan dengan apel dan anggur. Tajuk kanopinya sangat rimbun dan indah sehingga disukai oleh masyarakat sebagai tanaman hias di pekarangan. Untuk konsumsi segar, buah belimbing dapat menurunkan tekanan darah, sedangkan untuk industri rumah tangga dapat digunakan dalam berbagai keperluan, mulai dari buah segar, manisan buah, jam, jeli, serta minuman dalam bentuk jus.

Walaupun beberapa wilayah di Indonesia mempunyai kondisi agroklimat yang cocok untuk pengembangan belimbing, namun upaya pengelolaan untuk tujuan komersial maupun konservasi masih sangat tertinggal dibandingkan dengan Malaysia. Saat ini, negara pengimpor belimbing terbesar dari Malaysia adalah Hongkong, Singapura, Eropa, dan Timur Tengah. Sampai saat ini belimbing Malaysia menguasai 90% pasar internasional dengan nilai ekspor yang selalu meningkat setiap tahunnya. Di Indonesia belum ada perkebunan belimbing yang intensif, karena keterbatasan bibit. Perbanyakkan bibit melalui teknik konvensional seperti stek, cangkok, dan okulasi memerlukan waktu yang relatif lama, di samping adanya kendala keseragaman. Untuk itu, diperlukan suatu teknologi alternatif yang dapat mempercepat penyediaan bibit bagi masyarakat luas. Dalam hal ini teknik kultur jaringan dapat digunakan sebagai salah satu alternatif yang dapat ditempuh karena teknik ini dapat memperbanyak bibit dalam jumlah banyak, relatif cepat, dan seragam.

Produksi bibit melalui kultur jaringan memerlukan beberapa tahapan, yaitu multiplikasi tunas, inisiasi dan perkembangan perakaran serta aklimatisasi, (George dan Sherington 1984). Berdasarkan jumlah kelipatan tunas dari setiap periode subkultur, maka jumlah planlet yang dapat diproduksi per satuan waktu dapat diperkirakan. Pennel (1987) memberikan formulasi untuk menghitung potensi jumlah planlet yang dapat dihasilkan secara teoritis

dalam satu periode tertentu dengan rumus sebagai berikut:

$$Y = A_n \times B \times F_1 \times F_2 \times F_3$$

di mana:

Y = jumlah planlet yang dapat dihasilkan

A = jumlah tunas yang dihasilkan pada setiap subkultur

B = jumlah eksplan awal yang tumbuh

n = jumlah subkultur pada periode tertentu

F1 = persentase keberhasilan pada tahap multiplikasi

F2 = persentase keberhasilan pada tahap perakaran

F3 = persentase keberhasilan aklimatisasi

Berdasarkan rumus di atas maka multiplikasi tunas menjadi tahap yang sangat penting dalam memproduksi bibit melalui kultur jaringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan formula media untuk menginisiasi dan memperbanyak tunas belimbing varietas Dewi melalui teknik kultur jaringan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor dari Februari hingga Desember 2003.

Belimbing yang digunakan adalah varietas lokal Jakarta yang dikenal dengan nama Dewi. Penelitian terdiri atas dua tahap, yaitu inisiasi tunas dan multiplikasi. Pada tahap inisiasi tunas kedua jenis eksplan yang telah dibersihkan disterilisasi dengan alkohol 70% selama 2-5 menit, dengan HgCl₂ 0,5% selama 1 menit, dan terakhir dengan clorox 20% selama 8 menit lalu dibilas dengan akuades sebanyak lima kali. Penelitian menggunakan dua jenis eksplan, yaitu tunas dengan nodus tunggal dan tunas yang berasal dari perkecambahan embrio. Pada percobaan I eksplan tunas dengan nodus tunggal dan tunas yang berasal dari perkecambahan embrio ditanam pada media WPM + asam sitrat 100 mg/l. Penggunaan eksplan tunas dari perkecambahan embrio memberikan hasil yang kurang baik, oleh karena itu, penelitian selanjutnya difokuskan kepada penggunaan eksplan tunas dengan nodus tunggal.

