

ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF *Apuleia leiocarpa* PLANTLETS

ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE *Apuleia leiocarpa*

Kelen Haygert-Lencina*, Dilson Antônio-Bisognin, Paula Kielse, Nathalia Pimentel

Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. (khaygert@gmail.com)

ABSTRACT

Apuleia leiocarpa is an endangered tree species with high quality timber. Propagation by seed is difficult due to irregular fruiting and water-impermeable tegument, so asexual propagation is a promising alternative. This study aimed to evaluate *in vitro* and *ex vitro* rooting of *A. leiocarpa* and acclimatization of micropropagated plantlets. The hypothesis was that type of explant, indolebutyric acid (IBA) concentration and substrate influence the induction of adventitious roots in apuleia. For *in vitro* rooting, nodal segments and micro-cuttings were grown in Wood Plant Medium (WPM) with 0, 4.9, 9.8, 14.7 and 19.6 μM IBA. Compositions of commercial substrate + vermiculite + coarse sand and commercial substrate + vermiculite, in equal proportions, were tested for acclimatization. For *ex vitro* rooting, nodal segments and micro-cuttings were treated with 0 and 4920 μM IBA for 10 s and grown in equal proportions of: commercial substrate + vermiculite + coarse sand, commercial substrate + vermiculite, and commercial substrate + coarse sand. Nodal segments presented greater rooting *in vitro* than micro-cuttings without need for IBA supplementation in the culture medium. Substrate composition did not affect survival or growth of *in vitro* rooted plantlets during acclimatization. The best *ex vitro* rooting was found in nodal segments and explants treated with 4920 μM IBA and grown in commercial substrate + vermiculite + coarse sand. *Ex vitro* rooting is a promising technique for producing apuleia plantlets; however, adjustments to environmental conditions in both *ex vitro* rooting and acclimatization are necessary in order to maximize survival of micropropagated *A. leiocarpa* plantlets.

Key words: *Apuleia leiocarpa*, indolebutyric acid, micropropagation, micro-cuttings, substrate composition.

RESUMEN

Apuleia leiocarpa es una especie de árbol en peligro de extinción con madera de alta calidad. Su propagación por medio de semillas es difícil por que la aparición de frutos es irregular y por el tegumento impermeable al agua; así la propagación asexual es una alternativa prometedora. El objetivo de este estudio fue evaluar el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de *A. leiocarpa* y la aclimatación de plántulas micropropagadas. La hipótesis fue que el tipo de explante, la concentración de ácido indolbutírico (IBA) y el sustrato influyen en la inducción de raíces adventicias en *A. leiocarpa*. Para el enraizamiento *in vitro*, se cultivaron segmentos nodales y microcortes en un Medio de Plantación de Árboles (Wood Plant Medium) (WPM) con 0, 4.9, 9.8, 14.7 y 19.6 μM de IBA. Para la aclimatación se probaron mezclas de sustrato comercial + vermiculita + arena gruesa y sustrato comercial + vermiculita, en proporciones iguales. Para el enraizamiento *ex vitro*, se trataron segmentos nodales y microcortes con 0 y 4920 μM de IBA durante 10 s y se cultivaron en proporciones iguales de: sustrato comercial + vermiculita + arena gruesa, sustrato comercial + vermiculita y sustrato comercial + arena gruesa. Los segmentos nodales presentaron mayor enraizamiento *in vitro* que los microcortes sin suplemento de IBA en el medio de cultivo. La composición del sustrato no afectó la supervivencia o el crecimiento de las plántulas enraizadas *in vitro* durante la aclimatación. El mejor enraizamiento *ex vitro* se encontró en segmentos nodales y explantes tratados con 4920 μM IBA y cultivados en sustrato comercial + vermiculita + arena gruesa. El enraizamiento *ex vitro* es una técnica prometedora para producir plántulas de apuleia; sin embargo, se necesitan ajustes a las condiciones ambientales, en el enraizamiento *ex vitro* y en la aclimatación para maximizar la supervivencia de las plántulas micropropagadas de *A. leiocarpa*.

Palabras clave: *Apuleia leiocarpa*, ácido indolbutírico, micropropagación, microcortes, composición del sustrato.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: June, 2016. Approved: February, 2017.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 51: 909-920. 2017.

INTRODUCTION

A*puleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride is a tree species of the Fabaceae family native to Atlantic Rainforests and extensively distributed in Brazil. It also occurs naturally in Peru (Backes and Irgang, 2004), Uruguay (Sobral *et al.*, 2006), northeastern Argentina (Martinez-Crovetto, 1963), southern Bolivia and eastern Paraguay (Lopez *et al.*, 1987). It produces wood of excellent quality and high economic value, which is used for external structures, construction and carpentry (Carvalho, 2003). Thus, despite its broad natural distribution, the interest of the wood industry on harvesting *A. leiocarpa*, places the species at high risk of extinction (Rio Grande do Sul, 2014).

