

SUPERAÇÃO *IN VITRO* DA DORMÊNCIA DE EMBRIÕES DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA M9 (*Malus pumilla* Mill.)¹

ADRIANA CIBELE DE MESQUITA DANTAS², LIZIANE KADINE ANTUNES DE MORAES³, ENIO LUIZ PEDROTTI³, RUBENS ONOFRE NODARI⁴, MIGUEL PEDRO GUERRA⁴

RESUMO - A dormência em sementes de macieira é um dos fatores limitantes para o avanço nos programas de melhoramento genético nesta espécie. Assim, o presente estudo objetivou estudar a germinação *in vitro* de embriões dormentes do porta-enxerto de macieira M9, oriundos da EE São Joaquim da EPAGRI/SC. Os embriões foram excisados de sementes maduras e inoculados em meio basal MS, adicionado de sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (6 g.L⁻¹), água de coco (15%), caseína hidrolisada (CH) (500 mg.L⁻¹), AIA (0 e 14 µM); AG₃ (0 e 1,5 µM), Kin (5 µM), 2-iP (12 µM); BAP (4 µM). As culturas foram mantidas no escuro por 10 dias e transferidas para sala de crescimento sob regime de luz de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e 40 µmol de radiação luminosa. A maior porcentagem de germinação (75%) foi obtida em meio MS suplementado com CH (500 mg.L⁻¹), AIA (14 µM), AG₃ (1,5 µM) e Kin (5 µM). Quando a Kin foi substituída por BAP (4µM), observou-se a formação de calo, sobre o qual se originaram gemas e brotações, cujos valores médios foram de 2,3 brotos por embrião e 12,3 gemas por brotação. Em relação ao comprimento das brotações, não houve diferença significativa entre os tratamentos. A maior porcentagem de indução de calos ocorreu em meio de cultura suplementado com AIA, Kin e 2-iP. O meio de cultura MS/2 suplementado com CH e água de coco e isento de fitoreguladores, resultou em 25% de germinação. Já, o número de raízes foi maior no meio de cultura MS suplementado com AIA (14 µM), AG₃ (1,5 µM) e CH. O comprimento médio das raízes (4,0 cm) não foi afetado por nenhum tratamento em particular. Desta forma, esta técnica é uma alternativa eficiente ao uso de tratamentos de frio para a superação da dormência.

Termos para indexação: germinação *in vitro*, citocinina, AG₃, caseína hidrolisada, água de coco.

SUPPRESSION OF *IN VITRO* DORMANCY IN EMBRYOS OF ROOTSTOCK OF APPLE M9 (*Malus pumilla* Mill.)

ABSTRACT - The embryo dormancy in apple is a limiting factor in breeding programs with this species. Thus the present work was carried out in order to study the *in vitro* germination of M9 apple dormant embryos, originated from the Experimental Station of São Joaquim (EPAGRI/SC). The embryos, excised from mature seeds were inoculated in the basal culture medium MS supplemented with of sucrose (30 g.L⁻¹), coconut water (15%), casein hydrolysate (CH) (500 mg.L⁻¹), AIA (0 and 14 µM); GA₃ (0 and 1.5 µM); and three cytokinins sources: (Kin (5 µM); 2iP (12 µM) and BAP (4 µM). The culture medium was gellified with agar (6 g.L⁻¹). The cultures were maintained in the dark during 10 days, then transferred to growth room under 16 hours of light period, 25 ± 2°C, temperature, and 19 µE.m⁻².s⁻¹ of luminous radiation. The results showed that the highest value for embryo germination (75%) was obtained in MS culture medium supplemented with CH, AIA (14 µM), GA₃ (1.5 µM), and Kin (5 µM). When, in this treatment the Kin was replaced by BAP (4 µM), it was observed the callus induction and the subsequent proliferation of buds and shoots, reaching values of 2.3 shoots/embryos and 12.3 buds/shoot. The length of shoots was 4 cm, without statistical differences between the different treatments. The highest percentage of callus induction occurred in culture medium supplemented with AIA, Kin, and 2-iP. The culture medium MS half strength supplemented with CH, coconut water and free of growth regulators resulted in values of 25% of germination. The root number was highest in the culture medium supplemented with AIA (14 µM), GA₃ (1.5 µM), and CH. The average root length (4.0) was not affected by any particular treatment. Thus, this technique is an efficient alternative to the cool treatments for dormancy suppression.

