

# ESCURO E ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ATIVIDADE DA PEROXIDASE DE PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA, Cv. MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia*)

ZANOL, Geni C.; FORTES, Gerson R. de L.; SILVA, João B. da; CAMPOS, Ângela D.; CENTELLAS Alberto Q.; MULLER, Nilvane T. & GOTTINARI, Rosete A.

UFPEL/FAEM, Depto. de Fitotecnia -Campus Universitário - Cx. Postal 354, CEP 96010-900  
Tel (0532) - 75 7124, Pelotas, RS, Brasil.  
(Recebido para publicação em 07/11/96)

## RESUMO

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da EMBRAPA-CPACT, utilizando brotações oriundas do processo de multiplicação *in vitro*, com três pares foliares (2,5 a 3 cm de comprimento) e teve como objetivo avaliar o efeito do escuro e ácido indolbutírico (AIB) sobre a atividade da peroxidase e enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*). O meio foi saís e vitaminas de MS/2 acrescido de 30 g/l de sacarose, 100 mg/l de mio-inositol e 6 g/l de ágar, sendo o pH ajustado para 5,9. Estudou-se períodos de exposição dos explantes ao escuro de 0; 3; 6 e 9 dias associados às concentrações AIB (0,0; 0,2; 0,4 e 0,6mg/l) sobre o enraizamento e a atividade da peroxidase durante a rizogênese *in vitro*. Os melhores índices de enraizamento obtidos ocorreram com a exposição ao escuro de (0 e 3 dias) e 0,0 e 0,2mg/l de AIB. Os altos níveis de AIB e maiores períodos de exposição ao escuro promoveram intensa formação de calo na base dos explantes. A melhor percentagem de sobrevivência dos explantes ocorreu com três dias de exposição ao escuro, enquanto com nove dias observou-se redução neste parâmetro. A ausência de escuro na fase inicial do enraizamento antecipou o pico da atividade da peroxidase seguido por queda repentina. No escuro o aumento da atividade da peroxidase não foi tão pronunciada, mostrando declínio mais lento.

Palavras-chave: *Malus*, enraizamento *in vitro*, peroxidase, macieira.

## ABSTRACT

INFLUENCE OF THE DARKNESS AND THE INDOLBUTYRIC ACID ON *IN VITRO* ROOTING AND PEROXIDASE ACTIVITY OF THE ROOTSTOCK APPLE MARUBAKAIDO. This work was carried out in EMBRAPA-CPACT Tissue Culture Laboratory by using shoots from the *in vitro* multiplications process. The aim this studied was evaluated the effect of darck period and concentrations of indolybutiric acid (IBA) on the

peroxidase activity and the *in vitro* rooting of apple rootstock Marubakaido (*Malus prunifolia*). The medie used was having the MS/2 salts and vitamins, 30g/l sucrose, 100mg/l myo-inositol and pH ajusted for 5.9. Initiated explants having 2.5 - 3.0cm bearing 3 pairs of leaves remained 0; 3; 6 and 9 days in the dark associated with IBA at the concentratios as follows: 0; 0.2; 0.4 and 0.6mg/l. The peroxidase activity was studied as darkenig period and IBA are concerned. Rooting was better when shoots were exposed to 0 and 3 days darkening and 0 and 0.2 mg/l IBA. High IBA levels and longer darkning periods promoted high callus formation at the shoot base. The best survival in greenhouse occurred for those explants which remained tree days in the dark whereas nine days reduced it. The lack of the dark in the initial phase od rooting anticipated the peroxidase activity peak following a sharp drop. In the dark the increase in the peroxidase activity was less pronounced followed by a short, but constanthy drop.

Key words : *Malus*, *in vitro* rooting, peroxidase, apple.