Production of *apuleia* seedlings is limited by some of its inherent characteristics, such as irregular fruiting overtime and seeds with tegument impermeability to water, which can delay germination (Carvalho, 2003). In addition to seminiferous reproduction, most forest species are heterozygous at many loci and highly heterogeneous populations, because of the process of plant reproduction by allogamy. An alternative option used in forestry to obtain superior and homogeneous reproductive materials for forest plantations is vegetative propagation (Xavier *et al.*, 2013), which justifies the higher cost of clonal seedlings. Studies aimed toward finding alternative production technologies are important and micropropagation may be a good option, since it is successfully applied to a number of tree species (Erig and Schuch, 2005).

Adventitious shoots produced in the multiplication stage in micropropagation can be rooted *in vitro* or *ex vitro*; however, the tissue capacity for root formation depends on several endogenous and / or exogenous factors and their interaction (Rocha *et al.*, 2008). The type of explant influences adventitious rooting responses of micropropagated plants, and its selection is based on seeking vegetative propagules that can provide better response to *in vitro* culture (Xavier *et al.*, 2013).

In vitro rooting is characterized by induction of adventitious roots in elongated shoots, kept in culture medium supplemented with auxins, in order to obtain complete plantlets that will be subsequently acclimatized (Oliveira *et al.*, 2013). For *ex vitro* rooting, explants might be treated with auxins and

INTRODUCCIÓN

A*puleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride es una especie de árbol de la familia *Fabaceae* nativa de los bosques tropicales y extensamente distribuida en Brasil. También crece naturalmente en Perú (Backes e Irgang, 2004), Uruguay (Sobral *et al.*, 2006), noreste de Argentina (Martínez-Crovetto, 1963), sur de Bolivia y este de Paraguay (López *et al.*, 1987). Produce madera de excelente calidad y alto valor comercial, que se usa para estructuras externas, construcción y carpintería (Carvalho, 2003). Así, a pesar de su amplia distribución natural, el interés de la industria maderera en cosechar *A. leiocarpa* coloca a la especie en un alto riesgo de extinción (Rio Grande do Sul, 2014).

La producción de plántulas de *A. leiocarpa* está limitada por algunas de sus características inherentes, como tiempos inusitados e irregulares en dar fruto y semillas con impermeabilidad al agua por el tegumento, lo que puede retrasar la germinación (Carvalho, 2003). Además de la reproducción seminífera, la mayoría de las especies forestales son heterocigóticas en muchos lugares y poblaciones altamente heterogéneas, debido al proceso de reproducción de las plantas por alogamia. Una opción alternativa usada en silvicultura para obtener materiales reproductivos superiores y homogéneos para las plantaciones forestales es la propagación vegetativa (Xavier *et al.*, 2013), lo que justifica el mayor costo de las plántulas clonales. Los estudios dirigidos a encontrar tecnologías de producción alternativas son importantes y la micropropagación puede ser una buena opción, porque se aplica con éxito a muchas especies de árboles (Erig y Schuch, 2005).

Los brotes adventicios producidos en la etapa de multiplicación en micropropagación pueden arraigarse *in vitro* o *ex vitro*; sin embargo, la capacidad de los tejidos para la formación de raíces depende de varios factores endógenos o exógenos y de su interacción (Rocha *et al.*, 2008). El tipo de explante influye en las respuestas de enraizamiento adventicias de las plantas micropropagadas y su selección se basa en la búsqueda de propágulos vegetativos que pueden proporcionar una mejor respuesta al cultivo *in vitro* (Xavier *et al.*, 2013).

El enraizamiento *in vitro* se caracteriza por la inducción de raíces adventicias en brotes alargados, mantenidos en un medio de cultivo con un suplemento de

planted in substrate for root formation concomitant to acclimatization. Indolebutyric acid (IBA) has shown high effectiveness in promoting adventitious roots on plantlets of forest species (Xavier *et al.*, 2013).

Acclimatization is essential to obtain new plantlets (Wendling *et al.*, 2006) and consists of transferring complete plants produced *in vitro* to an external environment. This process should be modified gradually and with care. To minimize stress at this stage and maximize survival, it is important to manage adequately air relative humidity, substrate conditions, temperature and light (Oliveira *et al.*, 2013). The substrate used during acclimatization should present adequate porosity and high water retention capacity (Girardi and Pescador, 2010), so the choice of substrate is determinant for effective acclimatization in micropropagated plantlets (Skrebsky *et al.*, 2006).

