

## Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções.

Aloufa, Magdi Ahmed Ibrahim<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)- Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia, Campus Universitário Lagoa Nova, Caixa Postal 1524, CEP 59072-970, Natal, Rio Grande do Norte, fone: (84) 3211-9205, email: [magdi-aloufa@bol.com.br](mailto:magdi-aloufa@bol.com.br);

### INTRODUÇÃO

Por muitos anos, espécies lenhosas foram consideradas materiais difíceis para estudos *in vitro*. Durante os últimos anos, porém, tremendo progresso foi feito neste campo (Bonga & Durzan, 1982). Uma técnica de propagação rápida é altamente desejável quando o método tradicional *in vivo* de propagação vegetativa está muito lento ou improdutivo, e quando o número de mudas disponível é limitado.

A propagação de cultivares *in vitro* torna possível produzir árvores enraizadas que, caso contrário, não enraizariam *in vivo*. Não obstante, estacas permanecem importantes. A propagação rápida de estacas clonadas via métodos *in vitro* pode superar as dificuldades relacionadas a mudanças sazonais, idade e base genética das plantas-mãe.

Para propagação próspera em larga escala, devem ser superadas três dificuldades principais: (a) estabelecimento de explantes primários em cultura, (b) desenvolvimento de meios ótimos de cultura e condições ambientais para alcançar alta taxa de multiplicação (c) indução de iniciação de raiz e aclimação dos propágulos depois de transferência para o solo. Embora o progresso seja considerável em relação a estas fases, o enraizamento permanece um problema principal na propagação de fruteiras.

A presente revisão enfoca a indução de raiz em estacas de fruteiras decíduas. Apenas, então, serão mencionadas as características mais importantes da micropropagação de fruteiras.

### FORMAÇÃO DE RAIZ ADVENTÍCIA *IN VIVO*

A habilidade dos tecidos vegetais para formar raízes adventícias depende de interações de fatores endógenos e exógenos. O papel de auxinas no desenvolvimento de raiz foi revisado por Scott (1972) e é um fato bem conhecido que auxinas são os fatores principais envolvidos na formação da raiz. Na complexidade do enraizamento, foi prestada também atenção a carboidratos (Nanda & Jain, 1972), lactones terpênicos (Shibaoka et al., 1967), compostos lipídicos (Heuser & Hess, 1972) e ácido abscísico (Basu et al., 1970). De acordo com Bouil-lenne (1964) ortho-dihydroxyphenols específicos (co-fatores de enraizamento) são produzidos nas folhas e brotos e translocados à região de enraizamento onde, com auxina e polyphenoloxidasas, e dão origem a um complexo estimulador de enraizamento que conduz à iniciação e crescimento de primórdio de raiz.

Alguns dos protetores de auxinas são polímeros de ortho-dihydroxyphenol, e a função principal deles é manter os tecidos em um estado reduzido, i.e., eles agem como antioxidantes e assim mantêm um baixo potencial de redox, uma condição associada com a juvenildade (Stonier et al., 1970).

O processo de formação de raiz adventícia pode ser dividido em duas fases: a iniciação de primórdio seguindo ferimento, e a fase de aparecimento de raiz e crescimento. É considerado (Bonner, 1965) que na primeira fase, IAA age como ativador de gene, i.e., alavancando a formação precoce de primórdio de raiz. Foi proposto por Ryugo & Breen (1974) que o papel principal do IBA (a auxina indutora de raiz mais efetiva na propagação convencional) é favorecer a conjugação entre IAA endógeno e aminoácidos que conduzem à síntese das proteínas específicas necessárias para a formação de raízes iniciais. Para a formação de primórdio de raiz, o complexo auxina-fenol é sintetizado através de polyphenoloxidase (Haissig, 1974). Bassuk et al. (1981) comparou a atividade de co-fatores

extraídos de estacas de maçã e sintetizados *in vitro*, e ambos natural e sintetizado promoveram enraizamento.

Na região de indução excessiva de raízes, a proliferação de raízes novas é bloqueada por inibidores formados nos ápices radiculares (Torrey, 1959) e também foi mostrado que nem todos os primórdios iniciados depois de tratamento com auxina desenvolvem-se em raízes emergentes (Mitsuhashi-Kato et al., 1978). Para alongamento de raiz, não é requerida, normalmente, auxina exógena ou pode até ter ação inibitória (Mohammed & Eriksen, 1974; Mitsuhashi-Kato et al., 1978).

## FATORES QUE AFETAM A INDUÇÃO DE RAIZ EM PROPÁGULOS DE FRUTEIRAS IN VITRO

A literatura sobre o tema mostra que o refinamento dos meios de cultura como também a determinação de ótimas condições ambientais para diferentes estacas e cultivares permanecem os objetivos principais, e tendências para estudar a base bioquímica e fisiológica têm uma importância considerável.

## COMPOSIÇÃO DO MEIO NUTRIENTE

### SAIS MINERAIS E PH

Publicações interessantes a respeito de enraizamento de brotos de *Prunus* sugere que os macroatomtos de Murashige-Skoog + microatomtos de Heller sejam usados (Quoirin et al., 1977). Os macros e microatomtos de Murashige-Skoog (MS) também eram normalmente os componentes dos meios usados (Mehra & Mehra, 1974). Depois, a concentração dos macroatomtos desta fórmula foi abaixada a 1/2, 1/3 ou 1/4, o que foi mais benéfico (Quoirin et al., 1977). Um meio novo, desenvolvido por Quoirin & Lepoivre (Quoirin et al., 1977), contém 1/4 de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> da fórmula de MS e 1200 mg/l de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Para enraizamento, concentrações relativamente altas de cálcio e nitrogênio são essenciais (Tripathi, 1971). Aumentar o conteúdo de Ca não teve nenhum efeito estimulatório no enraizamento de Cereja, Ameixa e Marmelo (G. Németh, 1978). Para enraizamento de pêsego, é chamada atenção a P, Mg, Ca e conteúdo de S (Bini & Sanesi, 1982). Meios com baixa concentração salina, como a de solução de White e Knop também foram aplicados (Tabachnik & Kester, 1977). Cheng (1978) desenvolveu um meio para maçã, pêra, ameixa e cereja. G. Németh (1978) encontrou que o meio de Dudits et al. (1975) é melhor que o de Boxus ou a fórmula de MS. Para enraizamento de maçã, cereja, ameixa e marmelo, este autor encontrou depois melhor o meio de Quoirin-Lepoivre diluído pela metade, com mistura de vitaminas modificada (G. Németh 1981). Bom enraizamento foi obtido com o meio de Linsmaier-Skoog (Aynsley, 1978), Bourgin - Nitsch's (Rugini & Verma, 1982). Em vez de Fe-EDTA, vários autores usaram FeNaEDTA (Jones et al., 1977a, b).

