

# INFLUÊNCIAS DO ÁCIDO NAFTALENO ACÉTICO E ESCURO E ATIVIDADE DA PEROXIDASE NO ENRAIZAMENTO *in vitro* DE ASPARGO (*Asparagus officinalis* L.)

AMARANTE, Luciano<sup>1</sup>; COLARES, Denise dos S.<sup>1</sup>; MARIOT, Márcio P.<sup>2</sup>; FORTES, Gérson R. de L.<sup>3</sup>; ZANELLA, Fábio<sup>1</sup>; ALVES, Alexandre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UFPEL/IQG/Depto. de Bioquímica – Campus Universitário – Cx. Postal 354, CEP 96010-900 Tel (053) – 275 7355, Pelotas, RS, Brasil

<sup>2</sup>UFPEL/CAVG – Av. Eng. Ildelfonso Simões Lopes, 2791 – CEP 96060-260 – Pelotas, RS

<sup>3</sup>Embrapa/CPACT – Rodv. BR 392, km 78 – Pelotas, RS  
(Recebido para publicação em 10/07/2000)

## RESUMO

Avaliou-se os efeitos do Ácido Naftaleno Acético (ANA) e escuro sobre o enraizamento *in vitro* de dois genótipos de aspargo, clone M-14 e híbrido G27 x M-14 (Deco), bem como a atividade da peroxidase. As plantas foram desenvolvidas em meio MS acrescido de 0,93µM de cinetina e 1,95µM de ancimidol com concentrações de 2,5 e 5,0µM de ANA e submetidas ao escuro (0, 3, 6 e 9 dias). Os caracteres avaliados foram: porcentagem de enraizamento, número de raízes primárias e secundárias e comprimento de raízes primárias. Com o meio e duração de escuro de melhor desempenho foi estudada a atividade da peroxidase no enraizamento. A concentração de ANA não influenciou o enraizamento de Deco, enquanto para M-14 a concentração de 5,0µM de ANA proporcionou um aumento no número de raízes primárias. A exposição dos explantes ao escuro promoveu maior porcentagem de enraizamento para Deco (3 e 6 dias), enquanto M-14 obteve maior número de raízes secundárias aos 6 dias de escuro, quando combinada à concentração de 5,0µM de ANA. O tratamento com 5,0µM de ANA foi superior a 2,5µM com relação ao enraizamento e não houve influência dos períodos de escuro sobre esse caracter. Foi observada uma relação entre o pico de atividade da peroxidase e a emissão de raízes, indicando que a peroxidase pode ser usada como marcador bioquímico do enraizamento.

Palavras-chave: **Asparagus**, enraizamento *in vitro*, peroxidase.

## ABSTRACT

INFLUENCES OF THE NAPHTHALENEACETIC ACID AND THE DARKNESS ON *in vitro* ROOTING OF ASPARAGUS (*Asparagus officinalis* L.) AND PEROXIDASE ACTIVITY. The effect of the naphthaleneacetic acid (NAA) and the darkness on the *in vitro* rooting of clone M-14 and G27 x M-14 hybrid (cv Deco) of asparagus, as well as the peroxidase activity during rooting, were evaluated. Explants placed on a medium MS complemented with 0.93µM kinetin and 1.95µM ancymidol remained 0; 3; 6 and 9 days in the dark associated with ANA at the concentration of 2.5 and 5.0µM. The characters evaluated were: rooting percentage, number of primary and secondary roots and primary roots length. The peroxidase activity during the *in vitro* rooting was studied using the best medium and darkness results. Deco rooting ability was not influenced by the ANA concentration, while M-14 number of primary roots was higher at 5.0µM. Three and six days in the dark increased the rooting percentage of Deco. The number of secondary roots of M-14 was higher when exposed to 6 days of dark at the ANA concentration of 5.0µM. There was a relationship between the peak of peroxidase activity and rooting.

