

Enraizamento *in vitro* de catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza), uma planta medicinal do Cerrado

SOUZA, A.V.V.¹; OLIVEIRA, F.J.V.²; BERTONI, B.W.³; FRANÇA, S.C.³; PEREIRA, A.M.S.³

¹Embrapa Semi-Árido – CPATSA, BR 428, Km 152, Zona Rural, CP. 23, CEP 56302-970, Petrolina, PE. ana.valeria@cpatsa.embrapa.br; ²IF Sertão Zona Rural, Petrolina – PE. ³Departamento de Biotecnologia de Plantas Mediciniais, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Av. Costábile Romano, 2201, Ribeirão Preto, SP, Brasil. CEP 14096-900.

RESUMO: Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar o protocolo para enraizamento *in vitro* de *Anemopaegma arvense*, planta medicinal do Cerrado em risco de extinção e conhecida popularmente como catuaba, a qual é amplamente utilizada na medicina popular. Brotas cultivadas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS/2 líquido e MS sólido suplementado com diferentes concentrações de auxinas, poliaminas ou dithiothreitol (DTT). As avaliações foram realizadas quanto à porcentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes. A presença de NAA (Ácido naftaleno acético) no meio de cultura foi essencial para promover a indução de raízes adventícias nas brotações. A maior porcentagem de enraizamento, 50%, foi obtida no tratamento 2 mg L⁻¹ de NAA com tempo de permanência de 15 dias nesta auxina. No experimento com poliaminas o melhor tratamento foi MS/2 + 5 mg L⁻¹ de putrescina, com 27% de brotações enraizadas. Na presença de DTT (Dithiothreitol), 23% das brotações enraizaram em 0,10 mg L⁻¹ de DTT. A presença da auxina NAA e a alternância no tempo de permanência foi a melhor condição para promover o enraizamento *in vitro* da de *A. arvense*.

Palavras-chave: auxinas, poliaminas, compostos fenólicos.

ABSTRACT: Study on the *in vitro* rooting of *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza, a medicinal plant of the Brazilian Cerrado. This work was carried out in order to optimize an efficient protocol for the *in vitro* rooting of *Anemopaegma arvense*, a medicinal plant of the Brazilian Cerrado in danger of extinction, popularly known as Catuaba in Portuguese and widely used in folk medicine. Shoots cultivated *in vitro* were inoculated in liquid MS/2 and solid MS culture medium supplemented with different concentrations of auxins, polyamines or dithiothreitol (DTT). Evaluations were performed for the rooting percentage and for the number and length of roots. The presence of NAA (naphthaleneacetic acid) in the culture medium was essential to promote the induction of adventitious roots. Higher rooting percentage (50%) was obtained in the treatment with 2 mg L⁻¹ NAA and duration of stay of 15 days in this auxin. In the experiment with polyamines, the best treatment was MS/2 + 5 mg L⁻¹ putrescine with 27% of shoots rooted. In the presence of DTT (dithiothreitol), 23% of shoots rooted at 0.10 mg L⁻¹ DTT. The presence of the auxin NAA and the alternation in length of stay was the best condition to promote *in vitro* rooting of *A. arvense*.

Key words: auxins, polyamines, phenolic compounds.

INTRODUÇÃO

Anemopaegma arvense (Vell.) Stell. ex de Souza (Bignoniaceae), conhecida popularmente como catuaba, é uma planta medicinal endêmica do Cerrado, potencialmente útil para a indústria farmacêutica. Os metabólitos secundários de interesse desta espécie estão localizados em suas raízes, cuja ação é estimulante e tonificante do sistema nervoso central em humanos (Hoehne,

1978).

Atualmente a *A. arvense* encontra-se na lista de flora ameaçada de extinção do Brasil, na categoria vulnerável (BDT, 2002), porque toda a coleta das plantas no *hábitat* natural é realizada de maneira extrativista predatória não só pela população, mas também por laboratórios farmacêuticos, sem preocupação quanto à conservação. Não existem

até o momento programas voltados à produção de mudas em escala comercial para esta espécie, o que poderá amenizar o risco de erosão genética, bem como servir de subsídio para o fornecimento de matéria prima para a produção de medicamentos. Pesquisas que viabilizem a produção de plantas medicinais em larga escala são certamente os principais recursos que poderão reduzir o impacto da devastação da flora do Cerrado.