Boxus (1971) encontrou um pH mais baixo (5.0) melhor para culturas de *Prunus*. Cerejas também enraizaram a pH 5.3 - 5.8 (Feucht & Dausend, 1976) e ameixa a pH 5.0-5.9 (Németh, 1979).

### VITAMINAS E AMINOÁCIDOS

A mistura de vitamina mais simples é a de Jones et al. (1977 a), contendo só thiamine-HCl e myo-inositol. Enraizamento próspero da maioria das fruteiras mostra que a fórmula de vitamina do meio de MS é satisfatória. As vitaminas do grupo B são bastante satisfatórias. O meio usado por G. Németh (1979) provou ser melhor para crescimento e enraizamento de culturas de maçã, cereja, híbrido pêsego x amêndoa, ameixa e marmelo que o de Jones et al. (1977a). Mudando o componente de vitamina do meio de Quoirin-Lepoivre pelos de Dudits et al. (1975) resultou em hábito de crescimento melhor das plantas (G. Németh, 1981). Esta mistura também contém glutamina e ácido ascórbico. O papel do último é atuar como um antioxidante, prevenindo o escurecimento do meio de cultura ao redor do tecido. O

uso de ácido ascórbico também foi informado por outros (Skirvin & Chu, 1977).

Os efeitos de bases de ácidos nucleicos como adenina, citosina, guanina e timina também foram investigadas: 1 mg/l de adenina, 1 ou 5 mg/l de citosina promoveram formação de raiz significativamente em cereja (Jordan et al., 1982). G. Németh (1979) não observou nenhuma estimulação do enraizamento através de 40 mg/l de adenina em culturas de cereja, ameixa e marmelo.

#### FONTE DE CARBONO

A maioria das experiências foi administrada com 20 - 30 g/l de sacarose no meio, como a fonte de energia principal e agente osmótico. Clones de mutante de cereja F12/1 foram enraizados até mesmo a 50 mg/l de sacarose (Ancora et al., 1982). O alongamento e enraizamento de cereja azeda em meio livre de hormônio dependeram da presença de sacarose (20 mg/l) e a omissão disto suprimiu o enraizamento completamente (Snir, 1983). A redução do conteúdo de sacarose para 10-15g/l era mais benéfica para algumas espécies (Aynsley, 1978). Este autor observou inibição ou nenhuma indução de raiz sem açúcar.

Os melhores resultados para mono e polissacarídeos foram obtidos com frutose com ou sem glicose + sacarose, e galactose+lactose com ou sem sacarose (Minotta, 1981).

#### ÁGAR

A concentração de Agar em experimentos de enraizamento varia de 0 (meio líquido) a 0.9%; o habitual é 0.6-0.8%. Diminuir o conteúdo de Agar faz a disponibilidade de nutrientes e hormônios melhorar, mas aumenta o problema de evaporação de água. Uma vez que o Agar geralmente serve para apoiar os propágulos, Anderson (1978) considera que sua concentração deveria ser tão baixa quanto possível. Tabachnik & Kester (1977) encontraram 0.7 - 0.8% de Agar ser crítico para o enraizamento de amêndoa. Boxus (1978) e Constantine (1978) chamam atenção ao fato de que o inóculo deveria ter um bom contato com o meio. Abaixando o conteúdo de Agar a 5 - 6 g l<sup>-1</sup> resultou em melhora no enraizamento de ameixa (Skirvin et al., 1980). G. Németh (1978) observou vitrificação das folhas a 0.5% e em meio líquido. Formação de primórdio de raiz tinha êxito em maçã em meio agitado, mas não em meio líquido estacionário (Sriskandarajah & Muilins, 1981).

Para amêndoa, meio líquido sem auxina e vermiculita estéril era usado como um apoio (Tabachnik & Kester, 1977).

#### CARVÃO ATIVO

Carvão ativo (AC) é considerado importante pela sua influência através da absorção de componentes tóxicos liberados pelo inóculo (Fridborg et al., 1978). Nos experimentos de enraizamento, AC era aplicado junto com auxina. A adição de 0.5% AC em meios durante o estágio de alongamento (antes de enraizamento) não melhora a taxa de enraizamento em culturas de *Prunus* (Quoirin et al., 1977). Em culturas de marmelo e ameixa em meio de Quoirin-Lepoivre modificado com 500mg/l de AC inibiu significativamente a porcentagem de enraizamento, e diminuiu o número de raízes por planta (G. Németh, não publicado). Também foram observadas cloroses e diminuição marcante da freqüência de plantas enraizadas em ameixa e cereja (Snir, 1983), considerando que com estacas de maçã 100% enraizaram e uma influência positiva no comprimento da raiz foi observada (Cheema & Sharma 1983). A inibição pode ser devido à absorção parcial de auxinas e outros nutrientes (Weatherhead et al., 1979).