## INTRODUÇÃO

Para o enraizamento *in vitro* da macieira a auxina mais utilizada é o AIB (ZIMMERMAN & FORDHAM, 1985). Para a maioria das espécies a concentração de AIB mais utilizada é  $10^{-4}$ M e, para o AIA uma concentração dez vezes superior (JAMES, 1983). O contato do explante com AIB, por tempo prolongado, ocasiona uma sensível redução no número de raízes, bem como prejudica o alongamento das raízes (JAMES & THURBON, 1979). RUGINI *et al.* (1988) utilizando estiolamento na parte basal de explantes de pessegueiro e amendoeira obtiveram melhores resultados na percentagem de enraizamento, no número de raízes por explante e no estabelecimento das plântulas em casa de vegetação.

Significativo aumento na atividade da peroxidase é observado durante a fase inicial do processo de enraizamento seguido de repentino decréscimo na fase

posterior (HAISSIG, 1986). Admite-se que esta variação tem efeito sobre a rizogênese via metabolismo do AIA. As enzimas AIA-oxidase e peroxidase tem sido intimamente ligadas com o crescimento vegetal e são, com pequenas modificações, a mesma proteína enzimática (SIEGEL, 1993). Para HAISSIG (1986), as peroxidases podem afetar a formação de raízes através de sua influência sobre as auxinas, ligninas e metabolismo das antocianinas. As maiores atividades das peroxidases são observadas nas paredes celulares e a parede primária representa a matriz na qual ocorre a lignificação, catalisada pela enzima. Esta enzima também está envolvida no metabolismo de compostos fenólicos atuando no processo de regulação da formação de raízes (SIEGEL, 1993). As peroxidases funcionam como catalisadores na degradação do AIA e, este, age como repressor e indutor de peroxidases específicas. HAUSMAN (1993), observou um pico de atividade da peroxidase precedendo o enraizamento somente em brotações tratadas com ANA, correspondendo ao período em que houve o mais baixo nível de auxina endógena. O autor sugere que o aumento da atividade da peroxidase e decréscimos do nível de AIA podem estar associados com as primeiras divisões celulares da organização e crescimento dos primórdios radiculares. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o efeito do AIB e do escuro visando melhorar a qualidade do enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido. Analisou-se, também, o efeito destes, na variação da atividade da peroxidase no enraizamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado- EMBRAPA/CPACT, Pelotas, RS. O meio utilizado foi o de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com os sais reduzidos à metade de sua concentração, 100mg/l de mio-inositol, 30g/l de sacarose e 6,0g/l de ágar e pH ajustado para 5,9. Distribui-se 40ml de meio em frascos com capacidade de 250ml, os quais foram tampados com folha de papel alumínio. Testaram-se 4 concentrações (0,0; 0,2; 0,4 e 0,6mg/l) de AIB e quatro períodos (0; 3; 6 e 9 dias) de permanência dos explantes no escuro após a inoculação. O experimento foi em blocos casualizados, com 6 repetições. Primeiramente, colocou-se o experimento com 9 dias de permanência no escuro; três dias após foi o tratamento com 6 dias e, seguidos mais três dias aquele com 3 dias de escuro. O tratamento com zero dias de escuro foi realizado quando os demais tratamentos completaram os respectivos períodos de escuro, de modo que todos os tratamentos foram colocados ao mesmo tempo na luz. Paralelamente a este experimento foi avaliada a atividade da peroxidase, utilizando-se os mesmos tratamentos. Iniciou-se a análise da atividade da peroxidase quando se transferiu

todos os tratamentos para a luz. As demais avaliações foram realizadas em intervalos de três dias até que o tratamento de zero dias de escuro completou 15 dias de inoculação. Utilizou-se três repetições por tratamento, para cada análise da peroxidase. A atividade da peroxidase (UE/ g tecido/min) foi avaliada segundo a metodologia de FERMHANN & DIAMOND, (1967). O extrato enzimático bruto foi obtido macerando-se, em gelo, 1g de peso fresco em 25ml de água destilada, seguido de filtração a vácuo e centrifugação a 5000rpm durante trinta minutos, a 2°C. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos. As leituras foram realizadas com comprimento de onda de 450nm utilizando espectrofotômetro marca VARIAN série 634.