Key words: **Asparagus**, *in vitro* rooting, peroxidase

## INTRODUÇÃO

A rizogênese é uma etapa crítica da técnica de micropropagação, dependendo dela o sucesso da fase de aclimação e sobrevivência das plantas a campo. O enraizamento de explantes está ligado às condições genéticas e fisiológicas dos mesmos, assim como às condições físicas e composição do meio de cultivo durante o tratamento para o enraizamento (DUFOR, 1988).

As observações preliminares de que a aplicação exógena de auxinas naturais ou sintéticas favorece o enraizamento foram confirmadas repetidamente, e as auxinas têm sido usadas na horticultura convencional por um longo tempo (GASPAR *et al.*, 1992). A propagação vegetativa de várias plantas através da cultura de tecidos, isto é, a micropropagação, também explora as propriedades de enraizamento das auxinas (GASPAR e COUMANS, 1987). As propriedades relativamente específicas de promoção de enraizamento das auxinas exógenas levaram à crença de que estas substâncias têm um papel crucial no processo de formação de raízes a partir de explantes (DAVIS *et al.*, 1988).

Foram obtidos por ELMER *et al.* (1989) enraizamento de 50% de material regenerado de cultura de protoplastos de aspargo em meio contendo ANA. PATHAK e SAROJ (1995) observaram que espécies de *Psidium* com dificuldade de enraizamento tiveram melhores resultados pela aplicação exógena de IBA e ANA. Segundo LIU *et al.* (1996), explantes de soja tratados com ANA produziram maior número de raízes adventícias. Em girassol, ANA foi mais eficiente que AIA na iniciação radicular dos explantes (KALRA e BHATLA, 1996). GUNAWAN *et al.* (1994), adicionando ANA ao meio de cultura na concentração de 0,5 mg/l, obtiveram 92,3% de enraizamento dos explantes de aspargo, contra 10% usando AIA e 5 a 20% usando IBA.

O aumento na atividade específica da peroxidase antes da iniciação e crescimento dos primórdios radiculares em plantas micropropagadas pode servir como um marcador da performance de enraizamento (MATO *et al.*, 1988; GASPAR *et al.*, 1992). ANSARI *et al.* (1995) sugerem que a atividade da peroxidase pode ser usada para investigar os vários estágios da rizogênese e esquematizar o tratamento com auxina para a promoção da iniciação radicular em *Populus deltoides*. No decurso da rizogênese de diferentes espécies observou-se uma variação na atividade da peroxidase total envolvendo um aumento e posteriormente um decréscimo na sua atividade

acompanhando a formação de raízes (BERTHON *et al.*, 1987; RIPETTI *et al.*, 1994; HAUSMAN *et al.*, 1995; ROUT *et al.*, 1996). Já para DALET e CORNU (1989) não há uma forte relação entre a atividade da peroxidase e o enraizamento *in vitro* de *Prunus avium* L..

Vários autores têm testado o uso de períodos de escuro como forma de favorecer o enraizamento de explantes. ROY *et al.* (1988) utilizaram simultaneamente auxina e períodos de escuro para melhorar o enraizamento de *Mitragyna parvifolia*. Para DAMIANO *et al.* (1991) o enraizamento de pessegueiro foi menor no escuro mas com raízes de melhor qualidade, enquanto que a amendoeira cv. Fascionello teve alta resposta à estiolação dos explantes no escuro, com 50% de enraizamento, contra porcentagem nula dos mantidos na luz. Entretanto, CABONI *et al.* (1994) observaram que tratamento com escuro em amendoeira sel. M 51 não melhorou a habilidade de enraizamento. O uso de escuro favoreceu o enraizamento de *Asparagus cooperi* (GHOSH e SEM, 1994). O enraizamento de *Cleistanthus collinus* não ocorreu na ausência de reguladores de crescimento, tendo sido aumentado significativamente com o uso de 72h de escuro (QURAIISHI *et al.*, 1996). O autor sugere que talvez o período inicial de escuro previna a degradação do AIA, que é instável na luz. SANCHEZ *et al.* (1996) observaram que um período inicial de cinco dias de escuro aumentou a resposta de enraizamento de *Quercus robur* e *Q. rubra*, embora tenha sido prejudicial à qualidade da planta.