#### COMPOSTOS FENÓLICOS

Estimulação ou inibição da iniciação de raiz através de compostos fenólicos são devido à interação deles com auxinas. Foram realizados estudos com Phlorizin (PZ) e phloroglucinol (PG) e seus efeitos no enraizamento, visto que Jones (1976) mencionou o efeito

estimulatório deles no crescimento de caule e formação de raiz em macieira. A utilização de PG a 162 mg/l aumentou a frequência de enraizamento e número de raízes em culturas de cereja F12/1 e ameixa Pixy (Jones & Hopgood, 1979a). Estudo anatômico de raízes e folhas revelou que PZ e PG promoveram desenvolvimento de xilema e cloroplastos, mas este fenômeno não foi relacionado com pyrogallol, catechol e ácido caféico (Jones et al., 1978). Também foi mostrado que (James & Thurbon, 1981a, b) isso elevou níveis de PG endógeno no broto e favoreceu a iniciação de raiz durante a fase auxina-sensível e teve uma ação sinérgica com auxina, dependendo do tempo de exposição (James & Thurbon, 1979a, b). Esta ação é explicada de certo modo pelo papel de auxina - protetor de PG que pode agir como substrato alternativo para peroxidase e/ou de IAA - oxidase, e isto conduz a níveis elevados de IAA endógeno. O efeito sinérgico entre auxina e PG também foi influenciado pela de luz, mas não pela temperatura em uma gama de 22° -29°C (James, 1983a). Para isto foi mostrado que culturas de Ameixa Pixy mantidas no escuro precisavam de PG na fase de multiplicação, durante a mudança do estágio autotrófico para o heterotrófico (Jones et al., 1981). Quoirin et al. (1977) informou uma promoção leve como também inibição de enraizamento em espécies de *Prunus* quando PG estava presente durante a fase de alongamento. Em cereja azeda, Snir (1983) também observou inibição em meio de enraizamento que contém 162 mg/l de PG. Em ameixa *Pixy*, estimulação foi observada também por Aynsley (1978). Phorozin não melhorou enraizamento de microestacas de pêsego (Mosella Chancel e Macheix 1979). Zimmermann & Broome (1981) observaram que PG não era essencial para o enraizamento de cultivares de maçã. Em várias experiências G. Németh não encontrou nenhum efeito de PG com estacas de maçã, entretanto inibição leve foi observada em Marmelo e Cereja, e PG era inibitório para ameixa e híbridos de pêsego. Os resultados contraditórios podem ser explicados pelas diferenças entre clones e/ou espécies, pelo estado fisiológico de material, por exemplo, idade, pré-condicionamento e tempo de exposição ao PG e auxina (Zimmermann, 1983a, b).

Outros tipos de fenólicos foram experimentados para enraizamento como possíveis auxina-sinergistas. Hydroquinone, catechol e pyrogallol isolados não tiveram nenhum efeito em enraizamento, e com IAA só pyrogallol aumentou o número de raízes para cultura de Maçã (James & Thurbon, 1979b). Não foram encontrados nenhum efeito positivo de ácido clorogênico e ácido salicílico com cereja azeda (Popov et al., 1976). Em culturas de hipocótilo de cereja doce, o ácido clorogênico inibiu a formação de raiz (Jordan et al., 1980), considerando que com ameixa foi encontrado um aumento significativo de enraizamento na presença de luz (Hammerschiag, 1982a). Quercetin & Rutin aumentaram significativamente a porcentagem plântulas enraizadas de pêsego quando presentes durante a fase de iniciação

## REGULADORES DE CRESCIMENTO

**Auxinas.** Na prática de micropropagação, normalmente são usadas a auxina natural IAA e auxinas sintéticas NAA e IBA para enraizamento. Jones et al. (1977a) usou IBA em suas experiências. Auxinas isoladas ou com citocininas, GA<sub>3</sub>, ABA e fenólicos mostram seus efeitos principalmente durante a indução de raiz e iniciação. A determinação de formação de broto/raiz é geralmente dependente na relação de citocinina/auxina no meio nutritivo, porém o equilíbrio crítico de reguladores de crescimento deve estar no próprio tecido que forma o órgão. O nível endógeno é regulado por atividade de IAA-oxidase/peroxidase, e de acordo com a hipótese de Lee & Skoog (1965) o aumento de atividade antes da iniciação de formação de órgão indica a baixa exigência de auxina de endógena pelo tecido provocar uma relação de auxina/citocinina satisfatória. Tecidos com formação de raiz são ricos em peroxidases (Van Hoof & Gaspar, 1976). Durante enraizamento, acontecem mudanças nos padrões de isoperoxidase: um aumento contínuo em número e intensidade de peroxidases anódicas e aumenta a intensidade de isoperoxidases catódicas até um máximo, então seguido por uma diminuição. Gaspar et al. (1977) interpretou estas mudanças como indicando um processo de lignificação e uma exigência de fase dupla para auxinas endógenas: (I) redução de auxina durante indução de raiz (nenhuma mudança histológica é

observada) e (2) aumento em auxina durante iniciação de raiz (início de formação de primórdios radiculares). O período Indutivo em culturas de *Prunus* correspondeu à fase de alongamento do broto sem reguladores de crescimento exógenos ou só com GA<sub>3</sub> (Quoirin et al., 1974). Conveniência de isoperoxidases e conteúdos de fenólicos endógenos como marcadores bioquímicos para as fases distintas de indução e iniciação foram mostrados para maçã Jonagold por Druart et al. (1982).

**Citocininas.** Em muitas espécies de plantas foi mostrado que a ótima formação de raiz aconteceu na presença de auxinas e citocininas (Dudits et al., 1975). Muitas espécies de *Prunus* não enraizavam quando altas concentrações iguais de BA e IBA estavam presentes no meio (Boxus & Quoirin, 1974). A maioria de documentos informou enraizamento só de fruteiras com auxina. Em segmentos de talo de *P. avium* e *P. Pseudocerasus*, baixa frequência de formação de raiz aconteceu em relações diferentes de IBA/BA e NAA/BA (Feucht & Dausend, 1976). O melhor enraizamento em cerejas azedas foi obtido com BA+IBA (Ponchia & Roselli 1980). Junto com NAA ou IAA, 0.1mg/l kin aumentou significativamente a frequência de enraizamento em segmentos de hipocótilo de cereja (Jordan et al., 1980). Enraizamento de brotos de cereja foi observado respectivamente com 0.1 e 1mg/l BA até 70 - 100% e 20%, mas não foi considerada uma estimulação, desde que em meio hormônio-livre a mesma frequência foi encontrada (Lineberger, 1983). Foi observada estimulação de enraizamento em cereja, ameixa, pêssego X amêndoa através de 1 µM de BA, e em marmelo através de 5 µM BA em luz contínua, mas esta estimulação não foi achada com 2iP, Kin ou zeatina (G. Németh 1978, 1979). A frequência de enraizamento era mais baixa que com IBA e era aproximadamente igual à com NAA, NOA ou IAA. Em cereja, Wilkins e Dodds (1982) observaram formação de raiz depois de 6-10 semanas em meio rico em citocinina (2.5 - 5 mg /l BA).