As variáveis analisadas foram: percentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes, intensidade de formação de calo (foram atribuídas notas de 1 a 4 ,adotando-se o número 1 como ausência de calo e o número 4 a intensidade máxima de calo) e percentagem de sobrevivência dos explantes após a permanência em 45 dias em casa de vegetação. Os dados expressos em percentagem, foram transformados segundo arco seno raiz quadrada de  $(X/100)$ ; os dados da variável número de raízes, foram transformados segundo raiz quadrada de  $(X+1)$ ; os dados avaliados através de notas (intensidade de formação de calo), foram transformados segundo logaritmo de  $(X+1)$  e, as variáveis de comprimento de raízes e atividade da peroxidase não foram transformadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os períodos de escuro e o AIB influenciaram significativamente o tempo de emergência das raízes e a percentagem final de enraizamento porém, não houve interação entre ambos. A emergência das raízes foi influenciada pelos dois fatores.

Os explantes colocados diretamente na luz apresentaram tempo maior para a emergência das raízes pois, dez dias após inoculação, observou-se apenas 5% de enraizamento. Por outro lado, o tratamento de três dias de escuro promoveu a mais alta percentagem de enraizamento neste período (dez dias), que foi superior a 20%. Os demais tratamentos mostraram, aos dez dias, 16 e 18 % de raízes visíveis para 6 e 9 dias de escuro, respectivamente (Figura 1). Aos quinze dias, os explantes submetidos a 3 e 6 dias de escuro atingiram acima de 60% de enraizamento. Para percentagem final de enraizamento os melhores resultados obtidos foram entre a ausência e três dias de escuro, diminuindo com o aumento dos períodos de escuro.

Segundo MURASHIGE (1974) a fotossíntese não é considerada atividade essencial para o desenvolvimento

das plantas *in vitro*, porém, a luz é fundamental para a regulação dos processos morfológicos.

O período de três dias de escuro mostrou efeito positivo no enraizamento e desenvolvimento das plântulas, estes resultados concordam com RUGINI *et al.* (1988). Estes pesquisadores observaram que a ausência de luz nos primeiros dias favoreceu o enraizamento por diminuir a ação da AIA-oxidase.

Para ZIMMERMAN (1984) períodos de 4 a 7 dias de escuro são os mais favoráveis ao enraizamento de

várias cultivares testadas, as quais responderam diferentemente quanto aos períodos de escuro.

Trabalho recente conduzido por YEO & REED (1995) demonstraram que o enraizamento de explantes oriundos de três tipos de porta-enxerto de *Pyrus*, de difícil enraizamento, foi favorecido quando os explantes foram submetidos a uma semana de exposição ao escuro.

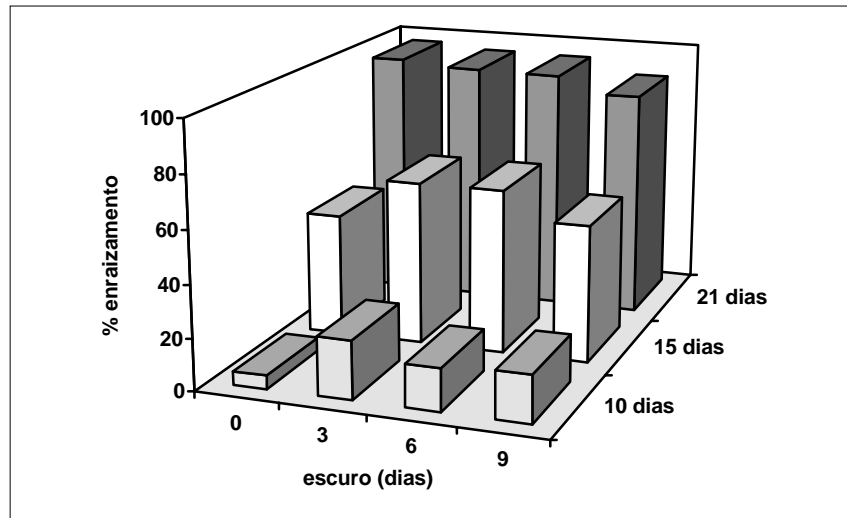


Figura 1- Percentagem de enraizamento das brotações do porta-enxerto Marubakaido para os períodos de escuro, EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996

