

Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas

In vitro rooting of quince cv. MC as rootstock for pear and acclimatization of the rooted microcuttings

Alan Cristiano Erig¹ Márcia Wulff Schuch²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o tipo e a concentração de auxina que promova o enraizamento *in vitro* de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MC como porta-enxerto para a pereira (*Pyrus spp*) e avaliar a sobrevivência das microestacas enraizadas durante a aclimatização às condições *ex vitro*. Os tratamentos consistiram de três tipos de auxina (ácido indolbutírico 'AIB', ácido naftalenoacético 'ANA' e ácido 3-indolacético 'AIA'), utilizadas em cinco diferentes concentrações (0, 5, 10, 15 e 20 µM). Inicialmente as microestacas foram cultivadas, durante sete dias, em meio de cultura constituído pelos sais de MS reduzidos à metade de sua concentração original, acrescido de mio-inositol (100mgL⁻¹), sacarose (30gL⁻¹), ágar (6gL⁻¹) e de auxina. Após, as microestacas foram transferidas para um novo meio de cultura sem auxina. Microestacas enraizadas oriundas de vários tratamentos, indistintamente, foram aclimatizadas às condições *ex vitro*. O AIB, o ANA e o AIA apresentaram o mesmo efeito sobre a percentagem de enraizamento, obtendo-se o melhor resultado com 10 µM; o ANA favoreceu o maior comprimento médio das raízes; a intensidade de formação de calo aumentou com a concentração de auxina, sendo maior com o AIB e o ANA; e ao fim de 30 dias de aclimatização, 65,12% das plantas sobreviveram.

Palavras-chave: micropropagação, reguladores de crescimento, auxina, porta-enxerto, *Cydonia oblonga*.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine auxin type and concentration to promote *in vitro* rooting of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MC as rootstock for pear (*Pyrus spp*) and to evaluate the survival of the rooted microcuttings during acclimatization in *ex vitro* conditions. The treatments consisted of three auxin types (IBA, NAA and IAA) and five different concentrations (0, 5, 10, 15 and 20 µM). Initially the microcuttings were cultivated for seven days in culture medium constituted by

salts of MS reduced to half of its original concentration and added myo-inositol (100mg L⁻¹), sucrose (30g L⁻¹), agar (6g L⁻¹) and auxin. Microcuttings were then transferred to a new medium without auxin. Rooted microcuttings originating from several treatments faintly, were acclimatized in *ex vitro* conditions. Auxins (IBA, NAA and IAA) had the same effect on rooting percentage with the best result obtained with 10 µM. NAA favored the largest mean length of the roots. Callus formation increased with auxin concentration, being larger with IBA and NAA. Survival of 65.12% of the plants was obtained after 30 days of acclimatization.

Key words: micropropagation, plant growth regulators, auxin, rootstock, *Cydonia oblonga*.

INTRODUÇÃO

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) surge, no Brasil, como uma alternativa de porta-enxerto para a produção de mudas de pereira (*Pyrus spp*), cultura esta, que tem como maiores entraves para sua expansão, a dificuldade de obtenção de porta-enxertos, a falta de material vegetal sadio para a produção de mudas (PASQUAL et al., 1990; LEITE, 1992; LEITE, 1995) e a falta de adaptação de cultivares e porta-enxertos utilizados (NAKASU & LEITE, 1992).

Os porta-enxertos comumente utilizados, são *P. calleryana* e *P. betulaefolia*, porém estes, induzem vigor excessivo na cultivar copa, tornando difícil o manejo das plantas e retardando a entrada em produção, contrariando os princípios da fruticultura moderna (BIANCHI et al., 2002). Em vista disto, o marmeleiro tem merecido atenção especial devido ao interesse em obter plantas de pereira com dimensões

¹Engenheiro Agrônomo, MSc, 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 (UFPeL), CP 354, 96010-900, Pelotas, RS. Bolsista Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). E-mail: acerig@ufpel.tche.br
Autor para correspondência.

²Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPeL. E-mail: marciaws@ufpel.tche.br

reduzidas (LORETI & MASSAI, 1998). Entre as vantagens de sua utilização, destaca-se o efeito ananizante sobre a pereira, induzindo o baixo vigor, a precocidade de produção (ERMEL et al., 1999) e a boa qualidade de fruta.

A cultura de tecidos tem se apresentado como uma alternativa viável de clonagem de espécies lenhosas, para formação de pomares clonais ou produção comercial de mudas (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). A rizogênese, na micropropagação, é o fenômeno formador de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, constituindo plantas completas para posterior aclimatização às condições *ex vitro*. Para a maioria das espécies lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil, principalmente quando se usa material na fase adulta (HU & WANG, 1983), e a aclimatização é uma das mais importantes (FORTES et al., 1998). Muitas vezes, as raízes formadas não apresentam características adequadas às funções de absorção, determinando, dentre outros fatores, a morte das mudas, quando transferidas para o solo.

As auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido 3-indolacético (AIA), que é a principal auxina de várias plantas. Essas substâncias têm em comum a capacidade de atuarem na expansão e no alongamento celular, favorecendo também a divisão celular em cultura de tecidos, principalmente, no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). Entre outras substâncias usadas para o enraizamento *in vitro* estão o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido indolbutírico (AIB) (ROSS, 1992).

Nos meios de cultura para enraizamento, tipos e concentrações de auxinas são as variáveis que, em geral, mais influenciam e podem variar tanto entre espécies quanto entre populações ou clones. Quando a concentração de auxina no meio é excessiva, ocorre formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Por esta razão é, às vezes recomendada, a utilização de dois meios de cultura para a rizogênese. Primeiramente, as partes aéreas permanecem em meio com auxina, favorecendo a indução e, posteriormente, são transferidas para meio sem auxina, estimulando assim a rizogênese e o crescimento das raízes. Este processo tem sido adotado com frequência em espécies lenhosas florestais e frutíferas (FETT NETO et al., 1992). O enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de marmeleiro 'A' foi obtido por DOLCET-SANJUAN et al. (1991) cultivando os brotos em meio de cultura contendo 5µM de ANA durante uma semana, e em seguida, transferindo-os para meio de cultura sem auxina durante quatro semanas.

O objetivo deste trabalho foi determinar o tipo e a concentração de auxina que promova o enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e avaliar a sobrevivência das

microestacas enraizadas durante a aclimatização às condições *ex vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, e no telado pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, ambos da Universidade Federal de Pelotas, RS, no período entre 1º de setembro e 10 de novembro de 2003.

Os explantes, constituídos de microestacas apicais com duas ou três folhas e 1,5 a 2cm de comprimento, foram obtidos de brotos de marmeleiro cv. MC cultivados *in vitro*, em fase de multiplicação, 40 dias após a repicagem. Os tratamentos consistiram de três tipos de auxina (ácido indolbutírico 'AIB', ácido naftalenoacético 'ANA' e ácido 3-indolacético 'AIA'), utilizadas em cinco diferentes concentrações (0, 5, 10, 15 e 20µM), totalizando 15 tratamentos.

Inicialmente, as microestacas foram cultivadas no escuro, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante sete dias, em meio de cultura constituído pelos sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) reduzidos a metade de sua concentração original, acrescido de 100mgL^{-1} de mio-inositol, 30gL^{-1} de sacarose, e de auxina, conforme o tratamento. Após este período, as microestacas foram transferidas para um novo meio de cultura de mesma constituição, porém sem auxina, e mantidas em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 pH, de ambos os meios de cultura, foi ajustado para 5,7 antes da inclusão do ágar na concentração de 6g L^{-1} e, posteriormente, autoclavados a 121°C e 1,5atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de 200mL com 30mL de meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 5, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição se constituiu de um frasco com cinco explantes.

