

Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*

SOUZA, A.V.¹; PEREIRA, A.M.S.^{2*}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Botucatu – Faculdade de Ciências Agrônômicas, C.P. 237. Faz. Experimental Lageado, 18603-970-Botucatu, SP-Brasil. ²Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Av. Costábile Romano, n^o 2201, 14096-900-Ribeirão Preto, SP, Brasil. *e-mail: apereira@unaerp.br.

RESUMO: O processo de enraizamento adventício de plantas cultivadas *in vitro* é uma técnica que vem sendo empregada na propagação vegetativa de um significativo número de espécies nativas e exóticas. Muitos fatores estão relacionados com a fase de enraizamento, influenciando positiva e/ou negativamente o estabelecimento de protocolos de micropropagação. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão de literatura sobre os principais fatores inerentes ao processo de enraizamento *in vitro*, incluindo a relação entre os níveis de auxinas endógenas e exógenas, juvenilidade, genótipo, nutrição mineral, condições do meio de cultura, presença de reguladores de crescimento e/ou outras substâncias como compostos fenólicos e carvão ativado, condições ambientais de crescimento das culturas *in vitro*, dentre outros. Embora a completa elucidação de todos os processos envolvidos no enraizamento de plantas cultivadas *in vitro* ainda não tenha sido estabelecida, o estudo pormenorizado dos principais fatores que interferem na indução de raízes é fundamental para embasar novas pesquisas que poderão contribuir para o enraizamento de plantas economicamente importantes.

Palavras-chave: Enraizamento, *in vitro*, auxinas, poliaminas, compostos fenólicos

ABSTRACT: *In vitro* cultivated plant's rooting. The adventitious rooting process of *in vitro* cultured plantlets is a technique that has been employed for the vegetative propagation of a significant number of native and exotic species. Many factors are associated with the rooting stage influencing positive and/or negatively the establishment of micropropagation protocols. The objective of this work was a literature review of the main inherent factors concerning *in vitro* rooting process including the correlation among others the endogenous and exogenous auxins levels, juvenility, genotype, mineral nutrition, culture medium conditions, addition of growth regulators and other substances as phenolic compounds and active coal besides growth environmental conditions of *in vitro* cultures. Although the complete elucidation of all processes involved with rooting of *in vitro* cultured plants has not been achieved so far, a comprehensive study of the main factors that interfere on rooting is fundamental for the establishment of new researches that might contribute for the rooting of economically important plants.

Key words: Rooting, *in vitro*, auxins, polyamines, phenolic compounds

INTRODUÇÃO

Com o advento da biotecnologia, a técnica de micropropagação teve um forte impacto sobre a produção de plantas em larga escala e centenas de protocolos foram estabelecidos visando a produção comercial de mudas, como também a preservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção.

Uma das etapas que pode dificultar o estabelecimento de um protocolo de micropropagação é o enraizamento. O desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande

complexidade envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados.

De acordo com Filho (1993), raízes adventícias são aquelas que não se originam da radícula do embrião ou da raiz principal por ela formada. Podem formar-se nas partes aéreas das plantas, em caules subterrâneos, em hipocótilos de plantas jovens e no mesocótilo de sementes de gramíneas. Sua origem e desenvolvimento são geralmente endógenos. Entretanto, existem raízes adventícias que se formam na epiderme, junto com o tecido cortical e nas células de parênquima das margens de folhas de pecíolos (Filho, 1993; Ono & Rodrigues, 1996). Em plantas cultivadas *in vitro*, as raízes adventícias podem ser formadas, na fase de multiplicação, a partir de células de parênquima localizadas nas partes aéreas. Nessa condição a rizogênese pode ocorrer de modo direto ou indireto a partir de calos. (Filho, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998).

Os estudos sobre enraizamento adventício tiveram grandes avanços a partir do ano de 1928, com a identificação do primeiro fitohormônio de ocorrência natural: a auxina ácido 3-indolacético (AIA). Posteriormente, em 1935, auxinas sintéticas análogas ao AIA, como os ácidos indolbutírico (AIB) e naftaleno-acético (ANA) foram preconizados como fitorreguladores de enraizamento. Além das auxinas, outras substâncias também foram avaliadas e apontadas como importantes para o enraizamento, como por exemplo, as vitaminas do grupo B1 efetivas no crescimento de raízes induzidas *in vitro* (White, 1937).

O processo de formação de raiz adventícia ocorre de uma a três semanas e pode ser dividido em três fases: indução, iniciação e alongação. As fases de indução e iniciação, geralmente são dependentes de auxina, mas o crescimento (alongação) das raízes pode ser inibido pela presença dessa classe de substâncias (McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Grattapaglia & Machado, 1998).

Entre os principais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade e genótipo, dentre outros, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro*, dentre outros.

Níveis de auxina endógena

Na fase de indução e iniciação, o processo é regulado pela relação quantitativa entre os níveis de auxina e citocinina, como também pela

participação de outras substâncias. O AIA endógeno age como um ativador de gene alavancando a formação precoce do primórdio radicular e a aplicação de auxinas sintéticas favorece a conjugação entre o AIA endógeno e aminoácidos que promovem a síntese de proteínas específicas necessárias para a formação de raízes iniciais (Gaspar & Hofinger, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Aloufa, 2003).

O alto nível de auxinas endógenas pode ser necessário para a iniciação de raízes adventícias primordiais. Existe uma relação intrínseca entre os níveis de auxina endógena e a habilidade para iniciar raízes. Em geral, após aplicação da auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e conseqüentemente há o início da formação de raízes primordiais (Gaspar & Hofinger, 1988). A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a divisão celular e o subseqüente alongamento das células, sendo que, essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes (Ford et al., 2001). Estes autores mostraram que algumas espécies quando são expostas a ação de auxina exógena têm o nível de AIA endógeno elevado, que decresce antes da formação das raízes, o que dificulta ou impossibilita o enraizamento.

Questões diretamente ligadas ao transporte de auxinas também podem ser relevantes para o estudo de enraizamento *in vitro*, visto que existe uma relação entre aplicação de auxina exógena, ação e concentração de auxina endógena no local de formação das raízes.

Estudos realizados por Ford et al. (2001) demonstraram a importância do transporte basipetal de AIA endógeno e sua relação com a aplicação de auxina exógena, para o enraizamento adventício. As auxinas exógenas quando aplicadas na base da estaca são translocadas para diferentes órgãos da planta, e posteriormente re-transportada para a base da mesma. Quando a auxina é aplicada na base da estaca, ela é rapidamente transportada pela corrente de transpiração até as folhas, onde exerce a função de ativar maior produção de AIA, que posteriormente será transportado até a região de iniciação radicular.

Em espécies mais difíceis de enraizar, como as espécies lenhosas, o AIA endógeno pode ser metabolizado mais rapidamente no centro de produção, quando comparados às espécies de mais fácil enraizamento, resultando em uma baixa concentração de AIA livre para ser transportado para a base das estacas onde ocorrerá o enraizamento. Além disso, as células localizadas na base das estacas de espécies lenhosas que estariam mais aptas a se desdiferenciarem e se transformarem em raízes adventícias, podem estar menos sensíveis às auxinas ou menos competentes para essa rediferenciação (Ono & Rodrigues, 1996; Ford et al., 2001).

A relação existente entre aplicação de auxina exógena e concentração da auxina endógena, também pode estar relacionada com atividades enzimáticas, tendo em vista sua ação na regulação da concentração endógena de determinadas substâncias vegetais. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a atividade AIA-oxidase/peroxidase é responsável pela regulação do nível endógeno de auxina e os tecidos responsáveis pela formação de raiz são ricos em peroxidases.