Index terms: *in vitro* germination, cytokinin, GA₃, caseine, coconut water.

INTRODUÇÃO

O período juvenil na macieira pode ser significativamente reduzido, acelerando-se o crescimento das plântulas por enxertia em porta-enxertos anões e pela seleção para um período juvenil curto (Viser, 1970). Mesmo quando o período juvenil é encurtado por tais meios, ocorre um longo intervalo de tempo a partir do cruzamento até a germinação,

tornando mais difícil e longo o programa de melhoramento genético para esta espécie (Roen, 1994).

Com o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro*, tornou-se possível, entre outras, obter-se plântulas viáveis em menos tempo. Isto pode ser obtido mediante o isolamento do embrião e seu cultivo asséptico em meios de cultura adequados que permitam a superação da dormência, o desenvolvimento embrionário e a germinação (Nakayama *et al.*, 1974). Embora a

¹ (Trabalho 248/2000). Recebido: 13/11/2000. Aceito para publicação: 18/01/2002.

² Doutoranda em Fruticultura de Clima Temperado, FAEM/UFPEL, Pelotas, RS

³ Bolsista de Iniciação Científica, CCA, UFSC, Florianópolis, SC

⁴ Prof. Dr. Pós-Graduação em Recursos Genéticos, CCA/UFSC, Florianópolis, SC

excisão de embriões a partir de sementes seja uma operação onerosa e demorada, plântulas originadas a partir do cultivo *in vitro* de embriões florescem mais precocemente, e podem servir como progenitores em futuros cruzamentos, reduzindo assim o ciclo de gerações (Roen, 1994).

As sementes da macieira apresentam dormência e necessitam de um ótimo de temperatura para sua superação. Normalmente, são necessários entre 75 a 90 dias em temperaturas de 2-6°C para que se inicie a germinação (Seeley e Damavandy, 1985). Estas condições podem ser substituídas pelo isolamento de embriões e pelos tratamentos com giberelinas, isoladamente ou em combinação com citocininas, e aplicados durante o tratamento a frio (Come e Durand, 1971) ou durante a germinação (Bulard, 1985; Durand *et al.*, 1976).

Perino e Côme (1991) confirmam a existência, durante o processo de germinação de embriões de macieira, de duas principais fases: uma fase denominada *sensu stricto* e outra, chamada de fase de crescimento. A fase mais crucial é a da germinação *sensu stricto*, onde a transição para o crescimento da plântula é mediada por respostas na sensibilidade a fatores externos e a substâncias que possam ativar o metabolismo no embrião.

A superação da dormência da semente é acompanhada por pronunciadas mudanças no equilíbrio hormonal, envolvendo as giberelinas (Halinska *et al.*, 1987), as auxinas (Côme, 1981) e as citocininas (Zhang e Lespinasse, 1991). As mudanças no equilíbrio hormonal podem resultar na influência exercida de um fitorregulador sobre níveis endógenos de outro, assim como em respostas morfogenéticas (Rudnicki *et al.*, 1972). Além disto, as interações entre estes fitorreguladores afetam a superação da dormência e a subsequente germinação das sementes (Dunlap e Morgan, 1977).