Aos 35 dias após o início dos tratamentos, avaliou-se a percentagem de enraizamento, o número médio de raízes, o comprimento médio das raízes e a intensidade de formação de calo na base dos explantes. Para esta última variável, foram atribuídas notas de 0 a 3, sendo 0 = ausência, 1 = pouca, 2 = média e 3 = alta intensidade de calo, conforme padrão apresentado na figura 1a. Os dados foram submetidos

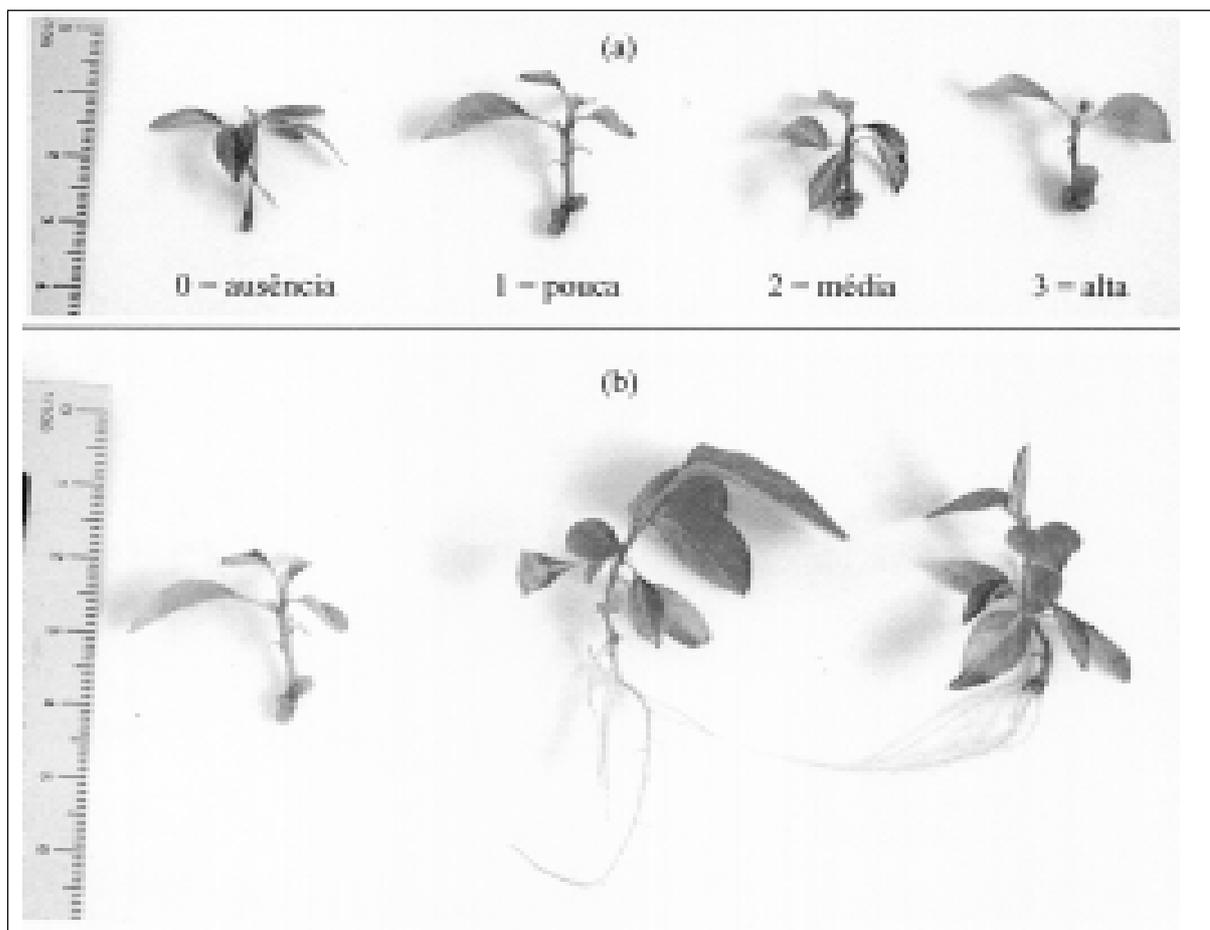


Figura 1 – Intensidades de formação de calo observadas na base dos explantes (notas de 0 a 3) (a), e aparência dos explantes com enraizamento e sem enraizamento (b), em marmeleiro cv. MC, aos 35 dias de cultivo *in vitro*. UFPel, Pelotas, RS. 2003.