Durante a fase de iniciação do primórdio radicular, a auxina é ativa em decorrência da ativação do sistema AIA-oxidase, entretanto, esta atividade diminui com o transcorrer das fases de crescimento das raízes, período em que a auxina é inativa. A sensibilidade dos tecidos na fase de iniciação dos primórdios radiculares parece estar relacionada com essa alta atividade, pois o AIA endógeno é oxidado pelo sistema AIA oxidase e a adição de auxina exógena torna-se favorável ao processo de formação das raízes (Ono & Rodrigues, 1996).

A atividade de peroxidases no enraizamento adventício foi estudada por Syros et al. (2004) para a espécie *Ebenus cretica* L. Eles observaram variações na atividade desta enzima de acordo com os tratamentos de auxinas aplicados nos diferentes genótipos estudados. Foi observado um aumento na atividade enzimática durante a fase de iniciação radicular, porém, quando os explantes foram tratados com AIB, notou-se um decréscimo desta enzima. Eles constataram diferenças significativas nas estruturas anatômicas, conteúdo de lignina e atividade de peroxidases entre genótipos de fácil e de difícil enraizamento.

Para o completo estabelecimento do protocolo de micropropagação, é necessário focar alguns aspectos relacionadas a planta matriz como o estágio de desenvolvimento, o genótipo, as condições de estresse que a planta está submetida, o crescimento da planta em relação a luminosidade, a presença de substâncias nitrogenadas, compostos fenólicos, substâncias de reserva como carboidratos, a nutrição mineral, dentre outros. São esses fatores associados ou não que favorecerão o sucesso do processo de rizogênese *in vitro* (Davis et al., 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003; Oliveira et al., 2003).

Juvenilidade

A capacidade de enraizamento adventício *in vitro* de espécies herbáceas e lenhosas é bastante diferenciada. A grande maioria das espécies herbáceas não apresenta dificuldades quanto ao enraizamento, mas o mesmo não ocorre com espécies lenhosas (McCown, 1988; Hackett, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Ford et al., 2001; Hovárth et al., 2001; Aloufa, 2003).

Nas espécies lenhosas, embora haja

trabalhos mostrando que muitas não apresentam dificuldade de enraizarem, como por exemplo, algumas importantes espécies brasileiras como o mogno, a aroeira e a sangra d'água, os aspectos relacionados ao estágio de desenvolvimento como maturação, vigor vegetativo e mudanças fisiológicas podem interferir de modo significativo no enraizamento (Andrade et al., 2000; Lopes et al., 2001; Bonilla, 2002; Aloufa, 2003; Tchoundjeu et al., 2004; Lima, 2004).

Segundo Hackett (1988), a habilidade de enraizamento, em explantes de espécies lenhosas, declinam com a maturidade e de acordo com Rotundo (1993), isso ocorre porque há significativas alterações na capacidade morfogenética dos tecidos quando as espécies lenhosas passam do estado juvenil para o estado adulto.

A dificuldade de enraizamento de espécies lenhosas, relacionada a maturidade da planta, pode ser em parte resolvida no processo da micropropagação pelas contínuas subculturas que promovem o rejuvenescimento dos tecidos, o que aumenta a capacidade de enraizamento (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001).

A influência benéfica do número de subculturas sobre o enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus* sp tem sido relatada por alguns autores. Nos estudos realizados com *Eucalyptus citriodora*, baixa porcentagem de enraizamento (35%), foi obtida após 4 subculturas. O aumento para 8 subculturas atingiu 40% e cerca de 70 a 80% após 12 subculturas (Rotundo, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998).

Trabalhos relatados por Hackett (1988), também demonstraram um aumento no potencial de enraizamento em algumas cultivares de maçã, ameixa, pêra e eucalipto. Segundo este autor, a ocorrência de mudanças morfológicas, bioquímicas e anatômicas relacionadas a juvenilidade estão associadas com o aumento do número de subculturas.

No entanto, há espécies lenhosas cuja dificuldade de enraizamento não está relacionada a questão da maturidade da planta e portanto mesmo que se faça elevados números de subculturas o enraizamento não ocorre (McCown, 1988). A influência da juvenilidade sobre o enraizamento adventício da arbórea *Quercus robur* foi estudada por Pierik et al. (1997). Estes autores utilizaram brotos juvenis e adultos de diferentes genótipos, ambos cultivados em casa de vegetação e subcultivados *in vitro*. Eles observaram que as subculturas não foram eficientes para promover o enraizamento adventício, visto que este ocorreu somente em explantes não lenhosos (suculentos) e brotos jovens.

Genótipo

Além da juvenilidade, o genótipo da planta também influencia no enraizamento e muitos trabalhos têm sido realizados mostrando que fatores genéticos

estão ligados direta ou indiretamente à capacidade de determinadas espécies formar ou não raízes adventícias (Haissig & Riemenschneider, 1988; Yepes & Aldwinckle, 1994; Assis & Teixeira, 1998; Syros et al., 2004).

Bordón et al. (2000) estudaram o enraizamento *in vitro* de diferentes espécies de *citrus* sp, e observaram que o enraizamento não ocorreu de modo homogêneo nas espécies estudadas.

Algumas diferenças relacionadas a indução de raízes adventícias *in vitro* e genótipo também foram observadas por Cuenca & Amo-Marco (2000) quando estudaram a micropropagação de *Salvia valentina* e *S. blancoana*. O uso de diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB resultaram em significativa diferença quanto a porcentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes entre as duas espécies. *S. valentina* foi mais sensível ao ANA, visto que maiores concentrações inibiram a formação de raízes, o que não ocorreu com *S. blancoana*.

O efeito de auxinas no enraizamento *in vitro* de diferentes genótipos de *Grevillea* foi estudado por Leonardi et al. (2001). As respostas quanto ao enraizamento foram diferentes entre *Grevillea rosmarinifolia* e *G. semperflorens* para o tipo e a concentração de auxina testada. A suplementação de auxina no meio de cultura foi essencial para o enraizamento de *G. rosmarinifolia*, e menos importante para *G. semperflorens*. A auxina ANA foi mais eficiente para *G. rosmarinifolia* quanto a porcentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes, enquanto que para *G. semperflorens* o AIB permitiu a obtenção de melhores resultados para as mesmas características avaliadas.

Diferenças no potencial de enraizamento também podem ser observadas dentro de indivíduos de uma mesma espécie. Yepes & Aldwinckle (1994) estudaram a micropropagação de treze cultivares de *Malus* e observaram que a concentração ótima de AIB x porcentagem de enraizamento variou de acordo com cada cultivar utilizada.

Quando Polanco & Ruiz (2001) estudaram a indução de raízes adventícias *in vitro* de quatro cultivares de *Lens culinaris* observaram significativa diferença na porcentagem de enraizamento de acordo com os diferentes genótipos. Resultados semelhantes foram obtidos por Pierik et al. (1997) com diversos genótipos de *Quercus robur* e por Rogalski et al. (2003) com diferentes porta-enxertos de *Prunus*.

Qualidade das plântulas cultivadas *in vitro*

A qualidade das plântulas cultivadas *in vitro* é influenciada pelas fases de isolamento e estabilização dos explantes. Durante a fase de estabilização *in vitro*, ocorrem algumas mudanças anatômicas e fisiológicas nas plântulas que têm sido reconhecidas como favorável ao enraizamento. As

mudanças anatômicas benéficas ocorridas na zona de enraizamento podem estar relacionadas com a estiolação dos brotos, maior comprimento internodal, tecidos mais tenros e um decréscimo na formação dos tecidos mecânicos. Mudanças ocorridas na fisiologia dos brotos associadas com a estiolação do caule, geralmente induzem um aumento na habilidade de formar raízes adventícias o que geralmente esta relacionado ao transporte de auxinas, à sensibilidade dos tecidos a auxinas e a presença e atividade de metabólitos secundários (Maynard & Bassuk, 1988; McCown, 1988).