O meio mais utilizado para o cultivo de embriões é o MS (Murashige e Skoog, 1962) com algumas variações na sua suplementação com fitorreguladores. Contudo, as respostas dependem do genótipo da planta-matriz e do estágio de desenvolvimento do embrião. De uma forma geral, a taxa de germinação é tanto menor quanto mais jovem for o embrião (Bruck e Walker, 1985).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes combinações de fitorreguladores e outras substâncias orgânicas suplementadas ao meio de cultura MS, visando a superar a dormência de embriões e a promover a subsequente germinação *in vitro* a partir de sementes maduras do porta-enxerto M9, oriundas da polinização aberta.

MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos foram colhidos maduros, ao acaso, oriundos da polinização aberta do porta-enxerto M9 (*Malus pumilla* Mill.), em plantas-matrizes cultivadas na EPAGRI – São Joaquim (SC). O porta-enxerto M9, de hábito ananizante, é bastante utilizado em plantios de macieira em sistema de cultivo de alta densidade, por causa de sua precocidade e produtividade (Webster, 1997).

A etapa laboratorial foi conduzida no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina. Em câmara de fluxo laminar, os frutos foram submetidos a uma esterilização com etanol

96° por 10 minutos, seguida de hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos. As sementes foram removidas mediante corte transversal do fruto, sendo submetidas a uma desinfestação em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1,25% por 15 min, seguidas de três lavagens com água esterilizada e autoclavada.

Os embriões foram então retirados das sementes e inoculados em tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio MS, acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹), ágar, (6 g.L⁻¹) (meio basal) e suplementado com os seguintes fitorreguladores e compostos orgânicos: A) ácido 3-indolacético (AIA) (14 µM), ácido giberélico (GA₃) (1,5 µM) e caseína hidrolisada (CH) (500 mg.L⁻¹); B) AIA (14 µM), GA₃ (1,5 µM) e CH (500 mg.L⁻¹) e cinetina (Kin) (5 µM); C) AIA (14 µM), GA₃ (1,5 µM) e CH (500 mg.L⁻¹) e isopenteniladenina (2iP) (12 µM); D) AIA (14 µM), GA₃ (1,5 µM) e água de coco (AC) (15%); E) AIA (14 µM), GA₃ (1,5 µM), CH (500 mg.L⁻¹) e 6-benzilaminopurina (BAP) (4 µM); F) MS/2, CH (500 mg.L⁻¹) e AC (15%).

As culturas foram mantidas no escuro por 10 dias e, após este período, foram transferidas para sala de crescimento sob regime de 16 horas de luz e temperatura de 25 ± 2°C. Após 60 dias, os embriões foram coletados e avaliados quanto à percentagem de contaminação, oxidação e germinação, número e comprimento de brotações e de raízes, percentagem de calo formado nas raízes e cotilédones. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco embriões por parcela e cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à Análise de Variância e ao teste de separação de médias SNK, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Análise da Variância apresentou efeitos significativos para o fator meio de cultura nas variáveis percentagem de germinação, percentagem de calos formados nas raízes e nos cotilédones, número de brotações, número de gemas e número de raízes (dados não mostrados).

A maior percentagem de germinação (75%) foi obtida no tratamento B, em meio de cultura basal suplementado com CH, AIA (14 µM), GA₃ (1,5 µM) e Kin (5 µM). Entretanto, quando, neste meio basal, ocorreu a substituição da Kin pelo 2-iP (2 µM), observaram-se os maiores valores médios para percentagem de indução de calos (tratamento C). Também nestes mesmos tratamentos, se observou uma maior percentagem de indução de calos originados nos cotilédones (Figura 1). Em relação a B, as taxas de germinação dos tratamentos A e F alcançaram valores relativos de 66,6% e os tratamentos C e E, 83,3%.

Badizadegen e Carlson (1967) observaram que embriões maduros de macieira cultivados em meios de cultura suplementados com 25 ppm de BAP resultaram em 66% de germinação para cv. MacIntosh e 50% para a cv. Wealthy. Já, Ivanicka e Mokra (1982) obtiveram 80% de germinação em embriões de *Prunus avium* cultivados em meio de cultura MS suplementado com AIA (5 mg.L⁻¹), AG₃ (0,5 mg.L⁻¹) e de CH (500 mg.L⁻¹).