à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan e analisados por regressão polinomial, através do uso do pacote estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987). Os dados da percentagem de enraizamento foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$, e os dados do número médio de raízes segundo raiz quadrada de $x + 0,5$, onde x foi o número obtido. Os dados da intensidade de formação de calo foram transformados segundo $\log x + K$, sendo x a nota atribuída e $K = 1$.

Após as avaliações, 43 microestacas enraizadas oriundas de vários tratamentos indistintamente, foram transferidas para copos de polietileno (com capacidade para 50mL) com três pequenos furos na base, contendo o substrato para aclimatização (mistura solo + substrato comercial Plantmax®, na proporção de 1 : 1) previamente esterilizado através de autoclavagem a 121°C e 1,5atm por 40 minutos. Os copos contendo as plantas foram acomodados em uma bandeja plástica tampada com vidro

(para manter a umidade relativa do ar elevada), que foi mantida em sala de crescimento durante dez dias, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons do período de luz de $42\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Transcorrido este período a bandeja contendo os copos com as plantas foi levada para o telado (com sombreamento de 30%), sendo destampada após dez dias, e permanecendo assim durante mais dez dias. No final de cada um destes períodos (bandeja tampada durante dez dias em sala de crescimento, bandeja tampada durante dez dias em telado, e bandeja destampada durante dez dias em telado), registrou-se o número de microestacas que sobreviveram para determinar-se a percentagem de sobrevivência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a percentagem de enraizamento e número médio de raízes, não houve diferença entre os tipos de auxina utilizados (AIB, ANA e AIA) (Tabela 1). Na Figura 1b, observa-se a aparência das microestacas

Tabela 1 – Percentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes (cm) e intensidade de formação de calo (notas) em microestacas de marmeleiro cv. MC, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, em função do tipo e da concentração de auxina. UFPel, Pelotas, RS. 2003.

Variável	Auxina	Concentração (μM)					Média
		0	5	10	15	20	
% de enraizamento*	AIA	0,00	1,34	19,57	10,20	24,59	7,83
	AIB	0,00	33,68	29,50	10,20	23,71	15,55
	ANA	1,34	39,52	23,71	33,01	11,61	19,14
Média		0,14B	20,64A	24,15A	16,68A	19,58A	
Número médio de raízes*	AIA	0,00	0,20	1,46	0,62	1,82	0,72
	AIB	0,00	1,66	1,95	0,90	3,07	1,36
	ANA	0,50	2,33	1,44	2,71	0,90	1,49
Média		0,15B	1,27A	1,61A	1,31A	1,85A	
Comprimento médio das raízes (cm)*	AIA	0,00	1,12	1,62	0,43	2,90	1,22b
	AIB	0,00	1,08	3,55	2,10	2,57	1,86ab
	ANA	0,42	2,83	2,60	4,99	2,09	2,59a
Média		0,14B	1,68A	2,59A	2,51A	2,52A	
Intensidade de formação de calo (0 a 3)*	AIA	0,00aC	0,33bB	0,34bB	0,66bA	0,69cA	0,38
	AIB	0,09aD	0,78aC	1,23aB	1,66aAB	2,06aA	1,04
	ANA	0,00aC	0,84aB	0,97aAB	1,33aA	1,32bA	0,81
Média		0,03	0,63	0,81	1,17	1,29	

* Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

enraizadas e não enraizadas. No enraizamento *in vitro* de macieira cv. Fred Hough também não foram constatadas diferenças entre o AIB e o ANA (CENTELLAS et al., 1999). Já no enraizamento *in vitro* de clones de marmeleiro, MORINI & SCIULTI (1991) obtiveram a maior percentagem de enraizamento no clone Ct.S.212 com AIB (3,44 μM) e no clone Ct.S.214 com ANA (3,76 μM). Segundo ZANOL et al. (1997), existem diferenças entre genótipos e sensibilidade para com a auxina no enraizamento de plantas frutíferas.