Plântulas conduzidas ao enraizamento com reduzido número de folhas e pouco alongadas não enraízam bem (Grattapaglia & Machado, 1998). Alguns autores ressaltam que o comprimento ideal da plântula é em torno de 1,0 cm e a presença de folha é importante, considerando que estas são fundamentais na produção de auxinas, nutrientes, sacarose ou compostos nitrogenados necessários para a formação de raízes (McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Bachelard & Stowe, 1962 citados por Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001).

Tendo em vista a complexidade dos fatores envolvidos no enraizamento adventício *in vitro*, fatores relacionados ao meio de cultura precisam ser amplamente estudados.

Meio de cultura

Quanto ao estado físico do meio de cultura, tem-se observado que algumas espécies podem estabelecer um sistema radicular mais vigoroso, quando cultivados em meio líquido com alguma fonte de aeração, como pontes de papel ou meio sob agitação. Trabalhos relatados por Yepes & Aldwinckle (1994) e Aloufa (2003) com diferentes cultivares de *Malus* sp e por Ebrahim & Ibrahim (2000) com *Maranta leuconeura* são exemplos importantes de sucesso de enraizamento em meio líquido.

Embora o meio líquido interfira positivamente na disponibilidade de água, nutrientes, hormônios e níveis de oxigênio, a grande maioria dos protocolos de micropropagação é estabelecida em meio de cultura semi-sólido (Grattapaglia & Machado, 1998; Pereira, 1999; Bertolucci et al., 2000; Bonilla, 2002; Souza, 2003; Kadota & Niimi 2004).

Quando a utilização de meios semi-sólidos é indicada a concentração da substância geleificante empregada, deve ser consideravelmente baixa, entre 0,2 a 0,4% (Yepes & Aldwinckle, 1994; Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003). Segundo McCown (1988), o agar pode ter um efeito inibitório sobre a indução de raízes adventícias *in vitro*, sendo as causas exatas não conhecidas.

A influência da composição dos meios de cultura no processo de enraizamento adventício *in*

vitro, está relacionada à concentração de sais minerais empregados no preparo do mesmo e a presença de reguladores vegetais.

De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento de plântulas *in vitro* (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001; Pasqual, 2001; Aloufa, 2003; Souza et al., 2004; Lima, 2004).

A alta concentração de sais, que compõem o meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), mesmo em presença de auxinas, pode inibir o enraizamento *in vitro* (McCown, 1988). Diluições deste, para $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e até $\frac{1}{8}$ de sais, tem possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas. Meios básicos menos concentrados como WP, White, Knop, Heller podem ser igualmente favoráveis (Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001; Pasqual, 2001; Aloufa, 2003).

Protocolo de enraizamento *in vitro* de porta enxerto de macieira 'Marubakaido' foi desenvolvido em meio MS sólido com a metade da concentração dos sais, o mesmo foi obtido com as espécies *Rotula aquática*, *Hypericum perforatum* e *Saussurea obvallata*, *Malus domestica*, *Cuminum cyminum*, *Eclipta alba* e *Eupatorium adenophorum* (Centellas et al., 1999; Borthakur et al., 2000; Preto & Santarém, 2000; Hoffmann et al., 2001; Tawfik & Noga, 2001; Joshi & Dhar, 2003; Martin, 2003).

O emprego de meio MS/4 tem possibilitado a obtenção de resultados satisfatórios na indução de raízes adventícias *in vitro* para um significativo número de espécies, como pode ser observado nos trabalhos realizados com *Azadirachta indica*, *Hemidesmus indicus*, *Bauhinia vahlii*, *Adenophora triphylla*, *Lychnophora pinaster*, dentre outras (Sreekumar et al., 2000; Bhatt & Dhar, 2000; Chen et al., 2001; Chaturvedi et al., 2004; Souza et al., 2004).

O pH do meio de cultura também pode ter ou não grande influência no enraizamento *in vitro*; mas isso depende da espécie em estudo (Ebrahim et al., 2000). A grande maioria dos protocolos de enraizamento *in vitro* é desenvolvida com a faixa de pH entre 5,0 e 6,0 (Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003). Entretanto, alguns trabalhos mostram que pH ainda mais baixos, na faixa de 4,8 a 3,5 podem ser indicados para enraizamento de determinadas espécies como *Brosimum gaudichaudii* (Fidélis et al., 2000).

Reguladores de crescimento

Como discutido anteriormente, sabe-se que um dos fatores mais importantes relacionados ao processo de formação de raízes adventícias *in vitro* é inerente à presença e/ou ausência de auxina. Vários autores confirmam o seu fundamental papel no processo de rizogênese (Gaspar & Hofinger, 1988;

Blazich, 1988; Davis & Sankhla, 1988; McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Margara, 1988 citado por Hoffmann, 1999; Ford, 2001; Pasqual, 2001; Lopes et al., 2001; Sankhla & Upadhyaya, 1988 e Scott, 1972 citados por Aloufa, 2003; Oliveira et al., 2003).

A suplementação de auxinas ao meio de enraizamento é usual, entretanto, há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença destes reguladores, o que pode ser explicado pelo elevado níveis endógenos desses fitohormônios (Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001).

Plantas como *Dianthus caryophyllus*, *Lippia alba*, *Coleus forskohlii*, *Tournefortia paniculata*, *Pothomorphe umbellata*, *Artocarpus atilis* e *Phyllanthus caroliniensis* apresentam elevado índice de enraizamento em meio de cultura isento de auxina (Cuzzuol et al., 1996; Gupta et al., 2001; Bertolucci et al., 2000; Pereira et al., 2000; Rouse-Miller & Duncan, 2000; Catapan et al., 2000; Reddy et al., 2001).

Do mesmo modo que existe um significativo número de espécies que enraízam sem necessidade de auxina no meio de cultura, existem também aquelas que apresentam um aumento considerável na porcentagem de enraizamento quando o meio é suplementado com esta classe de regulador.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as auxinas estão presentes em mais de 80% dos meios de enraizamento, podendo ser adicionadas sozinhas ou em combinação. Entretanto, o tipo e a concentração empregada são as variáveis que mais influenciam o processo. De acordo com Aloufa (2003), as auxinas utilizadas de modo isolado ou associadas com citocininas, giberelinas como o GA₃, ácido abscísico (ABA) e fenólicos mostram seus efeitos principalmente durante a indução e iniciação de raiz.

Para algumas espécies como a *Salvia fruticosa*, *Rudgea viburnoides* e *Bixa orellana* a utilização de auxina não associada a outras auxinas ou reguladores, favorece o enraizamento (Almeida et al., 1995; Bonilla, 2002; Arikat et al., 2004), enquanto que para outras plantas, como por exemplo, a *Symonanthus bancroftii*, enraízam melhor quando cultivadas em meio contendo associação de auxinas (Panaia et al., 2000).

As auxinas mais comuns empregadas nos meios de enraizamento são o ANA, AIB e AIA. A diferença entre elas, além da parte estrutural da molécula, é a estabilidade que decresce respectivamente. Sendo assim, a maior parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, utilizam as auxinas ANA e AIB. Outras auxinas também têm sido utilizadas em trabalhos de enraizamento *in vitro* como o 2,4-diclorofenolacético (2,4-D), o picloram, o ácido beta-naftoxiacético (ANOA) e o ácido p-cloroenoxiacético (ApCFA) mas, de modo geral, estas estimulam a formação de calos e prejudicam o

enraizamento.

Contudo, independente da fórmula estrutural da auxina, a excessiva concentração no meio de cultura pode ser tóxica e também favorecer a formação de calos na base das microestacas, comprometendo a rizogênese, como também o crescimento da parte aérea (Ono & Rodrigues, 1996; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001).