Embora as sementes da espécie apresente tolerância a determinados tipos de estresse abiótico (Pereira et al., 2007) o que facilita a propagação por via sexuada, somente a técnica da cultura de tecidos é capaz de viabilizar a produção de milhares de mudas, em curto período e espaço físico reduzido, capaz de suprir a demanda de indústrias farmacêuticas. Além disso, o desenvolvimento de metodologia de produção *in vitro* de *A. Arvense*, com ênfase na obtenção de raízes adventícias em brotações desta espécie é fundamental para se determinar protocolo para produção de raízes *in vitro*, visando obtenção de metabolitos secundários. De acordo com Pereira et al 2007 a produtividade de raízes desta espécie cultivadas em condição *ex vitro* é muito baixa.

O protocolo para a propagação *in vitro* da catuaba, foi estabelecido por Pereira et al. (2003). Contudo, a metodologia empregada foi ineficiente quanto ao enraizamento. Considerando a necessidade da realização de ajustes neste já estabelecido a fim de viabilizar a produção de mudas de catuaba em escala comercial, objetivou-se com este trabalho otimizar o protocolo mais eficiente para o enraizamento *in vitro* de *A. arvense*.

MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e Plantas Mediciniais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Como fonte de explantes, foram utilizadas brotações com 3-4 cm, multiplicadas *in vitro* segundo protocolo estabelecido por Pereira et al. (2003). Uma exsicata está depositada no Herbário de Plantas Mediciniais da Universidade de Ribeirão Preto (voucher HPMU-791, coletada no município de Altinópolis SP em 04/11/2003).

Para a instalação dos experimentos, foram utilizadas cubetas de vidro (25x85mm) contendo os meios de cultura MS sólido + 30 g L⁻¹ de sacarose (Murashige e Skoog, 1962) ou MS líquido com metade da concentração para macro e micronutrientes suplementada com 15 g L⁻¹ de sacarose. As brotações foram colocadas nas cubetas, que foram tampadas com tampa plástica e vedadas com parafilme e mantidas em sala de crescimento sob condições controladas

de temperatura 26±1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 25 μmol m⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca, até o momento da avaliação. O pH dos meios foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem e, para os tratamentos em meio líquido, foram utilizados papéis de filtro como suporte sólido.

Todos os experimentos foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) e todos os tratamentos constituíram-se de seis repetições e cinco cubetas/parcela. As avaliações foram realizadas aos 30 dias (experimento 1) e 60 dias (experimento 2 e 3), quanto à porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz. Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o software SISVAR® (Ferreira 2011) e os dados de todos os experimentos foram transformados pela equação $\sqrt{X + 1}$.

Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA e IBA

Foram instalados dois experimentos diferentes utilizando o NAA e o IBA. As brotações foram inoculadas em meio de cultura MS/2 líquido, suplementado com ácido naftaleno acético (NAA) ou ácido indol butírico (IBA), em diferentes concentrações, onde permaneceram por períodos de 10, 15 e 30 dias. Posteriormente, as brotações foram transferidas para o mesmo meio (MS/2 líquido), porém sem a adição do regulador. Os explantes que foram cultivados em meio de cultura MS/2 líquido sem auxina não foram transferidos e este tratamento sem regulador vegetal foi considerado o controle.

Os tratamentos foram: 1) MS/2 - controle; 2) MS/2 + 1 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 10 dias; 3) MS/2 + 1 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 15 dias; 4) MS/2 + 1 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 30 dias; 5) MS/2 + 2 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 10 dias; 6) MS/2 + 2 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 15 dias; 7) MS/2 + 2 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 30 dias; 8) MS/2 + 4 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 10 dias; 9) MS/2 + 2 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 15 dias; 10) MS/2 + 4 mg L⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência 30 dias.

Efeito de diferentes concentrações e tipos de poliaminas

As brotações foram inoculadas em meio MS/2 líquido, suplementado diferentes concentrações de poliaminas e o tratamento sem adição do regulador vegetal, foi considerado o controle.

Os tratamentos foram: 1) controle -

MS/2; 2) 1 mg L⁻¹ de espermina; 3) 5 mg L⁻¹ de espermina; 4) 10 mg L⁻¹ de espermina; 5) 1 mg L⁻¹ de espermidina; 6) 5 mg L⁻¹ de espermidina; 7) 10 mg L⁻¹ de espermidina; 8) 1 mg L⁻¹ de putrescina; 9) 5 mg L⁻¹ de putrescina; 10) 10 mg L⁻¹ de putrescina; 11) 1 mg L⁻¹ de 1,3-diaminopropano; 12) 5 mg L⁻¹ de 1,3-diaminopropano; 13) 10 mg L⁻¹ de 1,3-diaminopropano.