O período de emergência das raízes foi pouco influenciado pela presença de AIB. No entanto, a percentagem final de enraizamento diminuiu com aumentos na concentração da auxina (Figura 2).

Estes dados estão de acordo com os obtidos por ZIMMERMAN & BROOME (1981) nos quais, baixas concentrações de AIB, em torno de 0,1mg/l, proporcionaram melhor percentagem de enraizamento para todas as cultivares testadas. Observou-se no entanto, um aumento sensível neste parâmetro na presença de 1,0mg/l de AIB. Neste trabalho, as altas concentrações estimularam a formação de calo levando à raízes mal formadas e inibindo o crescimento das

brotações. Por outro lado, concentrações maiores que 1,0mg/l de AIB foram necessárias para enraizamento satisfatório do porta-enxerto M7 que obtiveram enraizamento máximo de 88% com 2,0mg/l (WERNER & BOE, 1980).

SCHUCH (1989), ao trabalhar com o mesmo porta-enxerto, utilizando 0,3 a 0,7mg/l de AIB, não encontrou diferenças significativas no enraizamento, embora 0,3mg/l tenha promovido enraizamento levemente superior e, HUTCHINSON (1984) obteve melhores resultados no enraizamento da cultivar Northern Spy ao utilizar 0,2mg/l.

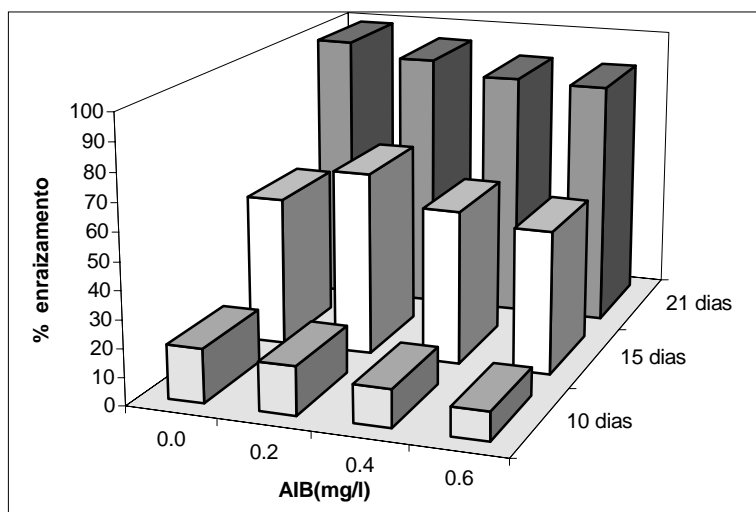


Figura 2 - Percentagem de enraizamento de brotações do porta-enxerto Marubakaido para os níveis de AIB, EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996

O número de raízes primárias foi influenciado somente pelo AIB, aumentando com a elevação da concentração deste. Aumentos nas concentrações de AIB e períodos de escuro reduziram o comprimento das mesmas. As maiores concentrações de AIB e períodos de escuro levaram a uma maior formação de calo na base das brotações, impedindo o desenvolvimento das mesmas.

A exposição dos explantes ao escuro por nove dias na presença de AIB levou ao mais baixo índice de sobrevivência das plântulas na casa de vegetação. Este baixo índice pode ser devido à exposição ao escuro por períodos superiores a três dias (Figura 3).