A toxicidade promovida por elevadas concentrações de auxinas pode ser amenizada ou neutralizada pela utilização de duas fases durante o enraizamento *in vitro*, ou seja, no início do processo, as plântulas devem permanecer por algumas horas ou mesmo alguns dias na presença da auxina e posteriormente serem transferidas para o mesmo meio com baixa concentração de sais e isento de regulador (Grattapaglia & Machado, 1998).

A relação concentração de auxina e tempo de exposição do explante pode ser determinante para o desenvolvimento do enraizamento *in vitro* (Negash et al., 2000; Bosa et al., 2003). Tratamentos severos utilizando altas concentrações de auxina durante reduzido período e a transferência das plântulas para um meio livre de regulador de crescimento pode promover, de forma mais eficiente, o enraizamento (Hovárth et al., 2001). De acordo com McCown (1988), as dosagens efetivas situam-se, geralmente, entre 0,05 a 10,0 mg L⁻¹ para períodos mais prolongados, como dias ou até semanas e 50,0 a 100,0 mg L⁻¹ por períodos menores, como segundos ou horas.

Quando a base de microestacas de *Ilex aquifolium* foram imersas em 1 mg L⁻¹ de AIB durante uma semana e posteriormente inoculadas em meio WP isento de AIB, aproximadamente 73% dos brotos enraizaram num período de quatro semanas (Majada et al., 2000).

Kataoka & Inoue (1993) avaliaram o enraizamento *in vitro* de microestacas de *Eugenia javanica* imersas durante cinco segundos em diferentes concentrações de ANA e AIB. Eles observaram que a porcentagem de enraizamento aumentou de acordo com o aumento das concentrações de auxinas utilizadas.

A importância da relação presença e concentração de auxina e tempo de permanência desse regulador de crescimento também foi demonstrada no trabalho realizado por Radmann et al. (2002). Eles avaliaram a capacidade de enraizamento *in vitro* de diferentes porta-enxertos de macieira e concluíram que a permanência das plântulas por 10 dias na presença de ANA, apresentaram maior porcentagem de enraizamento do que aquelas que permaneceram por períodos mais prolongados.

Kotsias & Roussos (2001), realizaram experimentos com *Citrus limon* e maior porcentagem de enraizamento (80%) e maior número de brotos foi

obtido quando a base desses permaneceram por 5 segundos imersos em 1000 mg L⁻¹ de AIB.

Segundo Nodoye et al. (2003) o tempo de permanência, o tipo e a concentração de auxinas também afetaram a indução de raízes adventícias *in vitro* em brotos de *Balanites aegyptiaca*. Estes autores relataram que ocorreu maior porcentagem de brotos enraizados, maior número e comprimento das raízes quando os explantes permaneceram em meio MS por 10 dias em 5 mg L⁻¹ de AIB. Resultados semelhantes foram obtidos com as espécies *Cornus florida*, *Artocarpus lakoocha*, *Withania somnifera* e *Acacia sinuata* (Manickam et al., 2000; Vengadesan et al., 2000; Joshee et al., 2002; Sharma et al., 2005).

Outras espécies têm comportamento diferente quando expostas por tempo prolongado a ação das auxinas. *Limonium wrughtii*, *Rudgea viburnoides*, *Morus alba* e *Calliandra calothyrsus* são bastante exigentes quanto a necessidade de auxina para o enraizamento, necessitando, portanto, permanecerem em contato direto com o meio de cultura contendo regulador de crescimento por tempo prolongado, ou seja, de um a dois meses para que haja o enraizamento de modo satisfatório (Tchigio & Duguma, 1998; Bhau & Wakhlu, 2001; Bonilla, 2002; Aloufa, 2003;).

A grande maioria dos trabalhos mencionados nesse review tem o foco voltado ao estabelecimento do sistema radicular, mas a questão da funcionabilidade não pode ser relegada a segundo plano.

Alguns autores ressaltam que a formação de raízes grossas e/ou calos é indesejável durante esta etapa, visto que podem interferir na funcionabilidade do sistema radicular, comprometendo assim a aclimatização das plântulas e o completo desenvolvimento dos protocolos de micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1998; Compton et al., 2001).

A formação de calos na base das plântulas e a indução de raízes mais grossas tem sido mais frequentemente observada quando estas crescem em meios de cultura suplementado com a auxina ANA, embora o AIA e AIB também possam promovê-los (Grattapaglia & Machado, 1998; Compton et al., 2001). Plantas como *Coleus forskohlii*, *Pistacia vera*, *Salvia sclarea* e *Limonium wrughtii* quando expostas a diferentes concentrações de ANA e AIB formam calos na base dos explantes e conseqüentemente inibem a indução de raízes (Reddy et al., 2001; Onay, 2000; Liu et al., 2000; Aloufa, 2003), entretanto outras como por exemplo *Cyrtanthus clavatus* e *Cyrtanthus spiralis* mesmo quando submetidas a elevada dosagem desses reguladores formam raízes sem a presença de calos (Morán et al., 2003).

Além das auxinas, a adição de citocininas e/ou giberelinas ao meio de cultura, também podem favorecer a o enraizamento adventício (McCown, 1988; Gaspar & Hofinger, 1988; Staden & Harty, 1988;

Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003).

Pereira et al. (2000) obtiveram melhor indução de raízes adventícias *in vitro* em plântulas de *Echinodorus scaber* quando estas foram cultivadas em meio MS suplementado somente com a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na concentração de 1,00 mg L⁻¹.

Associação de citocininas e auxinas também pode ser favorável ao enraizamento de algumas espécies. Isso foi contestado com *Salvia sclarea*, *Ensete ventricosum* e *Acacia mangium*. Nessa última espécie o enraizamento *in vitro* foi obtido quando os brotos alongados permaneceram durante trinta dias em meio MS/2 contendo 2 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de cinetina e posteriormente foram transferidos para meio MS/2 isento de regulador (Liu et al., 2000; Negash et al., 2000; Xie & Hong, 2001).

Apesar dos exemplos mencionados acima, as citocininas também podem ter um efeito inibitório sobre a indução de raízes adventícias *in vitro*; portanto, sua adição ao meio de enraizamento deve ser utilizada indistintamente. Muitas espécies com elevado nível de citocinina endógeno apresentam dificuldade quanto ao enraizamento e portanto, a adição não é recomendada nesta fase (McCown, 1988; Staden & Harty, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998).

Trabalhos realizados com *Betula* mostraram que o enraizamento foi inibido proporcionalmente ao aumento da concentração das citocininas zeatina (ZEA) e isopenteniladenina (2iP) (Assis & Teixeira, 1998) e para muitas espécies de *Prunus*, o enraizamento não ocorreu quando altas concentrações de BAP e AIB foram adicionadas ao meio de enraizamento (Aloufa, 2003).

Além das citocininas, as giberelinas também podem ter uma ação inibitória sobre o enraizamento, por ter uma forte interação com outros hormônios, interferir na atividade de auxinas e inibir a divisão celular associada com a fase de iniciação radicular (Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). Hansen (1988) relata alguns estudos que evidenciam o efeito negativo das giberelinas sobre o enraizamento de plântulas cultivadas *in vitro*, principalmente o GA₃ quando associado a auxinas.

Vitaminas, aminoácidos e outras substâncias

Vitaminas e aminoácidos também podem influenciar igualmente no enraizamento adventício *in vitro* (Bhattacharya, 1988; Chee, 1995; Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003). Chee (1995) relata que a tiamina tem um efeito positivo no desenvolvimento de raízes de *Taxus brevifolia* e *T. cuspidata* e cita alguns trabalhos indicando que esta é sintetizada nas folhas e transportada para as raízes e que a ocorrência da tiamina varia de acordo com as

condições de crescimento da planta.