Efeito do Dithiothreitol (DTT)

A base das brotações selecionadas para este experimento foram mantidas durante 1 hora em solução de 8 mg L⁻¹ de ágar + 0,20 mg L⁻¹ de NAA e, posteriormente, transferidas para o meio MS + 2 g L⁻¹ de Fitagel®, suplementado com 0; 0,10 e 0,25 mg L⁻¹ de dithiothreitol (DTT). O tratamento sem adição do regulador vegetal foi considerado o controle.

Os tratamentos foram: 1) controle – MS; 2) 0,10 mg L⁻¹ de DTT; 3) 0,25 mg L⁻¹ de DTT.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Efeito do tempo de permanência das brotações em presença de NAA e IBA

A presença de NAA foi essencial para promover a indução de raízes adventícias nas brotações de catuaba *in vitro*. Nenhuma brotação enraizou no tratamento controle e a alternância da concentração da auxina e tempo de permanência, aumentou consideravelmente a porcentagem de enraizamento, o número e o comprimento das raízes. A suplementação do meio com 2 mg L⁻¹ de NAA e o tempo de permanência de 15 dias, foi a melhor condição em que obteve-se 48,33% de enraizamento. Quando as brotações permaneceram durante 30 dias em 1 mg L⁻¹ de NAA, 23,3% apresentaram raiz. Nos demais tratamentos,

a porcentagem de enraizamento foi menor que 20% (Figura 1).

Para as brotações cultivadas na presença de IBA, os resultados foram diferentes e observou-se que esta auxina foi menos efetiva e menos tóxica em relação ao NAA. Maior porcentagem de enraizamento (27%) foi obtida quando as brotações permaneceram durante todo o tempo na presença da maior concentração testada, ou seja, 30 dias em 4 mg L⁻¹ de IBA. Nos outros tratamentos, a porcentagem de enraizamento foi menor que 25% (Figura 1).

A necessidade de suplementação do meio de cultura com auxinas durante a etapa de enraizamento *in vitro*, tem sido relatada por vários autores, principalmente para plantas lenhosas. Os resultados obtidos neste experimento corroboram com a literatura e com as respostas obtidas para várias espécies (Bosa et al., 2003; Nodoye et al., 2003; Souza et al., 2004; Sharma et al., 2005; Naija et al., 2008; Ramanayake et al., 2008; Phelan et al., 2009; Soares et al., 2011; Junior & Scherwinski-Pereira, 2012; Kataria et al., 2013).

Contudo, o efeito da auxina é significativamente variável entre as espécies, haja vista os inúmeros fatores que estão envolvidos no processo de enraizamento, especialmente o genótipo (Davis et al., 1988; Assis & Teixeira, 1998; Souza & Pereira, 2007, Soares 2010). Algumas auxinas como o NAA, podem, realmente, apresentar um efeito tóxico mais significativo quando comparado ao IBA (Grattapaglia & Machado, 1998; Souza et al., 2004). Nesse caso, é recomendável que as brotações destinadas ao enraizamento *in vitro*, permaneçam apenas por alguns dias em meio contendo esta auxina.

Naija et al. (2008), obtiveram 97% de brotos enraizados de maçã quando estes permaneceram

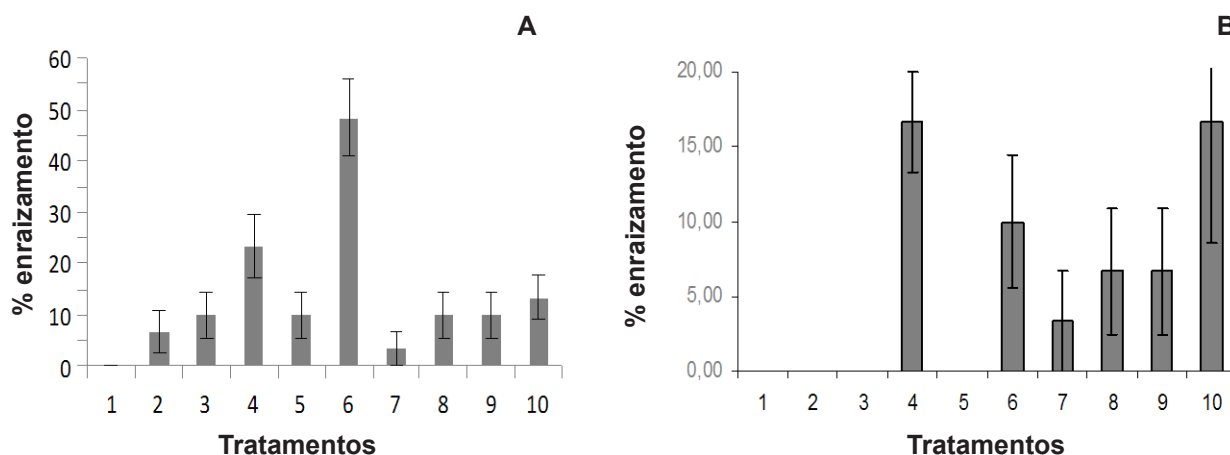


FIGURA 1. Porcentagem de enraizamento de plântulas de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações de NAA (A) e IBA (B) em diferentes tempos de permanência, aos 30 dias.