Tunas *in vitro* dari percobaan sebelumnya disubkultur ke dalam media WPM + BAP 0,5 mg/l + AgNO₃ 5 mg/l + arginin 100 mg/l + PVP 100 mg/l. Pada percobaan II, biakan disubkultur ke media dasar MS dan WPM yang dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh BAP (1 dan 2 mg/l) dan thidiazuron (0,1 dan 0,2 mg/l). Untuk meningkatkan laju multiplikasi, pada percobaan III tunas *in vitro* yang dihasilkan dari penelitian sebelumnya disubkultur pada media WPM atau MS, yang dikombinasikan dengan zeatin 2 mg/l dan IAA 0,5 mg/l. Pada percobaan IV subkultur dilakukan kembali dengan media, yaitu WPM atau MS yang diberi BA 2 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l dengan tiga taraf paclobutrazol (0; 0,4; dan 0,8 mg/l) terhadap semua perlakuan diberikan 200 mg/l arginin dan AgNO₃ 8 mg/l. Pemberian paclobutrazol diharapkan dapat meningkatkan ketebalan tangkai yang akhirnya akan meningkatkan ketegaran biakan. Ketegaran biakan diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan proses aklimatisasi. Peubah yang diamati adalah jumlah anak-an, jumlah tangkai daun, dan ketegaran tanaman secara visual

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Jenis Eksplan

Pada media WPM tanpa zat pengatur tumbuh, eksplan tunas dengan nodus tunggal tidak dapat menginisiasi mata tunas. Dengan demikian, tunas disubkultur pada media WPM + BA 0,5 mg/l + PVP 100 mg/l + AgNO₃ 5 mg/l + arginin 100 mg/l.

Pada media subkultur tersebut, BAP 0,5 mg/l dapat memacu terbentuknya tunas ganda yang berasal dari meristem lateral (Tabel 1). Zat pengatur tumbuh tersebut telah banyak digunakan pada berbagai spesies tanaman karena dapat meningkatkan multiplikasi tunas secara langsung maupun tidak langsung.

Untuk lebih meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk, pemberian BAP ditingkatkan dari 0,5 mg/l menjadi 1,0 dan 2,0 mg/l dan dikombinasikan dengan dua taraf thidiazuron (0,1 dan 0,2 mg/l). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian thidiazuron 0,1 dan 0,2 mg/l yang dikombinasikan dengan BAP pada media WPM belum dapat meningkatkan jumlah tunas secara signifikan, dengan tunas yang diperoleh rata-rata empat buah per eksplan. Walaupun demikian, pemberian thidiazuron tampaknya lebih berpengaruh terhadap peningkatan tinggi tunas dan jumlah daun (Tabel 2).

Peningkatan konsentrasi BA dari 1 mg/l ke 2 mg/l ternyata tidak dapat memacu proses diferensiasi tunas, walaupun dikombinasikan dengan thidiazuron. Penggunaan konsentrasi BA yang relatif tinggi tampaknya lebih memacu ke arah pembelahan sel tanpa adanya proses diferensiasi. Kondisi ini dicirikan dengan terbentuknya kalus pada pangkal tunas.

Tabel 2 juga menunjukkan bahwa pemberian thidiazuron 0,2 mg/l + BAP 1 mg/l menghasilkan pertumbuhan biakan yang terbaik di antara tiga kombinasi perlakuan lainnya. Hal ini terutama tampak pada peubah tinggi tunas dan jumlah daun. Karena pemberian thidiazuron menghasilkan respon yang berbeda pada dua tingkat konsentrasi BAP,

Tabel 1. Pengaruh BAP terhadap laju regenerasi eksplan batang belimbing Dewi dengan nodus tunggal.

Media awal	Media Sk-1	Jumlah tunas
WPM + asam sitrat 100 mg/l	Tanpa subkultur	1
WPM + asam sitrat 100 mg/l	WPM + BAP 0,5 mg/l + AgNO ₃ 5 mg/l + arginin 100 mg/l + PVP 100 mg/l	4

Tabel 2. Pengaruh zat pengatur tumbuh BAP dan thidiazuron pada media dasar WPM terhadap pertumbuhan tunas belimbing Dewi dalam kultur *in vitro*.

Perlakuan*	Jumlah tunas	Tinggi tunas	Jumlah daun
BAP 1 mg/l + thidiazuron 0,1 mg/l	1,3	8,5	3,0
BAP 1 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l	3,6	9,0	4,7
BAP 2 mg/l + thidiazuron 0,1 mg/l	1,0	3,6	1,0
BAP 2 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l	1,3	6,6	1,0

* seluruh media diberi AgNO₃ 5 mg/l dan arginin 100 mg/l + PVP 100 mg/l.

maka diperkirakan telah terjadi sinergisme yang optimal antara BAP 1 mg/l dengan thidiazuron 0,2 mg/l. Kombinasi kedua zat pengatur tumbuh tersebut dapat memacu proses polarisasi kumpulan sel somatik untuk membentuk bakal tunas dan selanjutnya akan memacu proses pemanjangannya (Van Niewkerk *et al.* 1986).