Estas observações sugerem que um ótimo equilíbrio auxina-citocinina endógeno poderia ter sido estabelecido para formação de raiz. Embora, é considerado que citocininas inibem enraizamento (Varga & Humphries, 1974), em fases posteriores, o efeito inibitório de citocininas desaparece e o desenvolvimento de primórdio de raiz parece depender de citocininas (Eriksen, 1974).

**Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>).** Foi sugerido que GA<sub>3</sub> não aja diretamente na formação de raiz, mas por regulamento de nível de IAA (Anand et al., 1972), e muitos autores acrescentaram habitualmente 0.1 mg/l GA<sub>3</sub> no meio de enraizamento (Hammerschiag, 1982a). Culturas de fruteira podem enraizar sem GA<sub>3</sub> exógeno (G. Németh 1982). Em ameixa 0.1 mg/l GA<sub>3</sub> estimulou enraizamento, mas não era essencial (Hammerschiag 1982a), considerando que em pêssego GA<sub>3</sub> + PG aumentou o número de plantas bem-desenvolvidas (Chancel et al., 1980). Com ameixa GF 31 G. Németh (1979) encontrou um aumento significativo de enraizamento através de 3 µM GA<sub>3</sub>, mas não em cereja e híbridos pêssego X amêndoa, embora o alongamento de brotos fosse pronunciado. Em marmelo BA 29, 3 µM GA<sub>3</sub> diminuiu em 50% o número de brotos enraizados. Em amêndoa inibição completa foi observada através de 1 mg/l GA<sub>3</sub> (Rugini & Verma, 1982). Thorpe (1980) considera que GA's são envolvidos no crescimento normal do tecido e diferenciação, e inibição de formação de órgão através de GA exógeno resulta de níveis supraótimos e a estimulação de organogênese *in vitro* pode ser interpretada como indicativo de baixo nível de GA endógeno.

**Ácido Abscísico.** Nenhuma formação de raiz em segmentos de *P. avium* *P. pseudocerasus* foi observada com 0.1 - 10 mg/l ABA só, considerando que 0.1 mg/l combinado com I ou I, 5 mg/l BA deu origem a plantas enraizadas (Feucht & Dausend, 1976). Rugini & Verma (1982) observaram inibição completa de enraizamento através de 0.8 mg/l ABA em culturas de amêndoa. Precisa-se de mais dados para a interpretação do papel do ABA no enraizamento de fruteiras *in vitro*

## BASE GENÉTICA

Diferenças no enraizamento *in vitro* de *P. Pseudocerasus* (Fácil de enraizar) *P. avium* (difícil de enraizar) podem explicar a reação diferencial a hormônios (Feucht & Dausend, 1976). Em maçã (*Granny Smith* maçã), a formação de primórdios radiculares em meio

líquido agitado parecia ser genótipo-específico (Sriskandarajah & Muilins, 1981). Análise Estatística da frequência de formação de raiz em culturas de maçã MM 104, M 26, M 27 e Starkspur mostraram uma interação significativa entre auxinas e clones e isto sugeriu que a indução de raiz adventícia foi influenciada fortemente pela base genética das variedades estudadas (G. Németh, 1981). Foram achadas diferenças genotípicas entre clones de maçã anões na reação deles com citocinina (Lane et al., 1982). Zimmermann & Broome (1981) levantaram a hipótese de que a reação de clones de maçã e cultivares para PG também poderia ser genótipo-específica. Com base nos achados deles com maçã M9 e M26. James (1983a, b) explicou a diferença em sensibilidade para auxina pelas diferenças em metabolismo de auxina.

## INFLUÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Monsion & Dunez (1971) informaram a dependência de enraizamento de ameixa *P. mariana* do período do ano quando foram levadas das estacas para cultura. A idade da árvore mãe também é importante do ponto de vista da juvenilidade. Jones (1978) encontrou uma demora longa em termo de diferenciação do meristema de uma macieira de 8 anos em contraste com esses levados de uma árvore de 1 ano, mas uma vez o crescimento iniciado, os resultados eram semelhantes. Como uma das explicações para a grande variabilidade de enraizamento de maçã *Spartan*, Zimmermann & Broome (1981) descartaram a idade (12 anos) da árvore mãe. Enraizamento era mais alto em jovem que em adulto em estacas de maçã A2 (Welander e Huntrieser 1981) e para o máximo de enraizamento. Diferentes concentrações de IBA eram necessárias em cultivares jovens e adultos de maçã M.26 (Welander, 1983).

Boxus & Quoirin (1974) mencionaram que a idade de propágulos de *Prunus* influenciou a formação de raiz. Em meio de multiplicação de broto, enraizamento dobrado foi observado em maçã, e James & Thurbon (1981b) explicaram isto antes do outono em concentração de BA às bases de broto. O número crescente de subcultura melhora o enraizamento, como observado por Jonathan em maçã Deliciosa (Sriskandarajah et al., 1982), em cereja (Leva et al., 1981) e amêndoa (Rugini & Verma, 1982). Em relação ao enraizamento, foram levantadas perguntas sobre rejuvenescimento durante subcultura prolongada (Sriskandarajah et al., 1982), mas nenhuma resposta foi determinada.

As condições de subcultura precedendo a fase enraizamento mostram influência em iniciação de raiz. Alongamento em meio hormônio-livre ou com 0.1 mg/l GA<sub>3</sub> (Boxus & Quoirin 1974; Quoirin et al., 1977) como também a baixa concentração de citocinina (Rugini & Verma, 1982) favorece a formação de raiz. Jones & Hopgood (1979a) informaram o efeito benéfico de PG no crescimento de broto e em enraizamento subsequente de ameixa e cereja. O efeito promotor de PG durante a fase de alongamento de broto não era evidente com várias espécies de *Prunus* (Quoirin et al., 1977). O efeito de condicionamento de PG no enraizamento subsequente de maçã tipo M. 9 e ausência deste efeito em maçã tipo M. 26 foram explicados através de diferenças em metabolismo de IAA (James & Thurbon, 1981b).

O tamanho de brotos levados para enraizamento em experiências diferentes varia entre 1 e 5 cm (Jones & Hopgood, 1979a). O Tamanho de brotos de maçã entre 1 e 3.5 cm não teve nenhum efeito em enraizamento e nenhum efeito de número de folha foi mencionado por James (1981a). Experimento de Jones et al. (1977b) com ameixa Pixy chamaram atenção a contaminação bacteriana dentro do tecido que pode influenciar a habilidade de enraizamento.