Os melhores resultados foram obtidos com três dias de exposição ao escuro para todas as concentrações de AIB, sendo que o mais alto índice de sobrevivência foi obtido com 0,2mg/l de AIB neste mesmo período de escuro. Na ausência de escuro e período de seis dias de escuro apresentaram resultados semelhantes porém, inferiores ao período de três dias.

Observou-se que o período de nove dias de escuro levou ao amarelecimento das folhas apicais, provável causa do baixo índice de sobrevivência dos explantes. ANDERSON (1982) e ZIMMERMAN & FORDHAM (1985) observaram estes mesmos sintomas em períodos de escuro superiores a nove e seis dias, respectivamente.

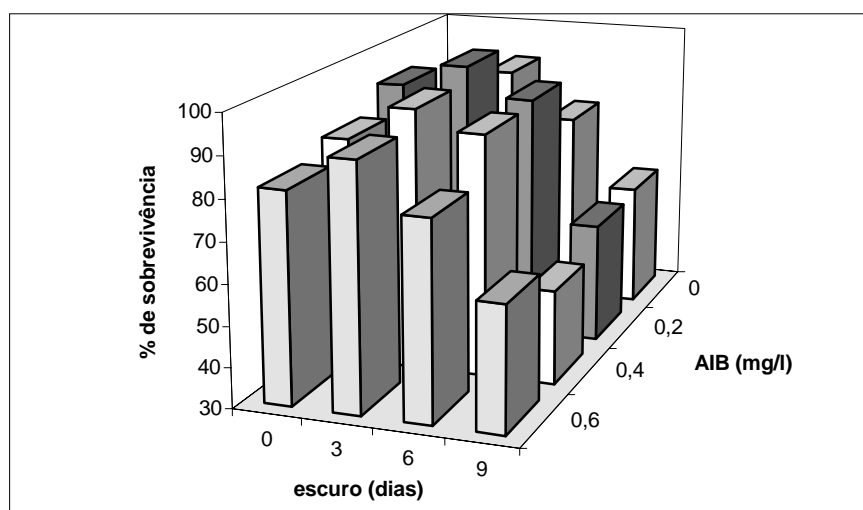


Figura 3 - Percentagem de sobrevivência de plântulas do porta-enxerto Marubakaido para os níveis de AIB e os períodos de escuro após 45 dias em casa de vegetação, EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996

Efeito do AIB exógeno sobre a atividade da peroxidase na ausência de escuro

A variação na atividade da peroxidase pode servir para se determinar as fases de indução e iniciação do enraizamento. A fase indutiva é caracterizada por um aumento na atividade da peroxidase em que não há modificações histológicas e citológicas aparentes (GASPAR *et al.*, 1985).

Dados apresentados por HAUSMAN (1993) mostram aumentos significativos na atividade da peroxidase na presença de auxina exógena.

Na presença de AIB, verificou-se um aumento da atividade da peroxidase durante o enraizamento não

apresentando diferenças significativas entre as concentrações de AIB utilizadas independente dos períodos de exposição ao escuro.

Quando os explantes foram colocados diretamente na luz, na presença de AIB, ocorreu um marcante aumento na atividade da peroxidase atingindo valores máximos aos seis dias seguido por uma rápida e contínua diminuição da atividade até os 15 dias. A atividade da peroxidase na presença de AIB foi aproximadamente três vezes superior quando comparada com a sua ausência; na ausência do fitorregulador houve um pequeno aumento entre o sexto e o nono dia (7,8) embora, significativo (FIGURA 4).