O tratamento A, cujo meio de cultura basal foi suplementado com AIA (14 µM), GA₃ (1,5 µM) e CH (500 mg.L⁻¹), induziu a formação de calos nas raízes. Tem sido sugerido que as auxinas podem, dependendo da concentração utilizada, estimular

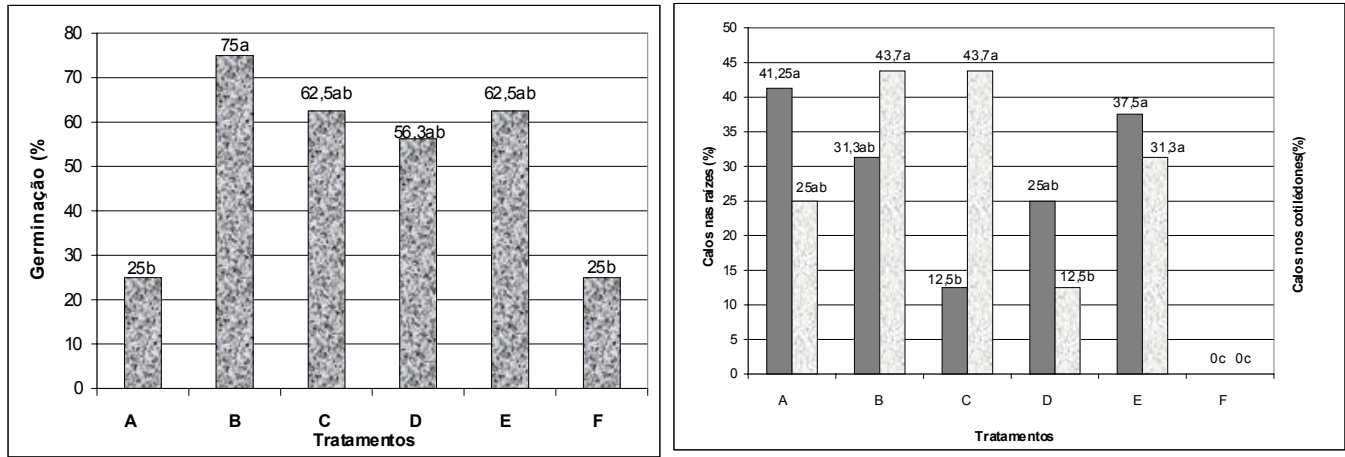


FIGURA 1 - Percentagem de germinação, de calos formados nas raízes e nos cotilédones do porta-enxerto de macieira M9, cultivados *in vitro*, em meio de cultura MS.CCA/UFSC, Florianópolis-SC, 2000.

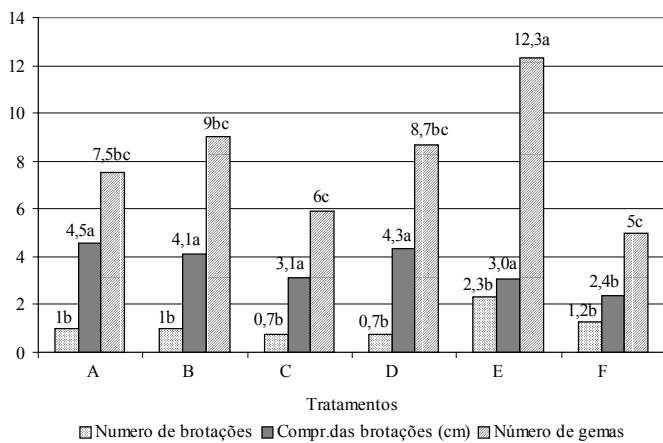


FIGURA 2 - Número e comprimento de brotações e de gemas produzidas em embriões do porta-enxerto de macieira M9, cultivados *in vitro*, em meio de cultura CCA/UFSC, Florianópolis-SC, 2000.