Verificou-se um comportamento quadrático para a percentagem de enraizamento em relação à concentração de auxina no meio de cultura (Figura 2a), obtendo-se a maior média (24,15%) com 10 μM de auxina (o ponto de máxima calculado pela equação foi de 23,75% com 12,6 μM de auxina). Este resultado reforça a afirmativa de GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), de que quando a concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, ocorre o comprometimento da rizogênese. FACHINELLO et al. (1995) também relatam que o aumento da concentração de auxina exógena, aplicada em estacas, provoca efeito estimulador de raízes até um valor máximo, a partir do qual qualquer acréscimo de auxinas tem efeito inibitório. RADMANN et al., (2002) verificaram que as maiores percentagens de enraizamento do porta-enxerto de macieira 'M-9',

ocorreram nas concentrações mais baixas de AIB e ANA, observando-se uma redução na percentagem de enraizamento com aumento da concentração destes fitorreguladores (de 0,5 μM a 100 μM). No presente trabalho, quando não se utilizou auxina no meio de cultura (0 μM) obteve-se 0,14% de enraizamento, provavelmente, devido ao acúmulo de auxinas endógenas provenientes das folhas ou gemas. Tal acúmulo resulta em aumento da atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente, na formação de raízes (WAREING & PHILLIPS, 1981). O número médio de raízes foi diretamente relacionado à concentração de auxina, obtendo-se a maior média (1,85 raízes) com 20 μM (Figura 2b). Resultados que, foram obtidos por LEONARDI et al. (2001) que, trabalhando com *Grevillea rosmarinifolia*, obtiveram aumento no número de raízes em brotos com a concentração de ANA ou AIB no meio de cultura.

O maior comprimento médio das raízes foi obtido utilizando-se a auxina ANA (2,59cm), seguida pelo AIB (1,86cm) e por último pelo AIA (1,22cm) (Tabela 1). Em relação à concentração de auxina, observou-se um comportamento quadrático, obtendo-se o máximo comprimento de raízes (2,73cm) com 14,8 μM de auxina (Figura 2c). Verifica-se que resultados superiores, tanto para a percentagem de enraizamento como para o comprimento médio das raízes, foram

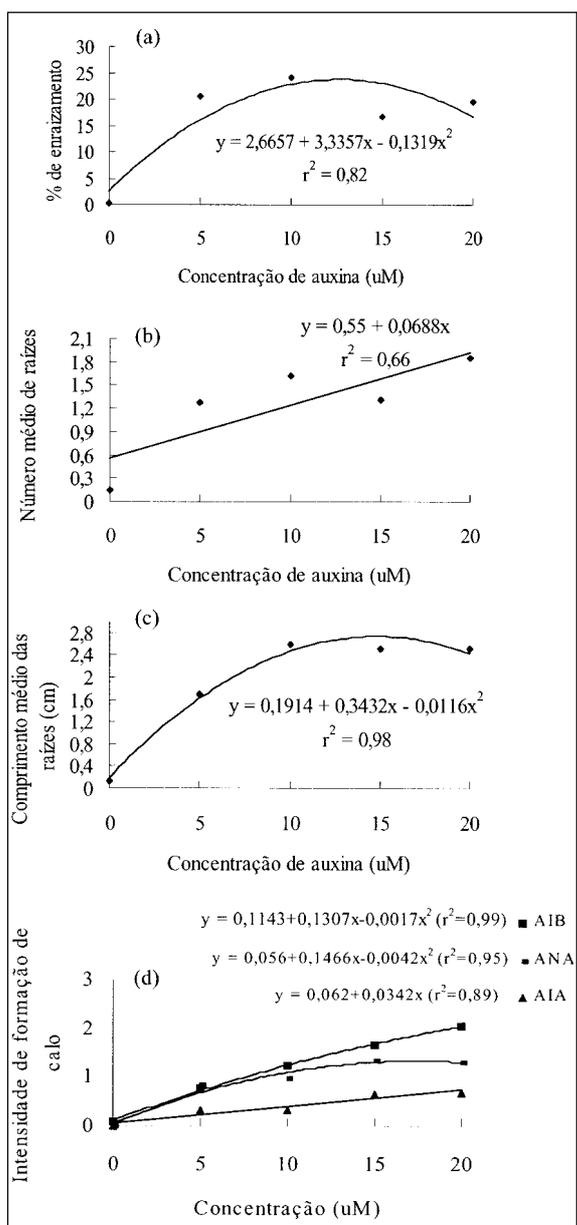


Figura 2 – Percentagem de enraizamento (a), número médio de raízes (b), comprimento médio das raízes (c) e intensidade de formação de calo (d), em marmeleiro cv. MC, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, em função da concentração de auxina. UFPel, Pelotas, RS. 2003.