A formação de raízes adventícias é dependente de regulador de crescimento e também de outras substâncias sinérgicas às auxinas que em geral são sintetizadas nas folhas e se acumulam na zona de regeneração das raízes. O triacontanol é um exemplo desse tipo de substância que pode auxiliar no enraizamento. É um componente natural de cera epicuticular, que tem mostrado um aumento no crescimento vegetativo, teor de clorofila e peso seco de várias espécies de plantas, quando aplicado em condições de campo. O triacontanol está diretamente relacionado com a atividade de genes que regulam o processo de fotossíntese o que pode favorecer a indução de raízes adventícias pelo fornecimento de carboidratos e nutrientes (Horváth et al., 2001).

Em estudos de micropropagação realizados com *Melissa officinales*, *Prunus davidiopersica* e espécies ornamentais lenhosas, o triacontanol tem sido apontado como agente indutor de raízes adventícias (Horváth et al., 2001). Trabalho realizado por Horváth et al., (2001) com *Malus domestica* e *Cerasus fruticosa* também confirma esse resultado. Esses autores mostraram que a adição de triacontanol aumentou efetivamente o número de raízes nas plântulas dessas espécies e foi constatado um aumento no conteúdo de clorofila durante a fase de enraizamento.

Nutrição mineral

Outro aspecto importante a ser considerado na formação de raízes adventícias é a nutrição mineral. Teores adequados de macro e micronutriente especialmente nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e boro, são importantes no processo de enraizamento (Blazich, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Ansari et al., 2004).

Nitrogênio, fósforo, zinco e manganês, são requeridos durante a iniciação das raízes. A importância do N está relacionada com a síntese de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Tem papel importante na produção de triptofano, precursor natural do AIA e de substâncias de reserva. O zinco e manganês influenciam o nível de auxinas endógenas. O cálcio é necessário para o crescimento e desenvolvimento das raízes, visto que a interrupção no suprimento deste, resulta imediatamente na não formação dos primórdios de raízes, e se já formadas, na redução do crescimento e conseqüente morte (Blazich, 1988).

O efeito do boro no enraizamento adventício também tem sido bastante estudado. Este nutriente é requerido tanto durante a fase de iniciação das raízes, quanto durante o crescimento porque é requerido para a manutenção da divisão celular. O boro parece estar relacionado com processos metabólicos, que influenciam diretamente no

enraizamento, como os níveis de auxinas endógenas e a atividade de AIA oxidase. Sua deficiência causa mudanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que podem prejudicar a formação de raízes adventícias (Blazich, 1988; Ono, 1994; Ono & Rodrigues, 1996; Josten & Kutschera, 1999).

O efeito do boro sozinho ou em combinação com reguladores vegetais foi testado em *Heliantus annuus* com objetivo de promover a indução de raízes adventícias. Efeito significativo deste nutriente tanto para a iniciação de raízes quanto no desenvolvimento foi observado a partir de cortes anatômicos. A presença do boro permitiu a obtenção de um significativo número de explantes com raízes (Josten & Kutschera, 1999).

Carboidratos

Além dos nutrientes, os carboidratos também têm efeito sobre a formação de raízes adventícias (Veierskov, 1988; McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Aloufa, 2003). Durante a etapa de enraizamento, quantidades ótimas de carboidratos devem ser consideradas, visto que a sua influência sobre a formação das raízes *in vitro*, está relacionada ao requerimento de energia durante o processo de iniciação radicular (Assis & Teixeira, 1998).

Alguns autores ressaltam que a ação dos carboidratos sobre o enraizamento podem estar intimamente ligados às auxinas. A auxina pode influenciar diretamente no acúmulo basal de carboidratos, como também no aumento de sua concentração (Veierskov, 1988; McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Aloufa, 2003).

No entanto, a relação exata entre auxinas, carboidratos e enraizamento é bastante complexa e o seu completo entendimento ainda é desconhecido e exige estudos mais elaborados neste aspecto (Veierskov, 1988; Aloufa, 2003).

Os carboidratos em si não aumentam a resposta ao enraizamento, e sim são fonte de energia e de carbono para a síntese de substâncias essenciais para a formação de raízes. No meio de cultura também exercem a função de agente osmótico.

Embora haja alguns trabalhos mostrando a superioridade da glicose por exemplo em relação a sacarose, a grande maioria dos trabalhos apontam esta última como a fonte de excelência em termos de carboidrato (Veierskov 1988; Ahée & Duhoux, 1994; Pierik et al., 1997; Nicoloso et al., 2003).

A concentração de carboidrato utilizada nos meios de cultura podem variar de acordo com as fases multiplicação, alongamento e enraizamento, mas em geral são mantidas entre 20 e 30 g L⁻¹ (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa 2003; Souza, 2003).

Isutsa (2004) não obteve diferença quanto a

porcentagem de enraizamento *in vitro* de *Passiflora edulis*, quando utilizou 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose, em ambas concentrações houve 100% de enraizamento. Nos estudos realizados por Leite et al. (2000) com porta enxerto de pereira, maior porcentagem de enraizamento foi obtida com 20 g L⁻¹ de sacarose; entretanto foi a concentração de 30 g L⁻¹ que promoveu maior comprimento de raízes.

Carvão ativado

Outras substâncias como o carvão ativado tem sido adicionadas ao meio de cultura para promover o enraizamento adventício. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), seus efeitos benéficos podem ser físico, já que simula uma condição de escuro, situação mais favorável ao desenvolvimento de raízes adventícias, como também, químico adsorvendo substâncias prejudiciais ao enraizamento, como os compostos fenólicos.

O carvão ativado adsorve componentes do meio de cultura que podem prejudicar o enraizamento, como citocininas e/ou giberelinas residuais e componentes tóxicos inibidores ao enraizamento. Entretanto, pode também adsorver auxinas e nutrientes do meio, necessários ao enraizamento e desenvolvimento normal da parte aérea (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003).

Todavia, é interessante ressaltar que este efeito fixador de auxinas pode ser benéfico. A adição de maiores concentrações desta no meio de enraizamento com carvão ativado, pode dispensar a necessidade da transferência do explante para outro meio isento de auxina, na fase de crescimento das raízes. No entanto, os explantes não devem permanecer muito tempo neste meio, porque a adsorção de nutrientes pode prejudicar o desenvolvimento normal das plântulas.

As concentrações de carvão adicionadas ao meio de enraizamento podem variar de 0,1 a 2% (Grattapaglia & Machado, 1998). Acima deste percentual o seu efeito fixador pode ser significativamente prejudicial (Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003).

De acordo com McCown (1988), o efeito do carvão no desenvolvimento da plântula *in vitro* depende da composição química do meio e do genótipo da planta.

Estudos de multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Acacia mearnsii* realizados em meio MS suplementado com carvão ativado, mostraram a eficiência desse elemento no enraizamento, no desenvolvimento normal da parte aérea e na prevenção de clorose nas folhas (Quorin et al., 2001). Efeito positivo no enraizamento de *Ensete ventricosum* e *Argania spinosa* foram também relatados por Negash et al. (2000) e Bousselmame et al. (2001), respectivamente.

Resultados negativos quanto ao enraizamento em meio contendo carvão ativo foram obtidos para a espécie *Ananas porteanus*, conhecida como abacaxi ornamental. Os resultados mostraram que ocorreu uma redução no tempo de indução, número de raízes e porcentagem de enraizamento (Borges et al., 2001).

Poliaminas

Uma outra classe de substâncias que vêm sendo empregada para estimular o enraizamento adventício *in vitro* são as poliaminas. Consideradas uma nova classe de reguladores de crescimento em plantas superiores, as poliaminas podem ter um efeito bastante benéfico neste contexto, por terem uma importante função no desenvolvimento de raízes primárias, laterais e adventícias (Couée et al., 2004).