A cultivar Deco (G27 × M14) apresenta acréscimos de até 60% na produtividade de aspargo. Entretanto, para a regeneração de plantas em larga escala utilizando a cultura de tecidos, o enraizamento é considerado uma fase crítica na propagação dos clones G27 e M14 e, conseqüentemente, da cultivar Deco.

Neste sentido, objetivou-se estudar o enraizamento do clone M14 e da cultivar Deco de aspargo em função da variação de concentração de auxina e a exposição dos explantes ao escuro, bem como a combinação entre o melhor meio e duração de escuro para estudo da atividade da peroxidase no enraizamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos avaliados foram o clone M-14 e o híbrido G27 × M14 (cultivar Deco) de aspargo, sendo o material originário de cultura de tecidos.

### Experimento 1

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (Embrapa-CPACT) em Pelotas, RS.

Os tratamentos envolveram duas concentrações de ANA (2,5 e 5,0 $\mu$ M) e a exposição ao escuro por zero, três, seis e nove dias, seguindo-se transferência dos explantes para o meio de enraizamento.

Esse material permaneceu 60 dias no meio de crescimento MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 2,46 $\mu$ M de 2-isopenteniladenina (2ip), sendo posteriormente transferido para tubos de ensaio de 40mL contendo 10mL do meio de enraizamento, o qual foi constituído de meio MS acrescido de 0,93 $\mu$ M de cinetina, 1,95 $\mu$ M de ancimidol e as concentrações 2,5 e 5,0 $\mu$ M de ANA. Os explantes foram padronizados, cada um apresentando quatro hastas com aproximadamente 2,0cm de comprimento, partindo de um único calo (um explante por tubo). Durante o período de

enraizamento o material foi submetido a fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25  $\pm$  2 $^{\circ}$ C e luminescência de 2000 lux.

Aos 50 dias após transferência dos explantes para o meio de enraizamento foram analisadas as variáveis porcentagem de enraizamento, número de raízes primárias e secundárias e comprimento de raízes primárias.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em esquema fatorial 2x4x2 com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída de oito tubos de ensaio. As médias das variáveis analisadas foram obtidas considerando-se somente os explantes enraizados. Os dados referentes ao fator duração de escuro foram submetidos à análise de regressão polinomial, enquanto os demais foram analisados pelo teste de Duncan com nível de significância de 5% de probabilidade (P<0,05). As variáveis número de raízes primárias e número de raízes secundárias foram transformadas segundo raiz quadrada de (x + 0,5) e a porcentagem de enraizamento segundo arco seno de raiz quadrada de (x/100)

### Experimento 2

Esse experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (Embrapa-CPACT) e no Departamento de Bioquímica/IQG/UFPel.

Explantes com as mesmas características e submetidos ao mesmo meio de crescimento foram transferidos para meio de enraizamento contendo 5,0 $\mu$ M de ANA e submetidos à luz contínua, conforme resultado do ensaio anterior, sendo mantidos em fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25  $\pm$  2 $^{\circ}$ C e luminescência de 2000 lux.

O material permaneceu durante 30 dias no meio de enraizamento, tendo sido realizadas coletas a cada dois ou três dias.

A atividade da enzima peroxidase (PO) foi determinada segundo metodologia proposta por KAR e MISHRA (1976), com modificações.

O extrato enzimático bruto foi obtido pela homogeneização, em presença de nitrogênio líquido, de 200mg de tecido fresco de brotações de aspargo em 30mL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, gelado, por dois minutos. Filtrou-se o homogeneizado a vácuo em banho de gelo através de papel filtro n $^{\circ}$  1 e, então, centrifugou-se a 17.000  $\times$  g por 15 minutos, a 2 $^{\circ}$ C. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios enzimáticos.