## INFLUÊNCIA DO AMBIENTE

### LUZ

Boxus e Quoirin (1974) mencionaram que luz era inibitório para enraizamento. Tabachnik & Kester (1977) obtiveram enraizamento de amêndoa tanto na luz quanto no escuro,

enquanto que Rugini & Verma (1982) aplicaram só escuridão para amêndoa. Discos foliares de *P. mahaleb* só enraizaram em luz (Hedtrich, 1977). Mantendo os brotos de diferentes variedades de *Prunus* na escuridão durante os primeiros 5 dias e os transferindo então para a iluminação aumentaram-se as porcentagens de enraizamento, dependendo da qualidade de luz (Standardi et al., 1978). G. Németh (1979) observou altas porcentagens de plantas enraizadas em meio contendo BA abaixo de 2000 lx que em 800 lx de intensidade luminosa. Jordan et al. (1982) obtiveram 80% de enraizamento de *P. avium* em escuridão, embora sob baixa intensidade luminosa, foram bem enraizados também brotos de cereja (Sauer, 1983; Snir, 1983). Hammerschiag (1982a) declarou que um período de duas semanas no escuro era essencial para máximo enraizamento de ameixa Calita, e a luz inibiu formação de raiz. Frequência de enraizamento alta foi obtida em maçã debaixo de iluminação contínua (Srisikandarajah et al., 1982), enquanto que Welander (1983) observou um aumento ao nível de enraizamento em escuridão. Nenhuma diferença significativa foi achada entre brotos estiolados e brotos crescidos na presença de luz para enraizamento de maçã M. 9 (James & Thurbon, 1979b). Em alguns cultivares de maçã, estiolação durante a fase de multiplicação aumentou o enraizamento subsequente (Zimmermann, 1983a, b).

Druart et al. (1982) estudaram o efeito de diferentes regimes claros durante os estágios indutivos (alongamento do broto) e iniciação de enraizamento e encontrou aquele regime de escuridão-escuridão deu origem à frequência mais alta e número de raízes. A atividade de peroxidase aumentou durante a fase indutiva, seguida por uma diminuição na fase de iniciação. Considerando que a atividade de peroxidase é relacionada ao nível endógeno de auxina, os resultados variados obtidos por muitos autores podem ser explicados em parte pela sensibilidade à luz destas fases de enraizamento e a destruição da maior parte do IAA através da luz azul (Yamakawa et al., 1979).

## TEMPERATURA

Tratamento com frio a 4 °C em escuridão melhorou o alongamento de brotos (Quoirin et al., 1977), mas este efeito não foi observado por G. Németh (1978). Análise da literatura mostrou que culturas de fruteiras enraizam entre 21°-30°C de temperatura. Lane (1978) obteve ótimo enraizamento de brotos de maçã a 28 °C e a porcentagem de plantas enraizadas estava reduzida a 23 °C e 21 °C. A cultura de brotos de maçã a 22°, 25 ° ou 29° C em meio contendo auxina (fase de iniciação) e em meio sem hormônio (aparecimento de raiz) não mostrou nenhuma diferença na resposta de enraizamento (James, 1983a). Na opinião de Fellenberg (1976) “no momento não há nenhuma hipótese satisfatória ou evidência metabólica da temperatura no enraizamento”.

A Influência da umidade não foi estudada sistematicamente, embora Lane (1979) observou aumento do número de brotos, o que aumenta a umidade e o enraizamento. Isso parece ser confirmado (Rosati et al., 1980) em ameixa, que enraizou 95% a densidade de broto alta em jarros.

## ACLIMATAÇÃO DE PROPÁGULOS PARA CONDIÇÕES DE TERRA

O sucesso do transplante e sobrevivência de plantas depende da qualidade das raízes (Navatel, 1982). Formação de calo concentração-dependente de auxina também pode reduzir a taxa de sobrevivência. Raízes induzidas por IBA de plantas de pêra eram de qualidade melhor que em meio com NAA (Lane, 1979). Em princípio, uma planta com só uma raiz é capaz de sobreviver, não obstante, um maior número de raízes por planta pode compensar raízes não funcionais ou estragadas. Em cereja azeda (Snir, 1983) foram produzidas 5-15 raízes por planta. O sistema radicular precisa ser micorrizado para a árvore crescer prosperamente (David, 1978), e a síntese de micorrizas *in vitro* de *P. avium* micropropagada com o fungo *Gigaspora marginata* foi realizada (Navatel, 1983). Foram obtidas altas porcentagens e boa qualidade de enraizamento em cereja sob condições não-estéreis (Lineberger, 1983).

Folhas produzidas *in vitro* têm uma cutícula incompleta (Zimmermann & Broome,

1980). Resultados obtidos com microscópio eletrônico de varredura revelaram diferenças na cera epicuticular de plântulas aclimatadas e não aclimatadas de ameixa, e os autores concluíram que aquela perda de água aconteceu principalmente na superfície abaxial onde os estômatos estão situados (Fuchigami et al., 1981). Uma resposta estomatal lenta era uma causa significativa da perda de água em maçã. Brainerd & Fuchigami (1981) mostraram que partes de plantas micropropagadas podem ser aclimatadas em baixa umidade dentro de 4-5 dias de exposição para 30 - 40% umidade relativa, e isto envolveu o desenvolvimento de resposta estomatal acelerada.

Borrifando as plantas com fertilizantes e/ou antitranspirantes pode-se melhorar o estabelecimento na terra (Lane, 1979). Spray com 200 ppm GA<sub>3</sub> melhorou o alongamento e eliminou o hábito de roseta de ameixa Pixy (Howard & Oehl, 1979).

## CONCLUSÕES

Normalmente, abaixar a concentração de macronutrientes e açúcar nos meios basais aplicados resulta em um aumento no enraizamento. Carvão ativo deveria ser usado com cautela. Meio líquido acrescido com perlite ou vermiculita como suporte em condições estéreis torna a manipulação mais fácil; enraizamento em condições não-estéreis debaixo de fluxo de água em forma de neblina podem eliminar um passo de cultura, tornando a produção mais econômica.