As poliaminas são, compostos de baixo peso molecular, encontradas em organismos, podendo ocorrer na forma livre ou conjugada. As poliaminas de ocorrência mais comum são a espermidina, espermina, putrescina, agmatina, ornitina, arginina. A cadaverina é encontrada somente em algumas plantas (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée et al., 2004).

A ação das poliaminas no desenvolvimento de raízes pode estar relacionado à interação com fito-hormônios, e interações bioquímicas inespecíficas a níveis moleculares, visto que a relação existente entre o metabolismo das poliaminas, síntese de etileno e metabolismo de aminoácidos também pode ter um impacto significativo no desenvolvimento de raízes. As poliaminas também são precursoras de alguns alcalóides que podem estar relacionados com o desenvolvimento de raízes, como foi visto em algumas espécies de asteraceae (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée et al., 2004).

O crescimento de raízes primárias e formação de raízes laterais envolvem intensa atividade mitótica e são dependentes de fatores fisiológicos endógenos. Existe uma correlação entre o conteúdo endógeno de poliaminas e o desenvolvimento de raízes, relacionados à atividade de crescimento e diferenciação celular. A formação e o crescimento de raízes primárias, laterais ou adventícias estão relacionados com a atividade dos meristemas apicais e o aumento na síntese de poliaminas (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée et al., 2004).

Durante o desenvolvimento das raízes, ocorre uma modificação significativa nos níveis de poliaminas, ocorrendo um decréscimo dessas substâncias com a inibição do crescimento das raízes, como também durante a senescência. O acúmulo, entretanto, está associado com o crescimento dos tecidos e com a organogênese (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée et al., 2004). Segundo Chen & Kao (1996), níveis de poliaminas e crescimento de plantas estão intimamente relacionados.

Poliaminas associadas ou não com as auxinas podem auxiliar na indução de raízes adventícias em plântulas de várias espécies cultivadas *in vitro*, mas altas doses podem ter efeito tóxico (Sankhla & Upadhyaya 1988; Neves et al., 2002).

O ambiente tem influência direta no aumento ou decréscimo nos níveis de poliaminas. Determinados tipos de estresses ambientais influenciaram na estrutura química e teor de poliaminas acumuladas nos tecidos radiculares o que promove maior ou menor desenvolvimento das raízes (Couée et al., 2004).

Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são substâncias que também podem influenciar positivamente na indução de raízes adventícias, quando atuam como co-fatores de enraizamento, ou negativamente, como no caso das quinonas, que são produtos da oxidação dos fenóis. A presença de quinonas em algumas espécies poder ser um indicativo da necessidade de suplementar o meio de cultura com substâncias anti-oxidantes, como os ácidos ascórbico e cítrico, o polivinilpirrolidone (PVP), dentre outros (Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998).

A ação desses co-fatores está relacionada ao efeito indutor de auxinas, porque estimulam sua síntese e aumentam sua liberação. Eles também podem agir como protetores de auxinas endógenas, servindo de substrato alternativo para a AIA-oxidase.

Vários compostos fenólicos como o floriglucinol, o floridzin, o catecol e os ácidos clorogênico, caféico, florético e felúrico têm sido adicionados a meios de cultura com objetivo de promover o enraizamento (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Lima, 1998; Assis & Teixeira, 1998; Aloufa, 2003). A rizocalina, hormônio indicado para estimular a formação de raízes também é utilizado e atua como um co-fator ou seja um conjugado auxina-fenol (Lima, 1998).

Segundo Aloufa (2003), quando os polímeros de ortho-dihidroxifenóis agem como protetores de auxinas, têm a função de manter os tecidos em um estado reduzido, agindo como antioxidantes e mantendo um baixo potencial redox. Os ortho-dihidroxifenóis específicos (co-fatores de enraizamento) são produzidos nas folhas e brotos e translocados à região de enraizamento, onde, junto com auxinas e polifenoloxidasas, dão origem a um complexo estimulador de enraizamento que conduz à iniciação e crescimento do primórdio radicular. Para a formação do primórdio radicular, o complexo auxina-fenol é sintetizado através de polifenoloxidasas.

A elevação de níveis endógenos de floriglucinol em brotos favorece a iniciação de raízes durante a fase auxina-sensível, tendo uma ação sinérgica com a auxina. Nesse caso, a auxina pode

agir como um protetor do floroglucinol que servirá de substrato alternativo para a AIA peroxidase e/ou oxidase e consequentemente os níveis de AIA endógeno permanecerão elevados (Aloufa, 2003). De modo geral, o floroglucinol aumenta o índice de enraizamento, provavelmente pela influência no metabolismo da auxina. Frequentemente é usado em combinação com auxinas, no entanto, os resultados obtidos com essa associação são diversos entre as espécies, inibindo ou favorecendo o enraizamento adventício (Lima, 1998). Segundo Grattapaglia & Machado (1998) as diferenças de resultados, quanto a ação de fenóis sobre a indução de raízes adventícias *in vitro* estão relacionadas aos fatores genéticos, condições fisiológicas da planta e ao tempo de exposição dos explantes à ação de fenóis e auxinas.

McCown (1988) relata que o efeito dos compostos fenólicos floroglucinol e floridzin, são sinérgicos com auxinas, porém a resposta é dependente do genótipo e de pré condições da cultura. O ácido clorogênico tem efeito sinérgico com o AIA em condições de luz.

Ibañez & Amo-Marco (1998) relataram vários estudos realizados *in vitro* mostrando que a adição de floroglucinol estimulou a iniciação de raízes em maçã ou cereja e também estimulam o desenvolvimento de brotos nessas espécies.

Quando Lima (1998) estudou a ação de fenóis sozinhos ou em combinação com auxinas na indução de raízes adventícias *in vitro* em plântulas de *Eucalyptus grandis* observou que os resultados foram diferentes quanto ao tipo de fenol e/ou presença ou ausência de auxina. De um modo geral, o floroglucinol induziu o enraizamento na ausência de auxina. O floroglucinol e o ácido clorogênico favoreceram o número de raízes e o ácido caféico e a hidroquinona mostraram maiores médias para comprimento das raízes.

O efeito do floroglucinol como promotor de crescimento e desenvolvimento de brotos apicais foi testado em seis genótipos de batata, em combinação com duas concentrações de sacarose. O floroglucinol favoreceu a formação de brotações múltiplas, promoveu a proliferação dos brotos axilares e estimulou a formação de raízes (Sarkar & Naik, 2000).

Embora as substâncias fenólicas tenham importante papel no enraizamento de plântulas *in vitro* há algumas, principalmente as produzidas pelos explantes e liberadas para o meio de cultura na fase de multiplicação, que são consideradas inibidoras do enraizamento. Esses compostos fenólicos provocam um escurecimento na superfície de corte dos explantes e difundem-se para o meio de cultura e inibem o processo de rizogênese.

Condições ambientais

Fatores ambientais relacionados a condições de crescimento das culturas *in vitro* também

influenciam igualmente no enraizamento. A intensidade luminosa e a presença ou ausência de luz interferem no enraizamento, uma vez que têm efeito direto ou indireto sobre a produção de açúcar, auxinas, fenóis e enzimas endógenas, particularmente peroxidase. Para algumas espécies a redução da luz pode favorecer a estiolação do caule o que estimula a indução de raízes adventícias (Brian & Bassuk, 1988; McCown, 1988; Aloufa, 2003).

Nos estudos de propagação *in vitro* realizados por Anand & Rao (2000) com *Piper barberi*, plantas cultivadas no escuro tiveram maior porcentagem de enraizamento e maior número de raízes do que aquelas cultivadas na presença de luz. Resultados semelhantes foram obtidos com *Quercus robur* (Pierik et al., 1997).

Para outras espécies como pereira, o aumento da intensidade luminosa favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular (Leite et al., 2000).