Para a avaliação da atividade da peroxidase tomou-se 1mL do extrato enzimático bruto diluído, adicionado a 5mL da mistura de reação constituída de 125 $\mu$ moles de tampão fosfato de potássio pH 6,8; 50 $\mu$ moles de pirogalol e 50 $\mu$ moles de H $_2$ O $_2$ . Após a incubação por cinco minutos a 25 $^{\circ}$ C a reação foi interrompida pela adição de H $_2$ SO $_4$  a 5% (v/v) (KAR e MISHRA, 1976). Determinou-se a absorbância a 420nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1

Para porcentagem de enraizamento foram significativas as interações cultivar  $\times$  concentração de ANA e cultivar  $\times$  exposição ao escuro. Em relação à primeira interação não houve diferença significativa entre as doses de ANA, e Deco foi significativamente superior a M-14 na dosagem 2,5 $\mu$ M de ANA (Tabela 1). Esse resultado não corrobora com o apresentado por MÜLLER (1997), no qual o clone M-14 apresentou maior porcentagem de enraizamento do que Deco.

TABELA 1 - Porcentagem de enraizamento dos genótipos de aspargo Deco e M-14 frente a diferentes doses de ANA

Dose de ANA (µM)	Cultivar	
	M-14	Deco
2,5	24,5 a B	50,3 a A
5,0	36,8 a A	39,9 a A

As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ )

Com relação a exposição ao escuro, Deco obteve maior porcentagem de enraizamento aos três e seis dias de escuro,

enquanto M-14 não foi influenciado por esse fator (Figura 1). Para RUGINI *et al.* (1988), a ausência de luz nos primeiros dias favoreceu o enraizamento de pessegueiro e amendoeira, enquanto que os melhores resultados para porcentagem final de enraizamento do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*), foram em condições de ausência e três dias de escuro, diminuindo com o aumento da exposição ao escuro (ZANOL, 1997).

Para o parâmetro número de raízes primárias, a interação cultivar x concentração de ANA foi significativa. A cultivar Deco não foi influenciada pela concentração de ANA, enquanto para M-14 a concentração de 5,0µM proporcionou um aumento significativo desse caracter quando comparado à concentração de 2,5µM (Tabela 2).

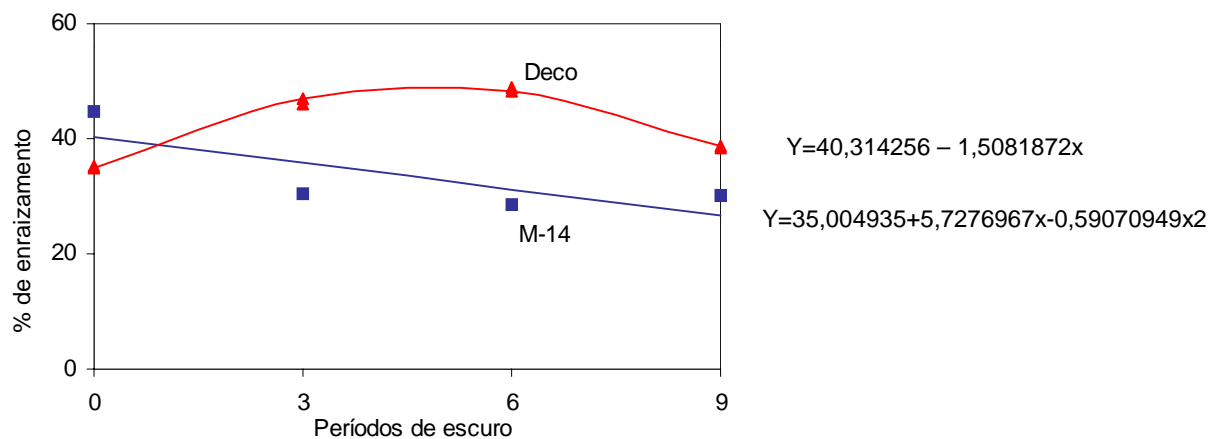


Figura1 - Porcentagem de enraizamento dos genótipos de aspargo M-14 e Deco submetidos a diferentes exposições ao escuro

TABELA 2 - Número de raízes primárias dos genótipos de aspargo M-14 e Deco submetidos às concentrações de 2,5 e 5,0µM de ANA

Dose de ANA (µM)	Cultivar	
	M-14	Deco
2,5	2,3 b B	4,2 a A
5,0	3,9 a A	3,7 a A

As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Resultado semelhante foi apresentado por MÜLLER (1997) ao estudar o comportamento do ANA no enraizamento de aspargo. Foi observado pelo autor que o maior número de raízes foi obtido na concentração de 5,0µM, ocorrendo uma diminuição com o aumento da dose.