somente cinco dias na presença de 1 mg L⁻¹ de IBA, o que também pode indicar um efeito tóxico desta auxina para esta espécie. Estes autores observaram em seus estudos anatômicos, que a divisão celular na zona cambial ocorreu em três dias na presença de auxina exógena e a individualização dos meristemóides radiculares em cinco dias.

O número e o comprimento das raízes para as brotações cultivadas na presença de NAA seguiram o mesmo comportamento da variável porcentagem de enraizamento. Quando estes explantes permaneceram em 2 mg L⁻¹ de NAA durante 20 dias, obteve-se o maior número de raízes (1,3 raízes) com o maior comprimento (1,3 cm) (Figura 2).

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura sobre o tempo de permanência de 2, 3 ou 4 semanas na presença de auxina exógena, como as condições mais adequadas para induzir o enraizamento *in vitro* em brotações (Grattapaglia e Machado, 1998; Souza e Pereira, 2007).

As brotações cultivadas na presença de IBA emitiram o maior número de raiz no tratamento 4 mg L⁻¹ e tempo de permanência de 30 dias (1,21 raízes). Nos tratamentos 1 ou 4 mg L⁻¹ de IBA e 10 dias de permanência e 1 mg L⁻¹ de IBA e 15 dias de permanência, as brotações apresentaram 1,02 raízes. Quando permaneceram durante 15 dias em 4 mg L⁻¹ de IBA e 30 dias em 1 mg L⁻¹ de IBA, o resultado foi de 1,08 raízes (Figura 3).

Para a característica comprimento de raiz, os resultados foram semelhantes e maior comprimento (1,21cm), foi obtido quando as brotações permaneceram durante 30 dias na presença de 4 mg L⁻¹ de IBA, seguido de 1,15

cm, quando cultivadas nas mesmas condições na presença de 1 mg L⁻¹ de IBA. As raízes apresentaram 1,0 cm quando permaneceram durante 10 ou 15 dias na presença de 1 ou 4 mg L⁻¹ de IBA (Figura 3).

Estes resultados obtidos com a catuaba são interessantes, porque para esta espécie, a presença constante de uma fonte externa de auxina, não afetou o crescimento das raízes. A baixa porcentagem de enraizamento não foi devido à permanência constante na presença de IBA, mas sim ao efeito menos efetivo desta auxina para esta espécie.

As respostas obtidas para a catuaba, corroboram com os resultados reportados por Souza et al., (2004). Os autores obtiveram melhores respostas para a espécie medicinal do Cerrado, *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae), quando as brotações foram cultivadas por um período de duas semanas na presença de NAA e concluíram que esta auxina pode ser utilizada em protocolos de micropropagação para plantas medicinais lenhosas (Souza et al., 2007).

Não foi observada a formação de calos na base nas brotações de *A. arvense*, para nenhum dos tratamentos.

Efeito de diferentes concentrações e tipos de poliaminas

O efeito das poliaminas no enraizamento *in vitro* da catuaba foi consideravelmente diferente quando comparado às auxinas, pois as brotações enraizaram em todos os tratamentos. Contudo, a maior porcentagem de enraizamento obtida foi menor que 50%. O meio MS/2 + 5 mg L⁻¹ de putrescina foi o melhor tratamento com 27%