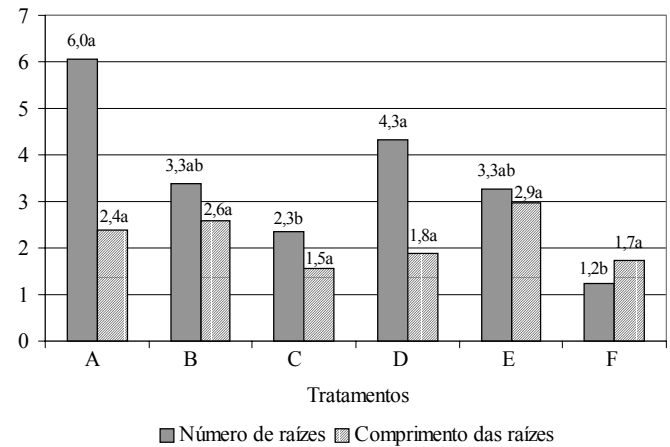


FIGURA 3 - Número e comprimento de raízes em embriões do porta-enxerto de macieira M9, cultivados *in vitro*, em meio de cultura MS. CCA/UFSC, Florianópolis-SC, 2000.

a produção de calos (Grattapaglia e Machado, 1998). Este aspecto é corroborado pelo fato de que, no presente trabalho, os embriões cultivados no meio de cultura sem AIA não formaram calos. Apesar de alguns efeitos morfogenéticos inibitórios, as auxinas, em concentrações baixas, podem promover o crescimento do primórdio radicular, e o AIA, em baixas concentrações, pode estimular o desenvolvimento de embriões de algumas espécies (Rietsema *et al.*, 1953; Krikorian, 1993).

O meio de cultura suplementado com AIA (14 μM), AG₃ (1,5 μM) e CH e o meio de cultura MS/2 suplementado com CH e AC (tratamento A e F, respectivamente) resultaram nas menores percentagens de germinação (25%). Van Overbeck *et al.* (1941) obtiveram respostas positivas à AC, adicionada ao meio de cultura, na germinação de embriões de *Datura sp.* Boase *et al.* (1993) observaram que a AC promoveu aumento no número de brotos e de gemas *in vitro* de *Actinidia deliciosa*. Tem sido sugerido que a AC, adicionada ao meio de cultura basal, forneça açúcares, vitaminas, aminoácidos, fitoreguladores e outros metabólitos essenciais às culturas (Caldas *et al.*, 1998).

Não foram observadas diferenças em relação aos efeitos da CH quando comparados aos efeitos atribuídos aos meios de

cultura isentos deste composto. Contrariamente, Raganwamy (1961) reportou que a CH (400 mg.L^{-1}) foi essencial para a germinação de embriões de *Citrus microcarpa*, *X Triticosecale* (Bajaj, 1980), *Oryza sativa* (Shome e Bhaduri, 1982) e *Prunus persica* (Nakayama *et al.*, 1974).

Em relação ao número de brotações e gemas produzidas, a melhor resposta foi observada com o meio de cultura basal suplementado com BAP (4 μM) (tratamento E), o qual promoveu a neoformação de 2,3 brotos por embrião e 12,3 gemas por brotação (Figura 2). Quanto ao número de brotos, os outros tratamentos resultaram em valores inferiores, em torno de 30% do tratamento E. Já em relação ao número de gemas, os tratamentos B e D resultaram em valores de 70% do tratamento E, e os tratamentos A, C e F, de 45%.

Estes resultados podem ser atribuídos ao efeito citocinínico forte do BAP (Krikorian, 1993), em relação às outras citocininas (Kin e 2-iP) empregadas no presente trabalho. De acordo com Fiorino e Leva (1983) e Berardi *et al.* (1993), o BAP é a citocinina mais ativa e mais utilizada na multiplicação de brotações e de gemas em macieira e pereira.