Não se constatou influência da exposição ao escuro para os dois genótipos. Entretanto, para *Asparagus cooperi*, GHOSH e SEN (1994) detectaram um melhor enraizamento nessas condições.

Não houve interação significativa para o parâmetro comprimento de raiz, o qual não foi influenciado pelas doses de ANA (Tabela 3). Obteve-se maior comprimento aos zero e nove dias de exposição ao escuro para os dois genótipos (Figura 2).

TABELA 3 - Comprimento de raiz dos genótipos de aspargo M-14 e Deco submetidos às concentrações de 2,5 e 5,0µM de ANA

Dose de ANA (µM)	Comprimento de raiz (cm)
2,5	2,96 a
5,0	2,30 a

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

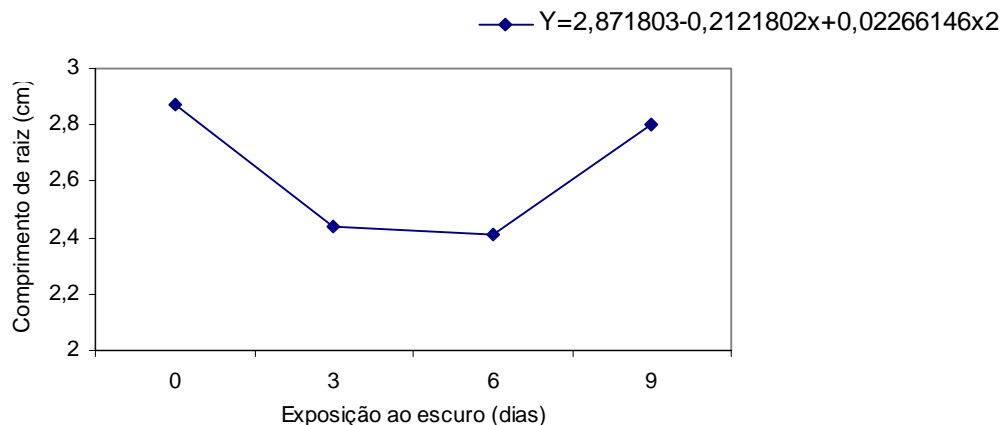


Figura 2 - Comprimento de raiz dos genótipos de aspargo M-14 e Deco submetidos a diferentes exposições ao escuro

Houve interação significativa entre cultivar x concentração de ANA x escuro para número de raízes secundárias. A cultivar Deco não mostrou diferença significativa entre as concentrações de ANA nas

diferentes exposições ao escuro, enquanto o clone M-14 desenvolveu maior número de raízes secundárias aos seis dias de escuro na concentração de 5,0 µM (Tabela 4).

TABELA 4 - Número de raízes secundárias dos genótipos de aspargo M-14 e Deco submetidos a duas concentrações de ANA e exposição ao escuro

Escuro (dias)	Cultivar e concentração de ANA			
	M-14		Deco	
	2,5(µM)	5,0(µM)	2,5(µM)	5,0(µM)
0	10,52 a	17,74 a	24,36 A	15,34 A
3	12,79 a	8,55 a	26,73 A	35,59 A
6	0,96 b	36,85 a	26,21 A	31,02 A
9	3,61 a	16,85 a	26,66 A	7,67 A

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas ou minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Pela análise dos resultados observa-se um baixo percentual de enraizamento para esses dois genótipos. A concentração de 5,0µM de ANA mostrou-se mais efetiva ao apresentar valores significativamente superiores à 2,5µM. Além disso, MÜLLER (1997) obteve enraizamento próximo a 80% utilizando esta concentração. A exposição dos explantes ao escuro não resultou satisfatória, não havendo influência determinante na melhora do enraizamento.