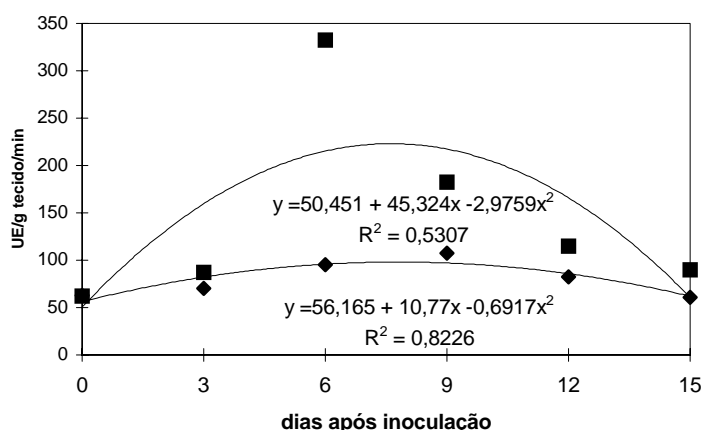


Figura 4 - Atividade da peroxidase de brotações do porta-enxerto Marubakaido colocados diretamente na luz durante o período de enraizamento para ♦ ausência e ■ 0,6 mg/l de AIB, EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996

O início da emergência das raízes ocorreu próximo aos dez dias de inoculação, praticamente quando iniciou o decréscimo da atividade da peroxidase (FIGURA 2 e 4).

Este período de maior atividade da peroxidase pode estar relacionada com a formação dos primórdios radiculares. HAUSMAN (1993) observou que, juntamente com o aumento da atividade da peroxidase ocorre um decréscimo nos níveis de AIA que pode estar associado com as primeiras divisões celulares antes da organização e crescimento dos primórdios radiculares.

DRUART *et al.* (1982) e MONCOUSIN & GASPAR (1983) observaram que a diminuição da atividade da peroxidase, após a fase de indução radicular, é resultado de uma diminuição das peroxidases catiônicas e, de acordo com BERTHON *et al.* (1987) e DALET &

CORNU (1988) o número das peroxidases aniônicas aumenta continuamente durante o enraizamento.

KLERK *et al.* (1990) sugeriram que alta atividade de peroxidases básicas está relacionada com a capacidade de divisão celular e que aumentos na divisão celular resulta em maior quantidade de raízes ou em mais calo.

DENCHEVA & KLISURSKA (1982) concluíram que somente as isoenzimas catiônicas da peroxidase, isoladas das raízes primárias de milho, possuíam atividade de AIA-oxidase. Também verificaram que ao longo do desenvolvimento das células, as peroxidases desenvolvem atividade de AIA-oxidase e, em conseqüência, um maior número de isoenzimas catiônicas agem como AIA-oxidase nos estágios posteriores do desenvolvimento das células.

## Efeito do escuro sobre a atividade da peroxidase

Houve variação da atividade da peroxidase durante o enraizamento em função dos períodos de exposição ao escuro. Verificou-se que a atividade da peroxidase é máxima seis após a exposição das brotações à luz, independente dos períodos de escuro.

Os tratamentos com três e seis dias de escuro foram bastante semelhantes na variação da atividade da peroxidase. Para o período de três dias de escuro a

mais alta atividade foi observada entre oito e nove dias após a inoculação e seis dias após a retirada dos explantes do escuro. A ausência de AIB mostrou um pequeno aumento na atividade da peroxidase, porém na presença deste, seus valores foram mais elevados (Figura 5). No período de seis dias de exposição ao escuro não observou-se variação significativa da atividade da peroxidase na ausência de AIB. Na presença deste, a mais alta atividade foi obtida aos nove e doze dias (10,6) após a inoculação.