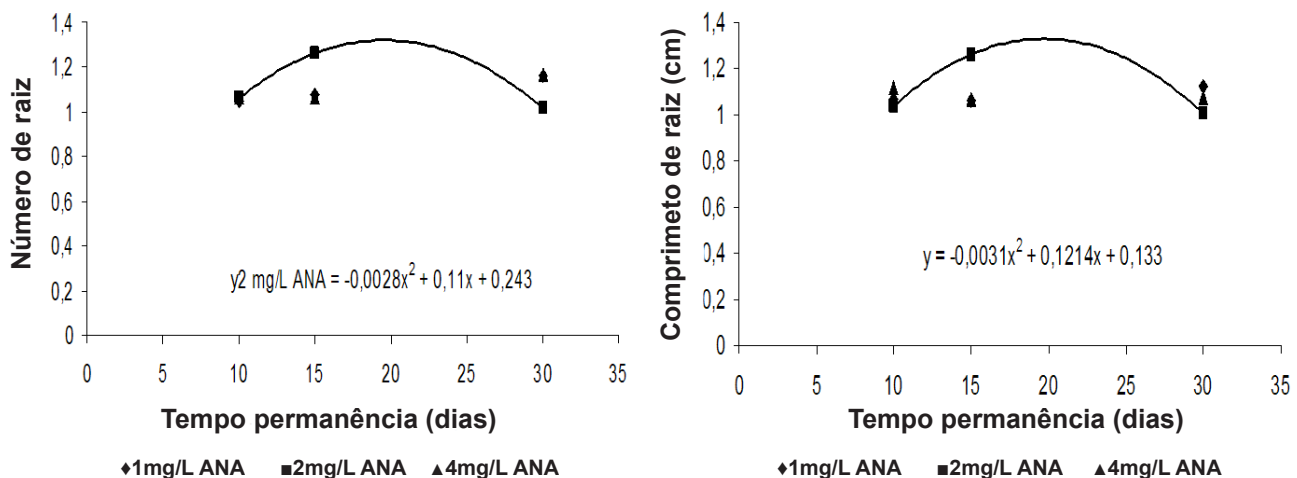


FIGURA 2. Número e comprimento de raiz de plântulas de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mg L⁻¹), aos 30 dias.

de enraizamento. Nos outros tratamentos, a porcentagem de enraizamento foi menor que 20% (Figura 4). Para o número e comprimento de raiz, não houve diferença estatística significativa entre tipos e concentrações das poliaminas testadas,

assim como na interação poliaminas x concentração (Tabela 1).

Vários autores sugerem que há uma correlação entre o conteúdo endógeno de poliaminas e o desenvolvimento de raízes. Além

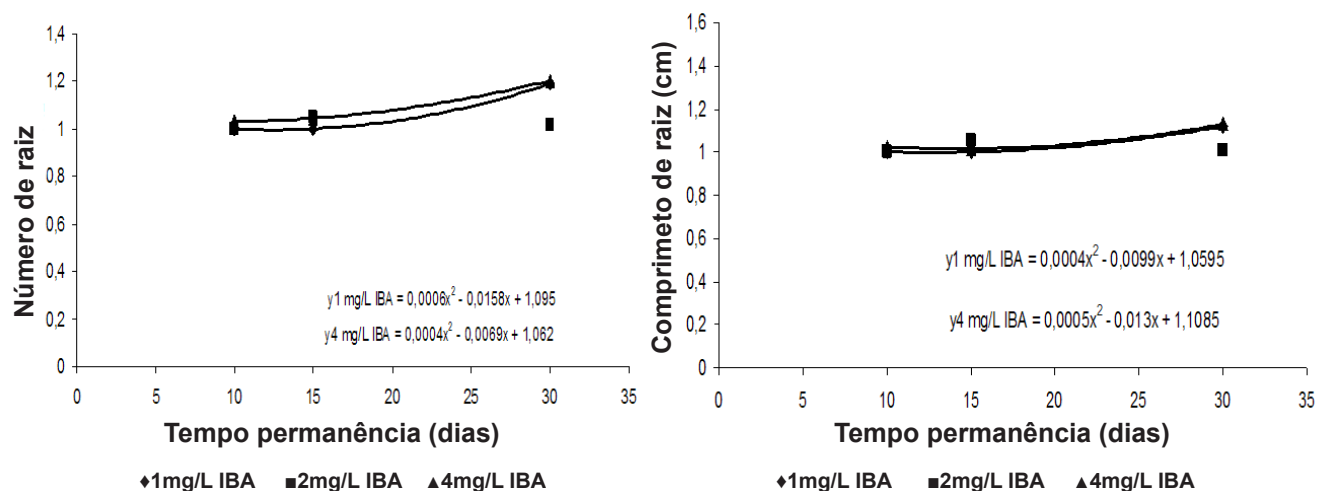


FIGURA 3. Número e comprimento de raiz de plântulas de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mg L⁻¹), aos 30 dias.