Condições de luz e escuro também foram estudadas no enraizamento *in vitro* de diferentes espécies de *Citrus* sp. Houve variações evidentes entre os genótipos, presença ou ausência da auxina e condições de iluminação. Para *Citrus aurantium* os resultados não diferiram significativamente entre luz, escuro e presença ou ausência de ANA. Para a espécie *Citrus macrophylla* e *C. sinensis*, a necessidade de luz para o enraizamento foi evidente; mais de 60% das plântulas enraizaram na presença de luz (Leite et al., 2000).

De acordo com Leite et al. (2000) o aumento da intensidade luminosa durante os últimos estágios da fase de enraizamento pode facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência das plântulas, uma vez que estimula a fotossíntese, o aumento da cera epicuticular e a melhoria da relação hídrica.

Outro fator físico a ser considerado no enraizamento de plântulas cultivadas *in vitro* é a temperatura. De modo geral a temperatura ambiente da sala de crescimento, pode variar entre a faixa de 20 e 30°C (Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003) e de modo geral não interferem no enraizamento. Trabalhos realizados por Corrêa & Fett-Neto (2004) com *Eucalyptus saligna* e *E. globulus* mostraram que a temperatura não influenciou na porcentagem de enraizamento, mas o número e o comprimento das raízes variaram de acordo com as diferentes temperaturas testadas.

De acordo com os trabalhos mencionados neste review, nota-se que muitos fatores estão relacionados à formação de raízes adventícias *in vitro*, como o genótipo, a juvenilidade, os níveis endógenos de auxina, compostos nitrogenados, compostos fenólicos e carboidratos, a condição nutricional da planta, a composição e condição do meio de cultura, a necessidade da suplementação do meio com auxina

exógena, o tempo de permanência da plântula neste regulador, a presença de outros reguladores de crescimento como citocininas e/ou giberelinas, dentre outros.

Muitos trabalhos cujo foco é o enraizamento *in vitro* têm sido realizados com grande êxito, entretanto, para um número significativo de espécies, as condições ótimas de enraizamento ainda não foi encontrada, apesar de numerosos experimentos realizados, levando em consideração todos os fatores acima mencionados.

A completa elucidação dos mecanismos envolvidos no enraizamento *in vitro* ainda não foi obtida, portanto os trabalhos realizados com a cultura de tecidos, com enfoque bioquímico, objetivando o enraizamento são contribuições valiosas que no futuro poderão viabilizar o completo estabelecimento de protocolos de micropropagação de plantas com potencial econômico, ecológico e terapêutico.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AHÉE, J.; DUHOUX, E. Root culturing of *Faidherbia-Acacia albida* as a source of explants for shoot regeneration. **Plant Cell and Organ Culture**, v.36, p.219-25, 1994.
- ALMEIDA, J.L. et al. Indução de enraizamento na micropropagação de urucueiro. **Revista da Faculdade de Agronomia (Maracay)**, v.21, p.129-35, 1995.
- ALOUFA, M.A.I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p.3-5.
- ANAND, A.; RAO, C.S. A rapid propagation protocol for *Piper barberi* Gamble, a critically endangered plant. In **Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.36, p.61-6, 2000.
- ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urudueval* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-80, 2000.
- ANSARI, S.A.; SINGH, S.; RANI, A. Inorganic salts influence IAA ionization and adventitious rhizogenesis in *Pongamia pinnata*. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.117-20, 2004.
- ARIKATI, N.A. et al. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v.100, p.193-202, 2004.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.261-96.
- BERTOLUCCI, S.K.V. et al. Micropropagação de *Tounefortia paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.1, p.43-9, 2000.
- BHATT, I.D.; DHAR, U. Combined effect of cytokinins on multiple shoot production from cotyledonary node explants of *Bahinia vahlii*. **Plant Cell and Organ Culture**, v.62, p.79-83, 2000.
- BHATTACHARYA, N.C. Enzyme activities during adventitious formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.88-101.
- BHAU, B.S.; WAKHLU, A.K. Effect of genotype, explant, type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell and Organ Culture**, v.66, p.25-9, 2001.
- BLAZICH, F.A. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.132-149.
- BLAZICH, F.A. Mineral nutrition and adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.61-9.
- BONILLA, M.G.O. **Propagação in vitro, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH.** 2002. 262p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; LUIS-GARCIA, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**, v.86, p.159-66, 2000.
- BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; LIMA, R.N. **Multiplicação e enraizamento in vitro de brotos de abacaxi ornamental *Ananas porteanus* Hort Veirch ex c. Koch.** Brasília: Embrapa, 2001. 5p. (Recomendação técnica, 25).
- BORTHAKUR, M. et al. Micropropagation of *Eclipta alba* and *Eupatorium adenophorum* using a single-step nodal cutting technique. **Plant Cell and Organ Culture**, v.62, p.239-42, 2000.
- BOSA, N. et al. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, 510-3, 2003.
- BOUSSELMANE, F.; KANNY, L.; CHLYAH, H. Optimisation des conditions de culture pour l'enracinement *in vitro* de l'arganier (*Argania spinosa* L.). **Life Sciences**, v.324, p.995-1000, 2001.
- BRIAN, K.M.; BASSUK, N.L. Etiolation and banding effects on adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.30-46.
- CATAPAN, E.; OTUKI, M.F.; VIANA, A.M. *In vitro* culture of *Phyllanthus carolinensis* (Euphorbiaceae). **Plant Cell and Organ Culture**, v.62, p.195-202, 2000.
- CENTELLAS, A.Q. et al. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.2, p.181-6, 1999.
- CHATURVEDI, R.; RAZDA, M.K.; BHOJWANI, S.S. In vitro clonal propagation of na adult tree of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by forced axillary branching. **Plant Science**, v.166, p.501-6, 2004.
- CHEE, P.P. Stimulation of adventitious rooting of *Taxus* species by tiamine. **Plant Cell Reports**, v.14, p.753-7, 1995.
- CHEN, S.J.; KAO, C.H. Polyamines in relation to amonium-inhibited growth in suspension-cultured rice cells. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.37, p.197-200, 1998.
- CHEN, C. et al. Adventitious shoot regeneration from stem