Peningkatan Multiplikasi Tunas

Untuk lebih meningkatkan jumlah tunas yang tumbuh telah dicoba penggunaan zeatin yang dikombinasikan dengan IAA pada media MS dan WPM. Hasil yang diperoleh cukup baik, di mana pemberian zeatin yang dikombinasikan dengan IAA pada media MS dapat menstimulasi pembentukan kalus pada pangkal tunas. Dari kalus tersebut kemudian terbentuk tunas adventif hingga menghasilkan 18 tunas (Tabel 3).

Tampaknya pemberian IAA 0,5 mg/l dan zeatin 2 mg/l memberikan pengaruh sinergi yang baik antar kedua zat pengatur tumbuh tersebut. Penggunaan IAA memacu pembentukan kalus di bagian pangkal tunas dan selanjutnya zeatin menstimulasi pembentukan meristem adventif dari kumpulan sel somatik tersebut.

Dengan konsentrasi yang diberikan tampaknya terjadi nisbah yang baik antara sitokinin terhadap auksin, sehingga multiplikasi meningkat (George dan Sherrington 1984). Media dasar MS yang dikombinasikan dengan IAA dan zeatin dapat membentuk jumlah tunas yang lebih banyak dibandingkan dengan media WPM. Hal ini mungkin berkaitan dengan kandungan total ion yang tinggi pada media dasar MS, khususnya NH₄. Menurut Hyndman *et al.* (1982) amonium dapat meningkatkan biosintesis sitokinin alami yang berperan dalam menstimulasi pertunasan.

Dari tunas yang tumbuh terlihat bahwa ketegaran tanaman masih kurang sempurna dan mudah layu. Hal ini disebabkan karena batang dan tangkai daun masih terlalu kecil. Untuk memperbaiki kete-

garan planlet dicoba penggunaan paclobutrazol. Paclobutrazol sangat berperan dalam meningkatkan biosintesis chlorophyl dalam jaringan tanaman dan menghambat pertumbuhan ke arah pemanjangan (Pinchera *et al.* 1990; Wang *et al.* 1986) sehingga diameter batang menjadi lebih besar dan daun menjadi lebih tebal.

Biakan yang diberi paclobutrazol terlihat lebih tegar. Dengan demikian, planlet yang terbentuk diharapkan akan lebih mudah beradaptasi pada lingkungan yang baru. Dari fenomena ini diketahui pula bahwa perlakuan formulasi media pada tahap akhir lingkungan *in vitro* sangat bermanfaat dalam mengoptimalkan kualitas planlet. Tunas yang lebih hijau dan lebih tegar karena paclobutrazol telah ditemukan pula pada biakan inggu (Husni *et al.* 1994) dan jahe (Mattjik 1994). Pada percobaan ini pemberian paclobutrazol pada konsentrasi 0,4 mg/l cukup baik pengaruhnya terhadap ketegaran tanaman (Tabel 3) dibandingkan planlet tanpa paclobutrazol. Akan tetapi, pemberian paclobutrazol 0,8 mg/l menyebabkan tanaman agak roset dan daun berwarna hijau tua.

Tabel 4 memperlihatkan pengaruh pemberian paclobutrazol pada media dasar WPM. Baik pada umur 3 minggu maupun 6 minggu penggunaan paclobutrazol tidak berpengaruh terhadap jumlah tunas. Demikian juga terhadap jumlah tangkai daun yang tidak berbeda nyata walaupun pada konsentrasi 0,4 mg/l.

Berbeda dengan media WPM, pemberian paclobutrazol pada media dasar MS meningkatkan jumlah tunas pada umur 6 minggu meskipun dalam kategori masih rendah (Tabel 5). Terhadap jumlah tangkai, pemberian paclobutrazol pada media MS hampir sama pengaruhnya dengan media WPM, yaitu memperbaiki ketegaran tanaman. Sesuai dengan pengaruhnya yang menghambat pertumbuhan ke arah pemanjangan sel, paclobutrazol menghambat sintesis GA₃ (Metchouachi *et al.* 1996). Dengan demikian, nutrisi dan zat pengatur tumbuh lebih ba-

Tabel 3. Pengaruh IAA dan zeatin pada media dasar MS terhadap pertumbuhan tunas belimbing.

Perlakuan	Jumlah tunas
WPM + IAA 0,5 mg/l + zeatin 2 mg/l	11
MS + IAA 0,5 mg/l + zeatin 2 mg/l	18

Tabel 4. Pengaruh pemberian paclobutrazol terhadap pertumbuhan tunas belimbing pada media dasar WPM saat umur 3 dan 6 minggu.