The hypothesis for this study was that the type of explant, concentration of IBA applied and substrate composition influences the rhizogenic process and acclimatization. The objective of this study was to evaluate the effect of type of explants and concentration of IBA on *in vitro* rooting and influence of type of explants and substrate composition on *ex vitro* rooting and acclimatization of *apuleia* micropropagated plantlets.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted from September 2012 to February 2013 in the Department of Plant Sciences of the Federal University of Santa Maria in Brazil. In experiments using substrate, one sample of each composition was submitted to physical analysis, according to the method described in Norm n° 14 of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply to obtain data of dry density, aeration porosity and water retention capacity under suction of a 10 cm water column.

Explants for *in vitro* and *ex vitro* experiments

Aseptic seedlings, obtained from the *in vitro* germination of *A. leiocarpa* seeds, from three mother plants, were established in Wood Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1980) for 15 d (Figure 1A). The aerial part the seedlings were sectioned into nodal segments (Figure 1B), which were kept for 30 d in WPM medium supplemented with 8.8 μM of benzylaminopurine (BAP), and then transferred to BAP-free medium for another

auxinas, con el fin de obtener plántulas completas que después serán aclimatadas (Oliveira *et al.*, 2013). Para el enraizamiento *ex vitro*, los explantes se pueden tratar con auxinas y plantados en sustrato para la formación de raíces concomitante a la aclimatización. El ácido indolbutírico (IBA) ha mostrado alta eficacia en la promoción de raíces adventicias en las plántulas de especies forestales (Xavier *et al.*, 2013).

La aclimatización es esencial para obtener nuevas plántulas (Wendling *et al.*, 2006) y consiste en transferir plantas completas producidas *in vitro* a un ambiente externo. Este proceso se debe modificar gradualmente y con precaución. Para minimizar el estrés en esta etapa y maximizar la supervivencia, es importante manejar adecuadamente la humedad relativa del aire, las condiciones del sustrato, la temperatura y la luz (Oliveira *et al.*, 2013). El sustrato usado durante la aclimatización debe presentar una porosidad adecuada y una alta capacidad de retención de agua (Girardi y Pescador, 2010); así, la elección del sustrato es determinante para la aclimatización efectiva en plántulas micropropagadas (Skrebsky *et al.*, 2006).

La hipótesis de este estudio fue que el tipo de explante, la concentración de IBA aplicada y la composición del sustrato influyen en el proceso rizogénico y en la aclimatización. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tipo de explante y la concentración de IBA en el enraizamiento *in vitro* y la influencia del tipo de explante y la composición del sustrato en el enraizamiento *ex vitro* y la aclimatización de las plántulas micropropagadas de *A. leiocarpa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron de septiembre de 2012 a febrero de 2013 en el Departamento de Ciencias Vegetales de la Universidad Federal de Santa María en Brasil. En los experimentos con sustrato, una muestra de cada composición sometió a análisis físico según el método descrito en la Norma n° 14 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento de Brasil, para obtener la densidad seca, porosidad de aireación y capacidad de retención de agua bajo succión de una columna de agua de 10 cm.

Explantos para experimentos *in vitro* y *ex vitro*

Las plántulas asépticas obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas de *A. leiocarpa*, de tres plantas madre, se establecieron en Wood Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1980) por 15 d (Figura 1A). La parte aérea de las plántulas se seccionó en