- internode explants of *Adenophora triphylla* (Thunb.) A. DC. (Campanulaceae): an important medicinal herb. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.42, p.1-7, 2001.
- COMPTON, M.E.; PIERSON, B.L.; STAUB, J.E. Micropropagation for recovery of *Cucumis hystrix*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.64, p.53-67, 2001.
- CORRÊA, L.R.; FETT-NETO, A.G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, v.29, p.315-24, 2004.
- COUÉE, I. et al. Involvement of polyamines in root development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p.1-10, 2004.
- COUTINHO, L.M. O bioma cerrado. In: KLEIN, A.L. **Eugen warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora Unesp; Imprensa Oficial do Estado, 2002. 156p.
- CUENCA, S.; AMO-MARCO, J.B. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.36, p.225-9, 2000.
- CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia Agricola**, v.53, n.1, p. 1996.
- DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, 315p.
- DAVIS, T.D.; SANKHLA, N. Effect of shoot growth retardants and inhibitors on adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.174-84.
- EBRAHIM, M.K.H.; IBRAHIM, I.A. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. **Scientia Horticulturae**, v.86, p.211-21, 2000.
- FILHO, C.F.D. **Morfologia vegetal**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 243p.
- FORD, Y.Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v.10, p.1-11, 2001.
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.117-31.
- 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.43-76.
- GUARIM NETO, G.; MORAIS, R.G. Recursos Medicinais de espécies do cerrado do Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.4, p.561-84, 2001.
- GUPTA, S.K.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science**, v.81, n.2, p.106-10, 2001.
- HACKETT, W.P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.11-28.
- HAISSIG, B.E.; RIEMENSCHNIEDER, D.E. Genetic effects and adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.47-60.
- HASEN, J. Influence of Gibberellins on Adventitious Root. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.162-73.
- HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.2, p.462-7, 2001.
- HOVÁRTH, G. et al. Triaccontanol-sipported micropropagation of woody plans. **Plant Cell Reports**, v.20, p.16-21, 2001.
- IBAÑEZ, M.R.; AMO-MARCO, J.B. Promotion by phloroglucinol of micropropagation of *Minuartia valentina* an endangered and endemic apanish plant. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.49-56, 1998.
- ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora adulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v.99, p.395-400, 2004.
- JOSHEE, N. et al. Lakoocha: a multipurpose tree of warm climate. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Eds.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p.405-7.
- JOSHI, M.; DHAR, U. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. – an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. **Plant Cell Reports**, v.21, p.201-8, 2003.
- JOSTEN, P.; KUTSCHERA, U. The micronutrient boron causes the development od adventitious roots in sunflower cuttings. **Annals of Botany**, v.84, p.337-42, 1999.
- KADOTA, M.; NIIMI, Y. Improvement of micropropagation of japanese yam using liquid and gelled medium culture. **Scientia Horticulturae**, v.102, p.461-6, 2004.
- KATAOKA, I.; INOUE, H. Micropropagation of Java apple (*Eugenia javanica* Lam.). **Japan Journal of Tropical Agriculture**, v.37, n.3, p.209-13, 1993.
- KOTSIAS, D.; ROUSSOS, P.A. Investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. **Scientia Horticulturae**, v.89, p.115-28, 2001.
- LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.353-7, 2000.
- LEONARDI, C.; RUGGERI, A.; MALFA, L.S. Hormone effects on *in vitro* proliferation and rooting of *Grevillea* explants. **Scientia Horticulturae**, v.90, p.335-41, 2001.
- LIMA, C.C.M. **Uso de aditivos e cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro***. 1998. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- LIMA, E.C. **Indução e enraizamento *in vitro* de brotações em segmentos nodais de sangra d'água**. 2004. 71p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- LIU, W. et al. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v.36, p.201-6, 2000.
- LOPES, S.C. et al. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, v.7, n.1, p.124-8, 2001.
- MAJADA, J.P. et al. Micropropagation of *Ilex aquifolium* L. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**,

- v.36, p.521-6, 2000.
- MANICKAM, V.S.; MATHAVAN, R.E.; ANTONISAMY, R. Regeneration of Indian ginseng plantlets from stem callus. **Plant Cell and Organ Culture**, v.26, p.181-5, 2000.
- MARTIN, K. Parid *in vitro* multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour.: a rare rheophytic woody medicinal plant. **Plant Cell Reports**, v.21, n.5, p.415-20, 2003.
- MAYNARD, B.K.; BASSUK, N. L. Etiolation and banding effects on adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, v.2, p.29-46, 1988.
- McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.289-302.
- MORÁN, G.P. et al. Mass propagation of *Cyrtanthus cavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. **Scientia Horticulturae**, v.98, p.49-60, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.1, p.437-96, 1962.
- NEGASH, A. et al. *In vitro* regeneration and micropropagation of enset from Southwestern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.62, p.153-8, 2000.
- NEVES, C. et al. Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. **Plant Physiology Biochemistry**, v.40, p. 1071-80, 2002.
- NICOLOSO, F.T. et al. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng braileiro (*Paffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.
- NODOYE, M.; DIALLO, I.; GASSAMA, Y.K. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **Africam Journal of Biotechnology**, v.2, n.11, p.421-4, 2003.
- OLIVEIRA, A.F. et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob o efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.117-25, 2003.
- ONAY, A. Micropropagation of pistachio from mature trees. **Plant Cell and Organ Culture**, v.60, p.159-62, 2000.
- ONO, E.O. **Efeitos de reguladores de crescimento e ácido bórico no enraizamento de estacas caulinares de algumas variedades de kiwi (*Actinidia chinensis* Pl.)**. 1994. 249p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Botânica)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83p.
- PANAIA, M. et al. Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.63, p.23-9, 2000.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.
- PEREIRA, A.M.S. et al. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell and Organ Culture**, v.60, p.47-53, 2000.
- PEREIRA, F.D. et al. Propagação *in vitro* de chapéu-de-coura (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ.), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.74-80, 2000.
- PIERIK, R.L.M.; OOSTERKAMP, J.; EBBING, M.A.C. Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robur* 'Fastigiata'. **Scientia Horticulturae**, v.71, p.87-92, 1997.
- PINTO, J.E.B.; LAMEIRA, O.A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.
- POLANCO, M.C.; RUIZ, M.L. Factors that effects plant regeneration from *in vitro* culture of immature seeds in four lentil cultivars. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.66, p.133-9, 2001.
- PRETO, F.R.; SANTAREM, E.R. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.62, p.107-13, 2000.
- QUORIN, M. et al. Multiplication of juvenile black wattle by micro cuttings. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.66, p.199-205, 2001.
- RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J.C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.157-63, 2002.
- REDDY, P.S.; RODRIGUES, R.; RAJASEKHARAN, R. Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlii* from leaf derived callus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.66, p.183-8, 2001.
- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180p.
- ROGALSKI, M. et al. Enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.293-6, 2003.
- ROTUNDO, J.C. **Efeitos de concentrações de nitrato de amônio na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell e *Eucalyptus citriodora* Hook**. 1993. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ROUSE-MILLER, J.; DUNCAN, J.E. *In vitro* propagation of *Artocarpus altipis* (PARK.) FOSBERG (BREADFRUIT) from mature plant material. **In Vitro Cellular & Development Biology – Plant**, v.36, p.115-7, 2000.
- SANKHLA, A.; UPADHYAYA, A. Polyamines and adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.289-302.
- SARKAR D.; NAIK, P.S. Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.139-49, 2000.
- SHARMA, A.R. et al. *In vitro* adventitious rooting of *Cornus florida* micro shoots. Short communication. **Scientia Horticulturae**, v.103, p.381-5, 2005.
- SOUZA, A.V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) MART**. 2003. 127p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SOUZA, A.V. et al. Enraizamento *in vitro* de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.1, p.86-91, 2004.
- SREEKUMAR, S.; SEENI, S.; PUSHPANGADAN, P.

Micropropagation of *Hemidescus indicus* for cultivation and production of 2-hydroxy 4-methoxy benzaldehyde. **Plant Cell and Organ Culture**, v.62, p.211-8, 2000.

STADEN, J.V.; HARTY, A.R. Cytokinins and adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.185-201.

SYROS, T. et al. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.69-77, 2004.

TAWFIK, A.A.; NOGA, G. Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem explant of cumin. **Plant Cell and Organ Culture**, v.66, p.141-7, 2001.

TCHIGIO, I.; DUGUMA, B. Vegetative propagation of *Calliandra calothyrsus* (Meissner). **Agroforestry System**, v.40, p.275-81, 1998.

TCHOUNDJEU, Z. et al. The role of vegetative propagation

in the domestication of *Pausinystalia johimbe* (K. Scum), a highly threatened medicinal species of West and Central Africa. **Forest Ecology and Management**, v.188, p.175-83, 2004.

VENGADESAN, G. et al. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. **Plant Cell and Organ Culture**, v.61, p.23-8, 2000.

VEIERSKOV, B. Relations between carbohydrates and adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988, v.2, p.70-8.

WHITE, P.R. Vitamin B₁ in the nutrition of excised tomato roots. **Plant Physiology**, v.12, p.803-11, 1937.

XIE, D.; HONG, Y. *In vitro* regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis. **Plant Cell and Organ Culture**, v.66, p.167-73, 2001.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and affect of antibiotics on proliferation. **Plant Growth Regulation**, v.15, p.55-67, 1994.