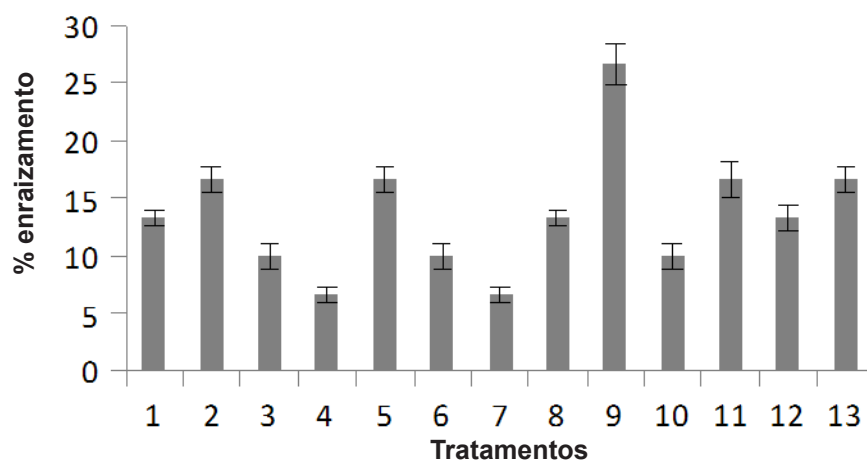


FIGURA 4. Porcentagem de enraizamento de brotações de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações e tipos de poliaminas em meio MS/2, aos 60 dias.

da associação com atividades meristemáticas, a ação das poliaminas também pode estar relacionada à interação com fito-hormônios e interações bioquímicas inespecíficas em níveis moleculares com outras substâncias envolvidas no processo de indução de raízes (Sankhla e Upadhyaya, 1988; Couée et al., 2004). Estudos realizados por esses mesmos autores mostram que existe uma relação entre crescimento de raízes e conteúdo endógeno de espermina, espermidina, putrescina e 1,3 diaminopropano.

Estudos realizados com *Berberis buxifolia*

Lam (Berberidaceae) envolvendo a atividade da peroxidase e variações nos níveis endógenos das poliaminas putrescina, espermidina e espermina, mostraram mudanças significativas deste compostos no período de enraizamento, constatando que houve baixa concentração de poliaminas e alta atividade de peroxidase, durante os primeiros quatro dias do processo de indução de raízes (Arena et al., 2003).

Outro fator relevante no enraizamento é que o balanço total de diferentes poliaminas pode ser mais importante do que o uso isolado de cada poliamina (Couée et al., 2004; Tang et al., 2004)

TABELA 1. Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) de brotações de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações e tipos de poliaminas, em meio MS/2, aos 60 dias.

Tratamento	NR	CR
Controle	1,06 ^{az}	1,08 ^a
1,3 diaminopropano	1,10 ^a	1,16 ^a
Espermina	1,07 ^a	1,11 ^a
Espermidina	1,08 ^a	1,10 ^a
Putrescina	1,11 ^a	1,09 ^a
CV(%)	10,49	13,59

^a Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Neste experimento com *A. arvense*, embora tenha sido utilizado vários tipos de poliaminas estas foram adicionadas ao meio de cultura isoladamente e em concentrações relativamente altas, o que pode ter influenciado negativamente na indução de raízes, tendo em vista que embora o enraizamento tenha ocorrido este foi consideravelmente baixo.

A importância das poliaminas nos diferentes aspectos do desenvolvimento de raiz, incluindo o crescimento de raízes primárias, laterais e adventícias já esta bem consolidada. Entretanto a concentração ideal para indução de raízes é discrepante entre espécies variando de 0,5 mg L⁻¹ a 50 mg L⁻¹ (Lee 1997; Hummel et al., 2002; Couée et al., 2004; Yang et al., 2010). Isto representa um desafio para o estabelecimento de dosagens adequadas para o enraizamento *in vitro*. Outro fator importante a ser considerado além da concentração, é que para espécies recalcitrantes a associação de poliaminas e auxinas pode ser necessário (Tonon et al., 2001).

Efeito do Efeito do Dithiothreitol (DTT)

Assim como as outras substâncias, o DTT promoveu o enraizamento *in vitro* da catuaba. Aos 60 dias, a maior porcentagem de enraizamento (37%) foi obtida em 0,10 mg L⁻¹ de DTT. Na concentração de 0,25 mg L⁻¹, o valor foi 17% e no tratamento controle, 6,7% (Figura 5). Mas também não houve diferença estatística entre as concentrações de DTT testadas para o número e o comprimento de raiz de *A. arvense* e o valor médio foi uma raiz com 1,0 cm, aproximadamente.

A ação dos compostos fenólicos na indução de raízes adventícias está relacionada a sua ação como co-fatores de enraizamento. Esses co-fatores agem como indutor das auxinas estimulando sua síntese e aumentando sua liberação, mas podem atuar também, como protetores de auxinas endógenas, servindo de substrato alternativo para a IAA-oxidase (Aloufa, 2003; Grattapaglia & Machado, 1998; Assis & Teixeira, 1998, McCown, 1988). Quando agem como protetores de auxinas, os polímeros de ortho-dihydroxyphenols, 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 radicial (Aloufa, 2003).