obtidos com concentrações intermediárias àquelas utilizadas, reforçando a idéia de que o aumento da concentração de auxina exógena provoca efeito estimulador de raízes até um valor máximo, a partir do qual qualquer acréscimo de auxinas tem efeito inibitório.

Na ausência de auxinas, a intensidade de formação de calo foi nula. Porém, com 5, 10 e 15 μ M, a

maior intensidade de formação de calo foi obtida com o AIB e o ANA, seguido pelo AIA. Já com 20 μ M, a formação de calo foi maior com o AIB, seguido pelo ANA e por último pelo AIA (Figura 2d). Com o AIB e o ANA, observou-se um comportamento quadrático para a intensidade de formação de calo em relação à concentração de auxina, obtendo o ponto de máxima (notas de 2,06 e 1,33, respectivamente, sendo 1=baixa e 2=alta intensidade de formação de calo) com 20 μ M e 17,4 μ M destas auxinas, respectivamente. Utilizando-se o AIA, a intensidade de formação de calo foi diretamente proporcional a sua concentração, com nota de 0,69 (sendo 1=baixa intensidade de formação de calo) utilizando-se 20 μ M.

A formação de calo na zona de enraizamento é indesejável, pois ela pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular com a planta (FACHINELLO et al., 1995). A diferença observada entre as auxinas, no presente trabalho, pode estar relacionada à maior degradação e menor taxa de absorção de AIA em relação às outras duas auxinas (ANA e AIB). Segundo NISSEN & SUTTER (1990), o AIA é foto-oxidado rapidamente no meio de cultura (50% em 24 horas), o AIB levemente (10% em 24 horas), sendo o ANA muito mais estável que os outros dois. Além da foto-oxidação, o AIA é degradado pela AIA-oxidase, podendo também se ligar a outras moléculas na planta produzindo conjugados e perdendo sua atividade auxínica (ROSS, 1992). Isto explicaria a menor intensidade de formação de calo observada com a utilização de AIA. Uma menor intensidade de formação de calo no enraizamento *in vitro* de macieira cv. Fred Hough foi observada por CENTELLAS et al. (1999) na presença de AIA, e maior na presença de ANA, sendo que o AIB ocupou uma posição intermediária.

Trinta dias após o início da aclimatização, depois das plantas terem permanecido durante 10 dias em bandeja tampada na sala de crescimento, 10 dias em bandeja tampada no telado, e 10 dias em bandeja destampada no telado, obteve-se 65,12% de sobrevivência (Tabela 2). Utilizando vermiculita na aclimatização do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', NUNES et al. (1999) obtiveram 64% e 90% de sobrevivência mantendo as plantas em caixa plástica aberta e caixa plástica coberta com vidro, respectivamente.

A redução no número de plantas sobreviventes ocorreu após elas terem sido transferidas da sala de crescimento para o telado (a sobrevivência decresceu de 100% para 74,42%). Este fato se deve, em grande parte, à mudança das condições ambientais as quais as plantas estavam submetidas, principalmente, a temperatura, que na

Tabela 2 – Número de plantas sobreviventes do total de plantas aclimatadas, e percentagem de sobrevivência de microestacas de marmeleiro cv. MC, enraizadas *in vitro*, durante os diferentes estádios de aclimação às condições *ex vitro*, ao longo de 30 dias. UFPel, Pelotas, RS. 2003.