Em relação ao comprimento das brotações, não houve

diferença estatística significativa entre os tratamentos. Entretanto, foi observado maior valor no tratamento A, constituído pelo meio de cultura suplementado com AIA, GA₃ e CH. O menor valor foi observado no tratamento F, constituído pelo meio de cultura MS/2 suplementado com CH e AC, apresentando 2,4 cm de comprimento nas brotações após 60 dias de cultivo *in vitro* (Figura 2).

O número de raízes foi maior nos meios de cultura suplementados com AIA, AG₃ e isentos de citocininas (tratamentos A, E e D). Já para o comprimento de raízes, não houve diferenças estatísticas significativas, porém os tratamentos A, B e E apresentaram mais de 2,0 cm de comprimento (Figura 3). A característica comprimento de raízes é importante para a aclimatização destas plântulas em viveiro.

Neste trabalho, pode-se verificar que a suplementação *in vitro* com os fitoreguladores AG₃, AIA e diferentes fontes de citocininas foi determinante para a superação da dormência dos embriões do porta-enxerto M9. Segundo Hartmann *et al.* (1990), o AG₃ é importante para a superação da dormência fisiológica em embriões, estimulando a germinação. Entretanto, Bewley (1997) e Khan (1994) observaram que o AG₃ não parece estar envolvido no controle da dormência *per se*, mas tem importância vital na promoção e manutenção da germinação. O AG₃ é conhecido como um promotor da germinação em oposição à ação inibitória do ABA, e em combinação com citocininas promove a superação da dormência promovida pelo ABA.

CONCLUSÕES

Em macieira, poucos trabalhos têm reportado sucesso no resgate, cultivo e germinação de embriões maduros em meios de cultura, suplementados ou não com fitoreguladores ou complexos naturais, como AC e CH. No presente trabalho, foram alcançadas taxas expressivas de superação *in vitro* da dormência do porta-enxerto de macieira M9, por meio da técnica resgate de embriões. A suplementação do meio de cultura basal, com os fitoreguladores AG₃, AIA, 2-iP, BAP e Kin e os complexos naturais CH e AC, aumentou significativamente as taxas de sucesso na obtenção de plântulas, comparativamente aos meios isentos destes compostos. Estes resultados são relevantes porque demonstraram que esta técnica se constitui numa alternativa eficiente e rápida à superação da dormência de embriões de macieira comparativamente ao tratamento convencional a frio.

Os resultados indicam o potencial de uso desta biotecnologia, como técnica auxiliar efetiva nos programas de melhoramento genético de porta-enxertos de macieira, notadamente quando há a necessidade da utilização de embriões oriundos de cruzamentos.