O composto dithiothreitol (DTT) tem se mostrado efetivo para algumas espécies que apresentam dificuldade de enraizamento (Auderset et al., 1997; Vasar & Svensson, 2005; Biondo et al., 2004). Essas substâncias geralmente são empregadas quando o interesse é a eliminação de espécies reativas de oxigênio e a neutralização de oxidantes extracelulares (Murina et al., 2005). Quando Vasar e Svensson (2005), testaram o

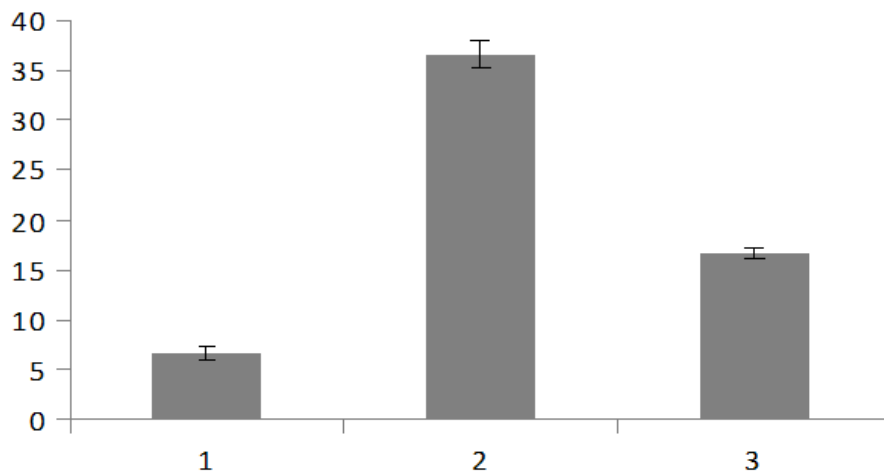


FIGURA 5. Porcentagem de enraizamento de plântulas de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT) aos 60 dias.

TABELA 2. Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) de brotações de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações de dithiothreitol em meio MS, aos 60 dias.

Tratamento	NR	CR
1	0,77 a ^z	0,76 a
2	0,84 a	0,91 a
3	0,80 a	0,91 a
CV (%)	16,88	23,82

^z Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

efeito de DTT juntamente com outros antioxidantes na formação de raiz e morfologia de plantas micropropagadas de *Prunus avium* L. (Rosaceae), cultivar Stella e Va, observaram o DTT e os outros antioxidantes, mostraram influência positiva na morfologia das raízes somente para a cultivar Stella. Contudo, quando Biondo et al., (2004), estudaram o efeito do DTT no enraizamento *in vitro* de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson (Apocynaceae), observaram que diferentemente dos resultados obtidos neste estudo com a catuaba, o DTT, não foi eficiente para promover o enraizamento.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a espécie *A. arvense* comporta-se de maneira diferente quanto à indução de raízes adventícias *in vitro*, quando submetidas à ação de substâncias empregadas para tal finalidade em estudos de cultura de tecidos.

Nos experimentos em que se utilizou poliaminas, pode ser que a alta taxa da peroxidase tenha afetado os níveis endógenos nas brotações e, a suplementação com poliaminas exógenas não tenha sido suficiente para induzir o enraizamento, uma vez que estas foram testadas separadamente. Contudo, para que se obtenha o maior número de brotações enraizadas, maior número e comprimento de raiz, as brotações de *A. arvense*, devem permanecer durante 20 dias, na concentração de 2 mg L⁻¹ de NAA.

As plantas produzidas *in vitro* foram aclimatizadas com taxa de sobrevivência aproximada de 60%.

REFERÊNCIAS

ALOUFA, M.A.I. **Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: Dificuldades e soluções.** In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

ARENA, M.E.; MARTÍNEZ, G.; GUSTAVO, V. *In vitro* propagation of *Berberis buxifolia* Lam. **Biocell**, v.24,

p.73-80, 2003.

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

AUDERSERT, G.; MONCOUSIN, C.; O'ROURKE, J.; JAMES MORRE, D. Stimulation of root formation in difficult-to-root woody cuttings by dithiothreitol. **International Journal of Plant Sciences**, v.158, p.132-135, 1997.

BDT: **Base de Dados Tropical.** Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/scan?278+edora+1+0+Anemopaegma+bAND+barvense>. Acesso em 20/05/2004.

BIONDO, R.; SOARES, A.M.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Report.**, v.22, p.549-552, 2004.

BOSA, N.; CAVETE, E.O.; SUZIN, M.; BORDIGNON, L. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 510-513, 2003.

COUÉE, I.; HUMMEL, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; EL AMRANI, A. Involvement of polyamines in root development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p. 1-10, 2004.