Ao analisarem alguns fatores primários causadores de dificuldades no enraizamento e uma alta porcentagem de raízes anormais em cultura de tecidos de aspargo, FAN e XIE (1995) indicaram que a indução radicular está relacionada à heterogeneidade do material, ao estado de crescimento dos explantes, reguladores de crescimento e suas concentrações e número de gerações de subcultivo.

*Experimento 2*

O genótipo Deco apresentou um ponto máximo de

atividade da enzima peroxidase aos 10 dias (quarta coleta), com posterior queda (Figura 2), tendo o aparecimento de raízes sido observado aos 13 dias (quinta coleta). Este resultado vai ao encontro de observações feitas por vários autores (DALET e CORNU, 1989; BERTHON *et al.*, 1987; MATO *et al.*, 1988; GASPAS *et al.*, 1992), de que a formação de raízes ocorre depois de o explante ter atingido e passado por um pico de máxima atividade enzimática.

O genótipo M-14 apresentou atividade máxima aos 10 dias (quarta coleta), tendo sido observado, entretanto, um aumento da atividade da enzima também aos 21 dias (nona coleta). Esta resposta foi devido à irregularidade na emissão de raízes ao longo do experimento. O primeiro pico observado corresponde, provavelmente, à emissão de raízes observada aos 13, 17 e 19 dias (quinta, sétima e oitava coletas, respectivamente), enquanto o segundo, à observada aos 27 dias (12ª coleta).

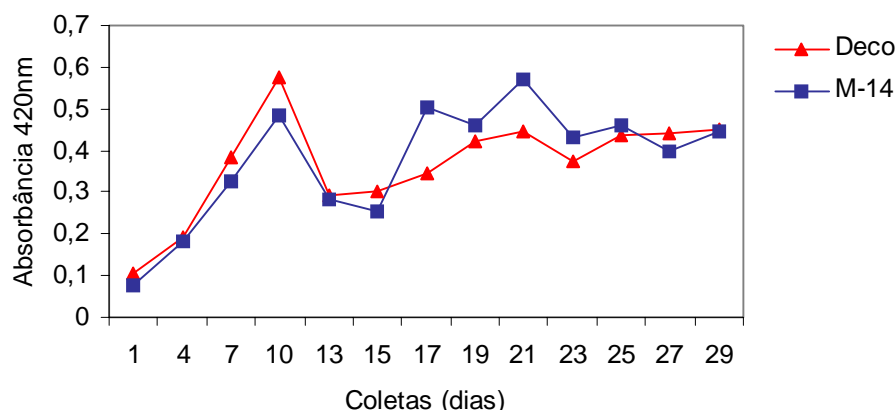


Figura 3 – Atividade da enzima peroxidase nos genótipos de aspargo M-14 e Deco durante 30 dias

## CONCLUSÕES

A exposição dos explantes de aspargo ao escuro não influencia o enraizamento *in vitro*.

A concentração de 5,0µM de ANA no meio de enraizamento é mais eficiente do que a concentração de 2,5µM.