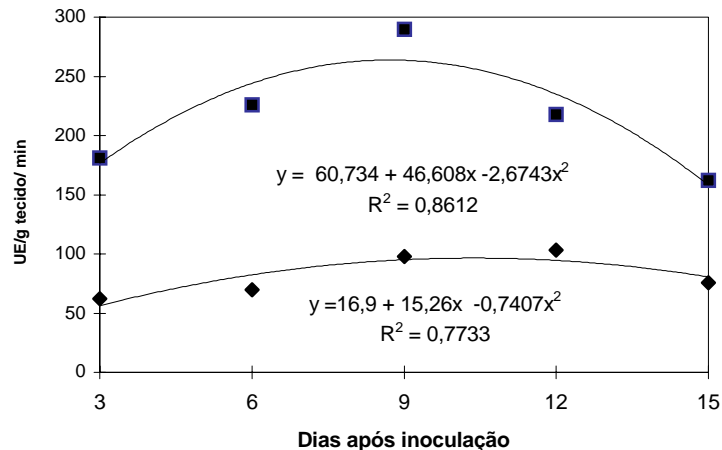


Figura 5 - Atividade da peroxidase das brotações do porta-enxerto Marubakaido para a ♦ausência e ■ 0,6 mg/l de AIB após os três dias da exposição ao escuro, EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996

Explantes expostos a um período de escuro de nove dias e na presença de AIB a mais alta atividade da peroxidase foi observada entre nove e doze dias após a inoculação. Entretanto, aos nove dias de inoculação a atividade apresentava-se com altos valores (Figura 6). O decréscimo desta, ocorreu após 15 dias da inoculação quando aproximadamente a metade das brotações apresentavam raízes (Figura 1).

SIEGEL (1993) cita que, na cultura de tecidos, após a diferenciação das células, depois da indução pela auxina, as enzimas peroxidases agem sobre estas levando a formação de calo. A maior formação de calo na base das brotações nos maiores períodos de escuro e concentrações de AIB pode ser devido a maior atividade da peroxidase visto que, esta manteve-se alta por um período maior. Esta afirmação também pode explicar a alta atividade da peroxidase após a iniciação radicular.

Entretanto, para DRUART *et al.* (1982), períodos de 9 dias de exposição ao escuro, das brotações da cultivar Jonagold, durante a fase de indução, aumentou

a atividade da peroxidase levando a formação de um maior número de raízes por explante. No entanto, a transferência destes para a luz, determinou uma queda repentina da atividade da enzima.

Segundo LEGRAND *et al.* (1976) a luz controla a atividade da peroxidase porém, os verdadeiros mecanismos deste controle não estão bem definidos. Os pesquisadores sugeriram que as diferenças da atividade da enzima da luz em relação ao escuro podem ser atribuídas ao conteúdo dos fenólicos presentes nos tecidos que inibiriam ou estimulariam a atividade, uma vez que os seus níveis foram inversos a atividade da peroxidase na luz ou escuro.

Através dos resultados apresentados, verificou-se que o escuro apenas prolongou o período de maior atividade da peroxidase. No entanto, seus valores não apresentaram diferenças significativas para todos os períodos de escuro e na ausência deste. Tampouco, não há evidências concretas para se explicar o papel que a luz exerce sobre a atividade da peroxidase.

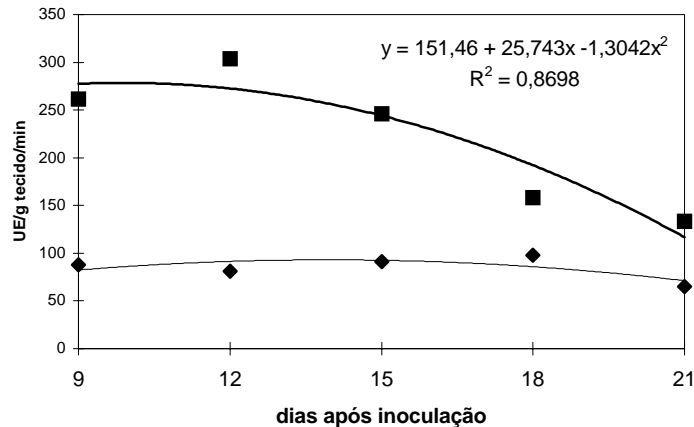


Figura 6 - Atividade da peroxidase para as brotações do porta-enxerto Marubakaido para a ◆ ausência e ■ 0,6mg/l de AIB após nove dias de exposição ao escuro, EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996

## CONCLUSÕES

A exposição das brotações de Marubakaido a períodos de escuro superiores a três dias afeta negativamente o enraizamento e a sobrevivência de plântulas.