DAVIS, T.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings.** Portland – Oregon, 1988, v.2, 315p.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

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.

HOEHNE, M.V. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais.** São Paulo, p. 269-271, 1978.

HUMMEL, I.; COUÉE, I.; EL AMRANI, A.; MARTIN-TANGUY, J.; HENNION, F. Involvement of polyamines in root development at low temperature in the subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica*. **J. Exp. Bot.** v. 53, p. 1463–1473, 2002.

JUNIOR, P.C.P.F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (DUCKE) A.C. SMITH – Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, p.1-9, 2012.

KATARIA, N.; YADAV, K.; KUMARI, S.; SINGH, N. Micropropagation: An Important Tool for Conserving Forest Trees. **Tropical Agricultural Science**, v.36,, p.1-26, 2013.

MCCOWN, B.H. Adventitious Rooting of Tissue Cultured Plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings.** Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 289-302.

LEE, T.M.; Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured *in vitro*. **Plant Sci.** 122: 111–117, 1997.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.

- Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.1, p.437-496, 1962.
- MURINA, M. A.; *et al.* Chemiluminescence in a stimulated polymorphonuclear leukocytes – Luminol system: suppression by thiols. **Biofizika**, v. 50, p. 1100-1104, 2005.
- NAIJA, S.; ELLOUMI, N.; JBIR N.; AMMAR, S.; KEVERS, C. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. **Biologies**, v.331, p.518-525, 2008.
- NODOYE, M.; DIALLO, I.; GASSAMA, Y.K. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **African Journal of Biotechnology** vol. 2, p. 421-424, 2003.
- PASTUR, G.M.; ARENA, M.E.; BANAVIDES, M.P.; *et al.* Role of polyamines during *in vitro* rhizogenesis of *Nothofagus nervosa* using successive culture media. **New Forests**, v.34, p.83-93, 2005.
- PEREIRA, A.M.S.; AMUI, S.F.; BERTONI, B.W.; MORAES, R.M.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: Conservation of an Endangered Medicinal Plant. In: **Planta Medica – Natural Products and Medicinal Plant Research**. v.69, p.571-573, 2003.
- PEREIRA, A.M.S.; SALOMÃO, A.N.; JANUÁRIO, A.H.; BERTONI, B.W.; AMUI, S.F.; FRANÇA, S.C.; CERDEIRA, A.L.; MORAES, R.M. Seed germination and triterpenoid content of *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld varieties. **Genetic Resource and Crop Evolution**, v.54, p.849–854, 2007.
- PHELAN, S.; HUNTER, A.; DOUGLAS, G. C. Effect of explants source on shoot proliferation and adventitious regeneration in 10 Buddleia cultivars. **Scientia Horticulturae**, v.120, p. 518–524, 2009.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; MADDEGODA, K.M.M.N.; VITHARANA, M.C.; *et al.* Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. **Scientia Horticulturae** v.118, p.270–273, 2008.
- SHARMA, A.R.; TRIGIANO, R.N.; WITTE, W.T.; SCHWARZ, O.J. *In vitro* adventitious rooting of *Cornus florida* microshoots. Short communication. **Scientia Horticulturae**, v.103, p. 381-385, 2005.
- SANKHLA, A.; UPADHYAYA, A. Polyamines and adventitious root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 289-302.
- SOARES, F.P.; *et al.* Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* gomes. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 152-157, 2011.
- SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLLUCCI, S., CORREA, R. M. *In vitro* propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A Threatened Endemic Medicinal Plant. **Hortscience**, v.42, p.1665–1669, 2007.
- SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLLUCCI, S., TEIXEIRA, R.N. Enraizamento *in vitro* de plântulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.86-91, 2004.
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.9, p.103-117, 2007.
- TANG, W.; NEWTON, R. J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Science**, v. 167, p.621-628, 2004.
- TONON, G.; KEVERS, C.; GASPAR, T. Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during *in vitro* rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. **Tree Physiol.** v. 21, p. 655–663, 2001.
- URIBE, M.E.; MATER, M.E.; CAAL, M.J.; *et al.* Specific polyamine ratios as indicators of *Pinus caribaea* microshoot rooting phases. **Plant Biosystem**, v. 142, p.446-453, 2008.
- VASAR, V.; SVENSSON, M. Effects antioxidants on root formation and morphology of micropropagated *Prunus avium*. **New Phytologist**, 2005, p. 773-781.
- YANG, Y.K.; LEE, S.Y.; PARK, W.T.; PARK, N.; PARK, S.U. Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Nepeta cataria* L. **Plant Omics Journal POJ**, v.3, p. 190-193, 2010.