AGRADECIMENTOS

Aos Pesquisadores da EPAGRI-São Joaquim/SC, pelo fornecimento dos frutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADIZADEGAN, M.; CARLSON, R.F. Effect of N6-benzyladenine on seed germination and seedling growth of apple (*Malus sylvestris* Mill.). **Proceedings American Society Horticultural Science**, Geneva, v. 91, p.1-8, 1967.
- BAJAJ, Y.P.S. Enhancement of the *in vitro* development of triticale embryos by the endosperm of *Durum* wheat. **Cereal Research Communications**, Hungria, v.8, p.359-364, 1980.
- BERARDI, G.; INFANTE, R.; NERI, D. Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. From seedlings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.53, n.1-2, p.157-165, 1993.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v.9, p.1055-1066, 1997.
- BOASE, M.R.; WRIGHT, S.; McLEAY, P.L. Coconut milk enhancement of axillary shoot growth *in vitro* of kiwifruit. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v.21, n.2, p.171-176, 1993.
- BULARD, C. Intervention by gibberellin and cytokinin in the release of apple embryos from dormancy: A appraisal. **New Phytologist**, New York, v. 101, p.241-249, 1985.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, ^aC.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**, Brasília: 1998. p. 87 – 132.
- CÔME, D. Problems of embryonal dormancy as exemplified by apple embryo. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v.29, p.145-1456, 1981.
- CÔME, D.; DURAND, M. Influence de l'acide gibbérellique sur la levée de dormance des embryons de pomier (*Pirus malus* L.) par le froid. **Comptes Rendus de L'Academie des Science**, Cedex, Série D, v.273, p.1937-1940, 1971.
- DUNLAP, J.R.; MORGAN, P.W. Reversal of induced dormancy in lettuce by ethylene, kinetin and gibberellic acid. **Plant Physiology**, Bethesda, v.60, p.222-224, 1977.
- DURAND, M. CÔME, D.; THÉVENOT, Factors liable to modify the action of gibberellic acid on the germination of more or less dormant apple embryos. **Acta Universitatis Nicolai Copernici, Biol XVIII**, v.37, p.59-66, 1976.
- FIORINO, P.; LEVA, A.R. Propagation of apple cultivars. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.131, p.95-99, 1983.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: In: TORRES, ^aC.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**, Brasília Embrapa – SPI, 1998. Brasília, p.183-260, 1998.

- HALISKA, A.; SINSKA, I.; LEWAK, S.T. Embryonal dormancy in apple seeds in controlled by free and conjugated gibberellin levels in the embryonic axis and cotyledons. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.69, p.531-534, 1987.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. **Plant propagation principles and practices**. Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1990.
- IVANICKA, J.; MOKRÁ, A. Development and cultivation of early-ripening cherry embryos. **Biologia Bratislava**, Bratislava, v.37, n.1, p.3-12, 1982.
- KHAN, A.A. Induction of dormancy in nondormant seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.119, p.408-413, 1994.
- KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p.41-77
- NAKAYAMA, F.; RACCA, R.W.; TORROBA, C.A. Obtencion de plantulas *in vitro* com embriones imaturos de cultivares precoces de duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch.). **Revista de la Facultad de Agronomía**, La Plata, (3ª ép), v.1-2, p. 81-93, 1974.
- NEIL, C.A; TOPOLENSKI, L.D. Hormonal regulation of growth and development of tomato embryos *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n.6, p.869-873, 1985.
- RAGANWAMY, N.S. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. **Phytomorphology**, New Delhi, v.11, p.109-127, 1961.
- RIESTEMA, J.; SATINA, S.; BLAKESLEE, A.F. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. **American Journal of Botany**, Bronx, v.40, p.538-545, 1953.
- ROEN, D. Prospects for shortening the breeding cycle of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using embryo culture I. Reducing the period of cold treatment by hormone application. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.59, n.2, p.49-53, 1994.
- SEELEY, S. D. and H. DAMAVANDY. Response of seed of seven deciduous fruits to stratification temperatures and implications for modeling. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, p.726-729 1985.
- SHOME, A.; BHADURI, P.N. *In vitro* of immature embryos of rice *Oryza sativa* L. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.20, p.184-186, 1982.
- SINSKA, I. Interaction of ethephon with cytokinin and gibberellin during the removal of apple seed dormancy and germination of embryos. **Plant Science**, Pretoria, v.64, p.39-44, 1989.
- VAN OVERBEEK, J.; CNKLIN, M.E.; BLAKESLEE, A.F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. **Science**, Alexandria, v.94, p.350-351, 1941.
- VISSER, T. The relation between growth, juvenile period, and fruiting of apple seedlings and its use to improve breeding efficiency. **Euphytica**, Wageningen, v.19, p.293-302, 1970.
- WEBSTER, A.D. A review of fruit tree rootstock research and development. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.451, p.53-73, 1997.
- ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. Removal of embryonic dormancy in apple (*Malus x domestica* Borkh.) by 6-benzylaminopurine. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.46, p. 215-223, 1991.