Os melhores resultados de enraizamento das brotações de Marubakaido são obtidos com 0,2mg/l de AIB e período de três dias de exposição ao escuro.

A luz influencia a atividade da peroxidase mostrando pico de atividade. A exposição das brotações ao escuro prolonga o período de atividade da enzima.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W.C. Etiolation as an aid to rooting. **Proc. Int. Plant. Prop. Soc.** v.31, p.138-141, 1982.
- BERTHON, J.Y., THOMAS, D.E., NICHOLS, T. Endogenous level of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum* (Lindl) *in vitro*. **Z. Pflanzen. Physiol.**, v.184, p.405-412, 1987.
- DALET, F., CORNU, D. Lignification level and peroxidase activity during *in vitro* rooting of *Prunus avium*. **Can. J. Bot.** v.64, p.2182-2186, 1988.
- DENCHEVA, A., KLISURSKA, D. Interaction between peroxidase and IAA-oxidase in the course of growth and differentiation of the plant cells. **Physiol. Vég.**, v.20, n.3, p.385-394, 1982.
- DRUART, P.H., KEVERS, C.L., GASPAR, T.H. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. **Z. Pflanzen. Physiol.**, v.108, p.429-436, 1982.
- FERHMANN, H., DIAMOND, A.E. Peroxidase activity and phytophthora resistance in different organs of the potato plant. **Phytopatology**, v.57, p.79-72. 1967.
- GASPAR, T., PENEL, C., CASTILLO, C., GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiol. Plant.** v. 64, p. 418-423, 1985.
- HAISSIG, B.E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: JACKSON, M.B. (ed). **New root formation in plants and cuttings**. The Netherlands: Dordrecht. 1986, p.141-189.
- HAUSMAN, J.F. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. **Plant Growth Regulation** v.13, p.263- 268, 1993.
- HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. **Scientia Horticulturae**, v. 22, p.347-358, 1984.
- JAMES, D.J. Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstock (*Malus pumila*). Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M9. **Physiol. Plantarum**, v.57, p.149-153, 1983.
- JAMES, D. J., THURBON, I. J., Rapid *in vitro* rooting of the apple roots tock M. 9. **J. Hort. Sci.** v. 54, p.309-311, 1979.
- KLERK, G.J., SMULDERS, R., BENSCHOP, M. Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. **Acta Hort.** v.280, p.29-36, 1990.
- LEGRAND, B., GASPAR, T., PENEL, C., GREPPIN, H. Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxidase in *Chicorium intybus* L. **The Biochemical Journal**, v.3, n.2, p.119-127, 1976.

- MONCOUSIN, Ch., GASPAR, T. Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* cultured *in vitro*. **Physiol. Pflanz.** v.178, p.263-271, 1983.
- MONCOUSIN, Ch. Adventitious rhizogenesis control: new developments. **Acta Hort.** v.230, p.97-104, 1988.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiol.** v. 15, p.473-497, 1962.
- RUGINI, E., BAZZOFFIA, A., JACOBINI, A. A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees. **Acta Hort.** v.227, p.438-440, 1988.
- SCHUCH, M.W. **Micropropagação de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh)**, Pelotas:UFPel. 1989, 98p. Diss. (Mestrado) - Fruticultura de Clima Temperado.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases - an organismic perspective - review. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.303-312, 1993.
- WERNER, E.M., BOE, A.A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. **HortiScience**, v.15, n.4, p.509-510, 1980.
- YEO, D.Y., REED, B.M. micropropagation of three *Pyrus* rootstock. **HortiScience**, v.30, n.3, p.620-23, 1995.
- ZIMMERMAN, R.H.; BROOME, O.C. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of the apple cultivar cuttings. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, v.106, n.5, p.648-652, 1981.
- ZIMMERMAN, R.H., FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** v.110, p.34-38, 1985.
- ZIMMERMAN, R.H. Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.3, p.301-311, 1984 .