Auxinas deveriam ser aplicadas distintamente durante fases diferentes de formação de raiz (indução, iniciação, emergência de raiz e alongamento), levando em conta o tipo, efeito "tempo x concentração" e interação com outras substâncias como citocininas, GA<sub>3</sub>, fenólicos e outros elementos adicionados. Efeito de luz e escuridão tem importância considerável durante as fases de formação de raiz, inclusive sucessão destes regimes, intensidade e qualidade de luz. Padrão de Isoperoxidase e conteúdo de fenólicos são marcadores satisfatórios do processo de regeneração de raiz.

Fundo genético e estado fisiológico da planta-mãe e explantes levados para enraizamento são fatores importantes na interação com hormônios e condições ambientais. A aclimação das plantas deve ser realizada gradualmente, à temperatura satisfatória, alta umidade relativa e sob baixa intensidade luminosa, com aplicação de spray com antitranspirantes, solução nutriente ou GA<sub>3</sub> se necessário.

São marcadores adequados no processo de regeneração, a base genética do material vegetal e o estado fisiológico da planta mãe e o explante utilizado para o enraizamento são fatores importantes na interação com os hormônios e as condições ambientais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, V.K; CHIBBAR, R.N; NANDA, K.K. Effects of GA<sub>3</sub> and IBA (indole-3-butyric acid) on rooting and on the sprouting of buds on stem cuttings of *Ipomoea fistulosa*. **Plant Cell Physiol.**, v.13, p. 917-921, 1972.

ANCORA, G., BENVENUTO, E., ROSELLI, G.; DONINI, B. Micropropagation of cherry rootstock F12/1 clones originated from irradiation: the isolation of solid mutants. **Riv Ortofrutticoltura Ital**, v. 66, p. 231-238, 1982.

ANDERSON, W. Rooting of tissue cultured propagation of rhododendron. **In vitro**. v. 14, p.334 (Abstr), 1978.

AYNSLEY, J. In vitro multiplication of woody species. **Round Table Conf.**, 6-8 June, Gembloux, Belgium, p. 133, 1978.

BASSUK, N. L; HUNTER L.D; HOWARD, B.H. The apparent involvement of polyphenoloxidase and phloridzin in the production of apple rooting cofactors. **J Horticult Sci**,

v. 56, p. 313 – 322, 1981.

BASU, R. N; ROY, B. N; BOSE, T. K. Interaction of abscisic acid and auxin in rooting of cutting. **Plant Cell Physiol.**, v. 11, p. 681- 684, 1970.

BIN, G; SANESI, G. La moltiplicazione dei pesco con la tecnica della micropropagazione. **Inf Agr**, v. 38, p. 22371-22374, 1982.

BONGA, J. M; DURZAN, D. J. (Eds). Tissue culture in forestry. Nijhoff, The Hague Bonga JM, Fowler DP (1970) Growth and differentiation in gametophytes of *Pinus resinosa* cultured in vitro. **Can J Bot**, v.48, p. 2205-2207, 1982.

BONNER, J. Development. In: Bonner J, Varner JE (Eds) Plant biochemistry. **Academic Press.**, London New York, p. 850-866, 1965.

BOXUS, P. H. La culture méristèmes de *Prunus*. Note préliminaire relative a l'espèce *P. pandora*. **Buli Rech Agron GX**, v. 6, p. 3-5, 1971.

BOXUS, P. H. In vitro multiplication of woody species. **Round Table Conf**, 6-8 June, Gembloux, Belgium, p. 147, 1978.

BOXUS, P.H.; QUOIRIN, M. La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de *Prunus*. **Buli Soe R Bot Belg**, v.107, p. 91-101, 1974.

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L. H. Acciimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **J Am Soe Hortic Sei**, v. 106, p. 515-518, 1981.

CHANCEL, L. M. ; MACHEIX, J. J, JONARD, R. Lès conditions du microbouturage in vitro du pêcher/ *Prunus pérsica* Batsch.: influences combinées dès substances de croissance et de divers composés phénoliques. **Physiol Veg**, v. 18, p. 597-608, 1980.

CHEEMA, G.S.; SHARMA, D. P. In vitro propagation of apple root-stock - EMLA 25. **Acta Hortic**, v.131, p. 75-88, 1983.

CHENG, T. Y. Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. **Proc Int Plant Prop Soe**, v.28, p. 139-155, 1978.

CONSTANTINE, D. In vitro multiplication of woody species. **Round Table Conf**, 6-8 June, Gembloux, Belgium, p. 134, 1978.

DAVID, A. In vitro multiplication of woody species. **Round Table Conf**, 6-8 June, Gembloux, p. 149, 1978.

DUART, P. H; KEVERS, C. L; BOXUS, P. H.; GASPAR, T. H. In vitro promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. **Z Pflanzenphysiol**, v. 108, p. 429-436, 1982.

DUDITS, D.; NEMETH, G.; HAYDU, Z. Study of callus growth and organ formation in wheat *Triticum aestivum* tissue culture. **Can J Bot**, v. 53, p. 957-963, 1975.

ERIKSEN, E. N. Root formation in pea cuttings. III. The influence of cytokinin at different developmental stages. **Physiol Plant**, v. 30, p. 163-167, 1974.

FELLENBERG, G. Developmental physiology. In: Ellenberg H, Esser K, Merxmüller H, ShnerpfE, Ziegler H (eds) **Progress in botany**, Springer, Berlin Heidelberg New York, v. 38,

p 167-186, 1976.

FEUCHT, W.; DAUSEND, B. Root induction in vitro of easy-to-root *Prunus pseudocerasus* and difficult-to-root *Prunus avium*. **Sci Hortic**, v. 4, p. 49 – 54, 1976.

FRIDBORG, G.; PEDERSIN, M.; LANDSTROME, L. É.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue culture: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiol Plant**, v. 32, p. 104-106, 1978.

FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. **J Am Soc Hortic Sci**, v. 106, n. 4, p. 519-522, 1981.

GASPAR, T. H.; SMITH, D.; THORPE, T. Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogénèse. **C R Acad Sci Ser D**, v. 285, p. 327-330, 1977.

HAISSIG, B. E. Influences of auxins and auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development. **N Z J For Sci**, v. 4, p. 311-323, 1974.