Perlakuan (mg/l)	Jumlah anakan		Jumlah tangkai daun	
	3 mg	6 mg	3 mg	6 mg
WPM + BA2+ thidiazuron 0,2	1	1	3,83	4,50
WPM + BA2+ thidiazuron 0,2 + paclobutrazol 0,4	1	1	4,13	4,33
WPM + BA2+ thidiazuron 0,2 + paclobutrazol 0,8	1	1	3,70	3,83

Tabel 5. Pengaruh pemberian paclobutrazol terhadap pertumbuhan tunas belimbing pada media dasar MS saat umur 3 dan 6 minggu pada *kultur in vitro*.

Perlakuan (mg/l)	Jumlah anakan		Jumlah tangkai daun	
	3 mg	6 mg	3 mg	6 mg
WPM + BA2 + thidiazuron 0,2	1,0	1,5	3,0	4,5
WPM + BA2 + thidiazuron 0,2 + paclobutrazol 0,4	1,0	1,7	4,0	4,7
WPM + BA2 + thidiazuron 0,2 + paclobutrazol 0,8	1,0	1,0	3,0	4,3

nyak digunakan untuk pembentukan dinding sel primer dan sekunder serta pembesaran sel membentuk diameter batang yang lebih besar.

Perlakuan BA2 + thidiazuron 0,2 + paclobutrazol 0,4 atau 0,8 memperbesar ukuran daun. Pada biakan belimbing, walaupun telah diberikan zat pengatur tumbuh yang daya aktivitasnya kuat (BA dan thidiazuron), tunas belimbing tidak mampu ber-multiplikasi. Perlakuan kombinasi MS + IAA 0,5 mg/l + zeatin 2 g/l memberikan hasil yang lebih baik (Tabel 1).

Dengan demikian, untuk memacu pertunasan belimbing dapat digunakan formulasi media tersebut di atas, sedangkan untuk meningkatkan ketegaran biakan sebelum diaklimatisasi perlu diberikan paclobutrazol.

KESIMPULAN

Beberapa kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Eksplan yang berasal dari tunas pucuk dengan nodus tunggal lebih baik daripada tunas yang berasal dari embrio hasil perkecambahan.
2. Inisiasi tunas belimbing dapat terjadi dengan menggunakan media dasar WPM yang ditambah dengan BAP 2 mg/l.
3. Jumlah tunas yang terbentuk dapat ditingkatkan menjadi 18 dengan subkultur tunas *in vitro* pada

media MS yang diberi zat pengatur tumbuh IAA 0,5 mg/l dan zeatin 2 mg/l.

4. Penambahan paclobutrazol 0,4 mg/l ke dalam media MS atau WPM yang mengandung BA 2 mg/l dan thidiazuron 0,2 mg/l dapat memperbaiki ketegaran biakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Biro Pusat Statistik. 2001. Statistik Indonesia. Biro Pusat Statistik. 608 hlm.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exergetics Ltd. 709 p.
- Hyndman, S.L., P.M. Hasegawa, and K.A. Bressand. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose through the use concentration of mineral salt. Hort. Sci. 17(1):82-83.
- Husni, A., E.G. Lestari, dan I. Mariska. 1994. Perbanyakan klonal tanaman obat langka inggu melalui kultur jaringan. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II. Puslitbang Bioteknologi LIPI. Bogor, 6-7 September 1994.
- Mattjik, N.A., E. Prasetyo, dan J. Wiroatmodjo. 1994. Penggunaan paclobutrazol pada kultur *in vitro* *Zingiber officinale* Resc. untuk memperoleh kesegaran planlet. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II. Puslitbang Bioteknologi LIPI. Bogor, 6-7 September 1994.
- Metchouachi, J.F.R. Tateo, S. Zoragova, and E. Rhino. 1996. Gibberic acid and paclobutrazol on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots

- of citrus rootstock seedling. Hort. Sci. 71(5):747-754.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nuhung, A. 2002. Pola pengembangan buah tropika nusantara untuk meningkatkan daya saing pasar internasional. Seminar Nasional dan Promosi Buah Tropika Nusantara. Jakarta, 22 Oktober 2002. Dinas Pertanian dan Kehutanan Propinsi DKI Jakarta.
- Pennel, D. 1987. *Micropropagation in horticulture*. Grower Guide No. 29. Grower Books. London.
- Pinchera, R.G. and K.A. Fletchev. 1994. Paclobutrazol and ancymidol protect corn seedling from high and low temperature stresses. *Plant Growth Reg.* 15:47-53.
- Van Niewkerk, J.P., R.H. Zinmexman, and I. Fordhan. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *Hort. Sci.* 21:516-518.
- Wang, C.Y., G.L. Seffens, and M. Fraust. 1986. Effect of paclobutrazol on accumulation carbohydrates in apple wood. *Hort. Sci.* 6:1414-1421.