Estádios de aclimação as condições <i>ex vitro</i>	Número de plantas sobreviventes/total de plantas aclimatadas	% de sobrevivência*
Após 10 dias em bandeja tampada mantida na sala de crescimento	43/43	100,00a
Após 10 dias em bandeja tampada mantida no telado	32/43	74,42b
Após 10 dias em bandeja destampada mantida no telado	28/43	65,12b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

sala de crescimento era controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). No telado, a alta temperatura associada à alta umidade relativa do ar no interior da bandeja tampada, favoreceu a proliferação de fungos nas folhas das microestacas, causando a morte de algumas plantas. A alta umidade relativa que se faz necessária para a sobrevivência das plantas e a alta temperatura, são extremamente favoráveis ao rápido desenvolvimento de todo tipo de microrganismo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Aliada a essa condição, a fragilidade dos tecidos, pouco lignificados e desprovidos de camada cuticular, deixa a planta suscetível à invasão de microrganismos saprófitos e ao ataque de patógenos.

CONCLUSÕES

Para o enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC o ácido indolbutírico (AIB), naftalenoacético (ANA) ou 3-indolacético (AIA), quando utilizado na concentração de $10\mu\text{M}$ no meio de cultura, promove a maior percentagem de enraizamento. A mudança gradativa do ambiente durante a aclimação das plantas possibilita uma sobrevivência de 65,12% das plantas ao fim de 30 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. V.1, p.261-296.

BIANCHI, V.J.; VICENZI, M.; FACHINELLO, J.C. Resposta de crescimento de quatro cultivares de pereira, em viveiro, enxertadas sobre diferentes cultivares de marmeleiro na região Sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. **Anais...** Belém : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002. 5p.

CENTELLAS, A.Q. et al. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.81-186, 1999.

DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Reports**, New York, v.10, p.240-242, 1991.

ERMEL, F.F. et al. Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis*/*Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. **Tree Physiology**, Victoria, v.19, p.645-654, 1999.

FACHINELLO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas : UFPel, 1995. 179p.

FETT NETO, A.G. et al. Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.140, p.720-728, 1992.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S.; SILVA, J.B. **Efeito do frio em brotações *in vitro* de macieira sobre o alongamento dos entrenós no período de aclimação**. Pelotas : Embrapa Clima Temperado, 1998. n.36, p.1-4. (Pesquisa em Andamento).

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. V.1, p.183-260.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A. et al. (Eds.) **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali : CIAT, 1991. p.41-77.

LEITE, D.L. **Micropropagação de pereira (*Pyrus spp.*) cultivar Carrick**. 1992. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel.

LEITE, G.B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OHxF97**. 1995. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel.

LEONARDI, C.; RUGGERI, A.; MALFA, S. Hormone effects on *in vitro* proliferation and rooting of *Grevillea* explants.

- Scientia Horticulturae**, Amnsterdam, v.90, p.335-341, 2001.
- LORETI, F.; MASSAI, R. Il contributo dell'Università di Pisa al miglioramento genético dei portinnesti. **Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.9-13, 1998.
- MORINI, S.; SCIULTI, R. *In vitro* propagation of quince clonal rootstocks. **Agricoltura Mediterranea**, Pisa, v.121, n.1, p.56-57, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, p.473-497, 1962.
- NAKASU, B.H.; LEITE, D.L. Pirus 9, seleção de pereira para o sul do Brasil. **HortiSul**, Pelotas, v.2, n.3, p.19-20, 1992.
- NISSEN, J.S.; SUTTER, E.G. Stability of IAA and IBA in nutrient medium of several tissue culture procedures. **HortScience**, Alexandria, v.25, p.800-802, 1990.
- NUNES, J.C.O. et al. Micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.191-195, 1999.
- PASQUAL, M. et al. Influência de diversos fatores sobre a multiplicação do porta-enxerto de pereira *Pyrus calleryana*, Du, *in vitro*. **Ciência e Prática**, Lavras, v.14, n.1, p.28-34, 1990.
- RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J.C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.624-628, 2002.
- ROSS, C.W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberellins. In: SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. (Eds.) **Plant physiology**. 4.ed. Belmont : Wadsworth, 1992. p.357-377.
- WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3.ed. Oxford, England : Pergamon, 1981. 343p.
- ZANOL, G.C. et al. Efeito de diferentes concentrações do ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.2, p.199-205, 1997.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas : DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.