HAMMERSCHIAG, F. A. Factors influencing in vitro multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). **J Am Soc Hortic Sci**, v. 107, n. 1, p. 44-47, 1982a.

HEDTRICH, C. M. Differentiation of cultivated leaf discs of *Prunus mahaleb*. **Acta Hortic**, v. 78, p. 177-183, 1977.

HEUSER, C. W.; HESS, C. E. Isolation of three lipid root-initiating substances from juvenile *Hedera helix* shoot tissue. **J Am Soc Hortic Sci**, v. 97, p. 571-574, 1972.

HOWARD, B.H.; OEHL, V. H. Propagation in vitro. Establishment of micropropagated Pixy plum rootstock. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 76, 1979.

JAMES, D. J. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (*Maius pumila*), I. Factors affecting the length of auxin-sensitive phase in M 9. **Physiol Plant**, v. 57, p. 149-153, 1983a.

JAMES, D. J. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (*Maius pumila*). II. Uptake and distribution of indol-3-acetic acid during the auxin-sensitive phase in M 9 and M 26. **Physiol Plant**, v. 57, p. 154-158, 1983b.

JAMES, D. J.; THURBON, U. Culture in vitro of M 9 apple rootstocks. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 189-192, 1979a.

JAMES, D. J.; THURBON, U. Culture in vitro of M 9 apple. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 179-180, 1979b.

JAMES, D.J.; THURBON, U. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M 9 and the promotive effect of phloroglucinol. **J Hortic Sci**, v. 56, p. 15-20, 1981a.

JAMES, D.J.; THURBON, U. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis in vitro in the apple rootstock M 9 and M 26. **Z. Pflanzenphysiol**, v. 105, p. 11 -20, 1981b.

JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E. The successful propagation in vitro of two rootstocks of *Prunus*: the plum rootstock Pixy (*P. instittia*) and the cherry rootstock F12/1 (*P. avium*). **J Hortic Sci**, v. 54, p. 63-66, 1979a.

JONES, O. P. ; HOPGOOD, M.E.; O'FARRELL, D. Propagation in vitro of fruit trees. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 79, 1976.

JONES, O. P.; HOPGOOD, M.E.; O'FARRELL, D. Propagation in vitro of M 26 apple rootstocks. **J Hort Sci**, v. 52, p. 235-238, 1977a.

JONES, O. P.; PONTIKIS, C. A.; HOPGOOD, M. E. Shoot and root development in vitro. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 176-178, 1977b.

JONES, O.P.; HOPGOOD, M. E.; FULLER, M. M. Morphogenetic factors in xylem sap. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 18, 1978.

JONES, O. P.; MARKS, T. R.; ALLER, B. J. Propagation in vitro. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 159, 1981.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, L.; FEUCHT, W. Inhibition of root formation in *Prunus avium* hypocotyls by chlorogenic acid in vitro. **Gartenbauwissenschaft**, v. 45, p. 15-17, 1980.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, L.; FEUCHT, W. Effect of nitrogenous bases on root formation of hypocotyls from *Prunus avium* L. 'Mericier' and 'Bing' grown in vitro. **Gartenbauwissenschaft**, v. 47, p. 46-48, 1982.

LANE, W. D. Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. **Plant Sei Lett**, v. 13, p. 281 -285, 1978.

LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristems. **Plant Sei Lett**, v. 16, p. 337-342, 1979.

LANE, W.D.; LOONEY, N. E.; MAGE, F. A selective médium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. **Theor Appl Genet**, v. 61, p. 219-223, 1982.

LEE, T. T.; SKOOG, F. Effect of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, 18:386-402, 1965.

LEPOIVRE, P. H. In vitro multiplication of woody species. **Round Table Conf**, 6-8 June, Gembloux, Belgium, p. 135- 145, 1978.

LINEBERGER, R. D. Shoot proliferation, rooting, and transplant survival of tissue cultured 'Hally Joiivette' cherry. **HortSci**, v. 18, p. 182-185, 1983.

MARKS, T. R.; JONES, O. P.; TREHARNE, K. J.; HOPGOOD, M. E. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 186, 1980.

MARKS, T. R.; TREHARNE, K. J.; JONES, O. P. Uptake and metabolism of <sup>14</sup>C-phenylglucosin. **Rep E Mailing Rés Stn**, p. 159- 160, 1981.

MEHRA, A.; MEHRA, P. N. Organogenesis and plantlet formation in vitro in almond. **Boi Gaz**, v. 135, p. 61-73, 1974.

MINOTTA, G. Studies on the use of different carbohydrates in substratos for the micropropagation of plum. **Riv Ortofrutticoltura It**, v. 65, p. 343-352, 1981.

MITSUHASHI-KATO, M.; SHIBAOKA, H.; SHIMOKORYAMA, M. The nature of the dual effect of auxin on root formation in *Azuki* cuttings. **Plant Cell Physiol**, v. 19, p. 1535-1542, 1978.

MOHAMMED, S.; ERIKSEN E. N. Root formation in pea cuttings. IV. Further studies on the influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. **Physiol Plant**, v. 32, p. 94-96, 1974.

MONSION, M.; DUNEZ, J. Obtention de jeunes plants de *Prunus mariana* à partir de boutures cultivées in vitro. **C R Acad Sei Ser D**, v. 272, p.1861 - 1864, 1971.

MOSELLA-CHANCEL, L.; MACHEIX, J. J. Lê microbouturage in vitro du Pêcher (*Prunus pérsica* Batsch): influence de certains composés phenoliques. **C R Acad. Sei Ser D**, v. 289, p. 567-570, 1979.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, v.15, p. 473-497, 1962.

NANDA, K. K.; JAIN, M. K. Utilization of sugars and starch as carbon sources in the rooting of etiolated stem segments of *Popuius nigra*. **New Phytol**, v. 71, p. 825-828, 1972.

NAVATEL, J. C. Problèmes lies à la production de porte-greffe d'arbres fruitiers par la multiplication in vitro. **Fruits**, v. 37, p. 331-336, 1982.

NÉMETH, G. In vitro multiplication of woody species. **Round Table Conf**, 6-8 June, Gembloux, Belgium, p. 135-137, 238-242, 1978.

NÉMETH, G. Benzyladenine-stimulated rooting in fruit-tree rootstocks cultured in vitro. **Z Pflanzenphysiol**, v. 95, p. 389-396, 1979.