Existe relação entre a atividade da peroxidase e a emissão de raízes, sendo um bom marcador do enraizamento *in vitro* de aspargo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ANSARI, S.A.; PALANISAMY, K.; KUMAR, P. Peroxidase and nitrate reductase activity in relation to rhizogenesis in *Populus deltoides* Marsh. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.33, n.11, p.892-893, 1995.
- BERTHON, J. Y.; BOYER, N.; GASPARD, T. Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Peroxidase activity as a marker. **Plant Cell Reports**, v.6, p.341-344, 1987.
- CABONI, E. Peroxidase activity and *in vitro* rooting in an almond (*Prunus dulcis* Mill) genotype. **Acta Horticulturae**, v.373, p.201-205, 1994.
- DALET, F.; CORNU, D. Lignification level and peroxidase activity during *in vitro* rooting of *Prunus avium*. **Can. J. Bot.**, v.67, p.2182-2186, 1989.
- DAMIANO, C.; CHIARIOTTI, A.; CABONI, E.; QUARTA, R.; BOUMIS, G. Some factors affecting the induction and the expression of rooting in different fruit species *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v.300, p.211-225, 1991.
- DAVIS, T.H.; HAISSING, B.E.; SANKLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland, Dioscorides Press, 1988. 315p.
- DUFOUR, M. Callogenese et organogenese *in vitro* chez des varietes greffons de pommier cultive (*Malus domestica* Borkh) et des varietes porte-greffes (*Malus spp.*). Montpellier, 1988. 165p. Tese de Doutorado. Universite des Sciences et Techniques du Languedoc.
- GASPARD, T.; COUMANS, M. Root formation. In: BONGA, J.M. e DURTZAN, D.J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 1987, v.2, p.202-217.
- GASPARD, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J. F.; BERTHON, J. Y.; RIPETTI, V. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. **Agronomie**, v.12, p.757-765, 1992.

- GHOSH, B. E SEN, S. Micropropagation of *Asparagus cooperi* as affected by growth regulators. **Biologia Plantarum**, v.36, n.4, p.527-534, 1994.
- GUNAWAN, L.W.; SIDHARTA, A.A.; HARJADI, S.S.; TJITROSOMO, S.; HARJADI, W.; WIWODO, W.D. (ed), SUDARSONO. *In vitro* plantlet production and field establishment – *Asparagus officinalis*. **Acta Horticulturae**, n.369, p.226-235, 1994.
- HAUSMAN, J.F.; KEVERS, C.; GASPARD, T. Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots *in vitro*, and the adversary effect of spermidine. **Journal of Plant Physiology**, v.146, p.681-685, 1995.
- KALRA, G.; BHATLA, S.C. Auxin-ethylene interaction in adventitious rooting and related changes in anodic peroxidase isozymes in sunflower hypocotyls. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.5, n.1, p.37-41, 1996.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- LIU, Z.H.; HSIAO, I.C.; PAN, Y.W. Effect of naphthaleneacetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyl cuttings of soybean during root formation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.37, n.4, p.247-253, 1996.
- MATO, M. C.; RÚA, M. L.; FERRO, E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.72, p.84-88, 1988.
- MÜLLER, N.T.G. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de dois genótipos de aspargo (*Asparagus officinalis* L.). Pelotas, 1997. 55p. Dissertação (mestrado em Agronomia). Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel"/Universidade Federal de Pelotas.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v.15, p.473-497, 1962.
- QURAIISHI, A.; KOICHE, V.; MISHRA, S. K. *In vitro* micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.87-91, 1996.
- PATHAK, R.K.; SAROJ, P.L. Studies on biochemical and anatomical parameters associated with rooting in *Psidium* species. **Crop Research Hisar**, v.10, n.3, p.318-323, 1995.
- RIPETTI, V.; KEVERS, C.; GASPARD, T. Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. **Adv. Hort. Sci.**, v.8, p.29-32, 1994.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; ROUT, M.C.; DAS, P. Metabolic changes during rooting in stem cuttings of *Casuarina equisetifolia* L.: effects of auxin, the sex and the type of cutting on rooting. **Plant Growth Regulation**, v.19, n.1, p.35-43, 1996.
- ROY, S.K.; LUTFAR RAHMAN, S.K.; DATTA, P.C. *In vitro* propagation of *Mitragyna parvifolia* Korth. **Plant Cell Tiss.**, v.12, p.75-80, 1988.

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 Horticulturae**, v.227, p.438-440, 1988.

SANCHEZ, M.C.; SAN-JOSE, M.C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. **Tree Physiology**, v.16, n.8, p.673-680, 1996.

ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B. da; CAMPOS. A. D.; CENTELLAS A. Q.; MÜLLER, N. T.; GOTTINARI, R. A. Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase de porta-enxerto de macieira, Cv. Marubakaido (*Mallus prunifolia*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, n.1, p.23-30, jan./abr. 1997.