NÉMETH, G. Adventitious root induction by substituted 2-chloro-3-phenyl-propionitriles in appie rootstocks cultured in vitro. **Sei Hortic**, v. 14, p. 253-259, 1981.

PONCHIA, G.; ROSELLI, G. Prove di micropropagazione di due cloni di ciliegio acido (*Prunus cerasus* L.) **Riv Ortofl It**, v. 64, p. 229-240, 1980.

POPOV, Y.; VYSOTSKY, V. A.; TRUSCHECHKIN, V. G. Kul'tura izolirovannih steblevih verhusek vischni. **Sov Plant Physiol** v. 23, p. 513-518, 1976.

QUOIRIN, M.; BOXUS, P. H.; GASPAR, T. H. Root initiation and isoperoxidases ofstem tip cuttings from mature *Prunus* plants. **Physiol Veg**.,v. 12, p.165-174, 1974.

QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. H.; BOXUS, P. H. Un premier bilan de 10 années de recherches sur lês cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux. C R Rech 1976-1977. **Stn Cult Fruit Maraicheres**, Gembloux, p 93-117, 1977.

ROSATI, P.; MARINO, G.; SWIERCZEWSKI, C. In vitro propagation of Japanese pium (*Prunus salicina* Lindl cv. Calita). **J Am Soc Hortic Sei** v. 105, p. 126-129, 1980.

RUGINI, E.; VERMA, D. C. Micropropagation and cell suspensions of a difficult to propagate almond (*Prunus amygdaius* Batsch) cultivar. In: Fujiwara A (ed) **Plant tissue culture**, 1982. Maruzen, Tokyo, p. 741-742, 1982.

RYUGO, K.; BREEN, P. J. Indoleacetic acid metabolism in cuttings of pium (*Prunus cerasifera* x *P. munsoniana* cv. Mariana 2624). **Proc Am Soc Hortic Sei**, v. 99, p. 247, 1974.

SCOTT, T. K. Auxins and roots. **Annu Rev Plant Physiol**, v. 23, p.235-258, 1972.

SHIBAOKA, H.; SHIMOKORIYAMA, M.; YRINCHIJIMA, S.; TAMURA, S. Promoting activity of terpenic lactones in *Phaseolus* rooting and their reactivity toward cysteine. **Plant Cell Physiol**, v. 8, p. 297-305, 1967.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. Tissue culture may revolutionize the production of peach shoots. **III Rés**, v. 19, p. 18-19, 1977.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; RUKAN, H. Tissue culture of peach, sweet and sour cherry, and apricot shoot tips. Proc 111. **State Hort Soc**, v. 113, p. 30-38, 1980b.

SNIR, I. A micropropagation system for sour cherry. **Sei Hort**, v.19, p. 85-90, 1983.

SRISKANDARAJAH, S.; MUILINS, M. G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro. **J Hort Sci**, v. 56, p. 71-76, 1981.

SRISKANDARAJAH, S.; MUILINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting in vitro in difficult-to-propagate cultivars of apple. **Plant Sci Lett**, v. 24, p. 1-9, 1982.

STANDARDI, A.; BOXUS, P. H.; DRUART, P. H. Preliminary research into effect of light on the development of axillary buds and the rooting of plantlets cultivated in vitro. **Round Table Conf In Vitro Multi Woody Spec. Gembloux**, Belgium, June 6-8, p.269-282, 1978.

STONIER, T.; HUDEK, J.; VANDE-STROUWE, R.; YANG, H. (1970) Studies of auxin protectors. VIII. Evidence that auxin protectors act as cellular poisons. **Physiol Plant**, v. 23, p. 775-783, 1970.

TABACHNIK, L.; KESTER, D. E. Shoot cultures for almond and almond-peach hybrid clones in vitro. **HortSci**, v. 12, p. 545-547, 1977.

TORREY, J. G. Experimental modification of development in the root. In: Rudnick (ed) **Cell organism and milieu**, Ronald, New York, p. 189-222, 1959.

TORREY, J. G. Root hormones and plant growth. **Annu Rev Plant Physiol**, v. 27, p. 435-459, 1976.

TRIPATHI, B. K. Études sur la nutrition minérale et la néoformation de racines par lès tissus de topinambour cultivés in vitro. **Lès cultures de tissus de plantes**, (Ed) Centre Nat Rech Sei) Paris, p. 201-208, 1971.

VARGA, M.; HUMPHRIES, E. C. (1974) Root formation on petioles of detached primary leaves of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) pretreated with gibberellic acid, triiodobenzoic acid, and cytokinins. **Ann Bot**, (London) 38:803-807, 1974.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G. G. Effects of activated charcoal as an additive plant tissue culture media, p 2. **Z Pflanzenphysiol**, v. 94, p. 399-405, 1979.

WELANDER, M. In vitro rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. **Physiol Plant**, v. 58, p. 231 -238, 1983.

WELANDER, M.; HUNTRIESER, I. (1981) The rooting ability of shoots raised in vitro from apple rootstock A2 in juvenile and in adult growth phase. **Physiol Plant**, v.53, p. 301-30, 1981.

WILKINS, C. P.; DODDS, J. H. (1982) Effect of various growth regulators on growth in vitro of cherry shoot tips. **Plant Growth Regu**, v. 1, p. 209-216, 1982.

YAMAKAWA, T.; KURAHASHI, O.; ISHIDA, K.; KATO, S.; KODAMA, T.; MINODA, Y. Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination. **Agric Biol, Chem**, v. 43, p. 879-880, 1979.

ZIMMERMANN, R. Factors affecting in vitro propagation of apple cultivars. **Acta Hortic**, v. 131, p. 171-178, 1983a.

ZIMMERMANN, R. H. Tissue culture. In: Moore JN, Janick J (Eds) **Methods in fruit breeding**. West Lafayette, Purdue Univ Press, West Lafayette, p. 124- 135, 1983a.

ZIMMERMANN, R. Z.; BROOME, O. C. Phioroglucinol and *in vitro* rooting of apple cuttings. **J Am Soc Hortic**, Sei v. 106, p. 648-652, 1981.

PALAVRAS-CHAVE:

Enraizamento, micropropagação, plantas lenhosas.