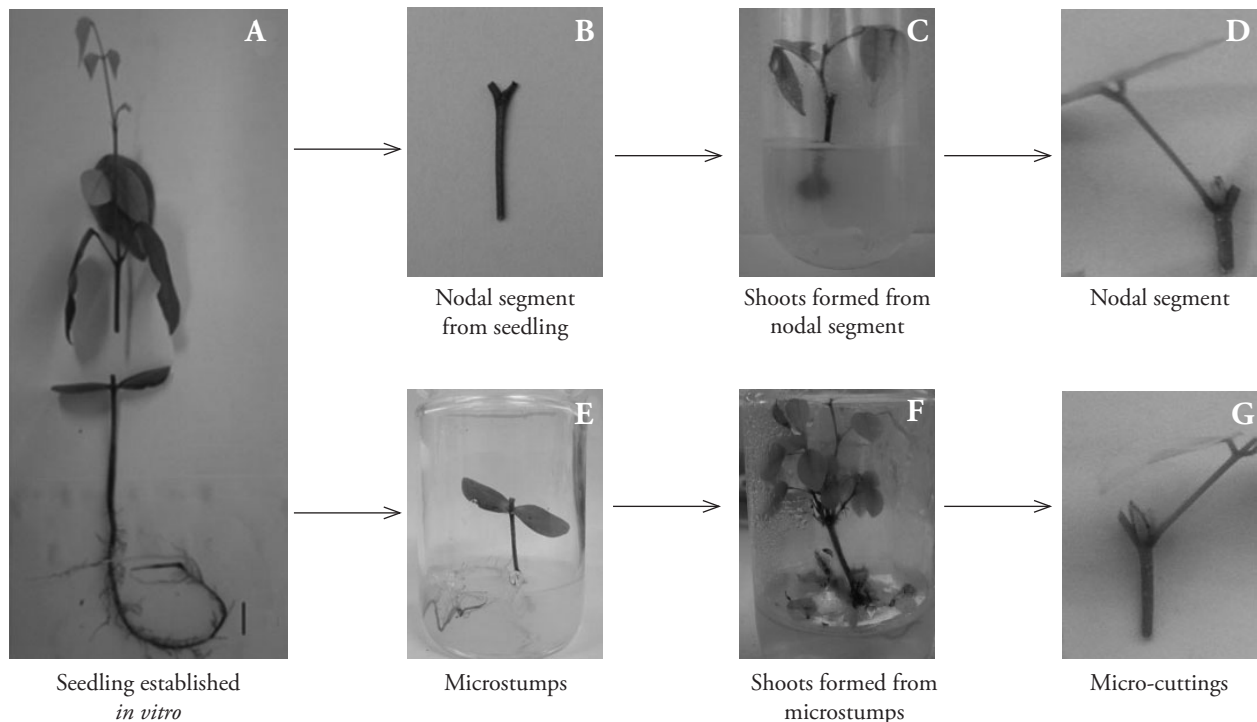


Figure 1. Stages to obtain nodal segments and micro-cuttings utilized in *Apuleia leiocarpa* rooting.
Figure 1. Etapas para obtener segmentos nodales y microcortes utilizados en el enraizamiento de *Apuleia leiocarpa*.

30 d. The shoots formed by the end of this period (Figure 1C) were sectioned, again into nodal segments, with only one-bud and used for *in vitro* and *ex vitro* rooting (Figure 1D). The root system and the aerial part remaining in the aseptic seedlings, called microstumps, were maintained in WPM medium supplemented with $8.8 \mu\text{M}$ BAP for 30 d and then transferred to BAP-free medium where they remained for another 30 d (Figure 1E). The shoots formed from the microstumps (Figure 1F) were sectioned into one-bud micro-cuttings, which were also used for *in vitro* and *ex vitro* rooting experiments (Figure 1G). Thus, the explants differed in origin. Nodal segments were produced from the aerial segments, whereas micro-cuttings were produced from microstumps formed from the root system and the remaining aerial part.

***In vitro* rooting and acclimatization**

For *in vitro* rooting, nodal segments and one-bud micro-cuttings, with 1.0 to 1.5 cm in length, were grown in glass culture tubes (50 mL) containing approximately 10 mL WPM medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose, 6 g L^{-1} agar, 0.1 g L^{-1} inositol and 1.5 g L^{-1} activated charcoal. Culture media was sterilized by autoclaving during 20 min at 121°C and 1 atm pressure. The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving and all

segmentos nodales (Figura 1B), que se mantuvieron 30 d en el medio WPM más suplemento con $8.8 \mu\text{M}$ de bencilaminopurina (BAP), y luego se transfirieron a un medio sin BAP otros 30 d. Los brotes formados al final de este período (Figura 1C) se seccionaron nuevamente en segmentos nodales, con sólo un brote y se usaron para el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* (Figura 1D). El sistema radicular y la parte aérea remanente en las plántulas asépticas, denominadas microcepas, se mantuvieron en el medio WPM más suplemento con BAP $8.8 \mu\text{M}$ por 30 d y después se trasladaron a un medio libre de BAP donde permanecieron 30 d más (Figura 1E). Los brotes formados desde las microcepas (Figura 1F) se seccionaron en microcortes de un brote, que también se usaron para experimentos de enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* (Figura 1G). Así, los explantes difirieron en origen. Segmentos nodales se produjeron desde los segmentos aéreos, mientras que los microcortes se produjeron desde microcepas formados por el sistema radicular y la parte aérea restante.

Enraizamiento *in vitro* y aclimatación

Para el enraizamiento *in vitro*, se cultivaron segmentos nodales y microcortes de un brote de 1.0 a 1.5 cm de longitud en tubos de cultivo de vidrio (50 mL) que contenían aproximadamente 10 mL del medio WPM con $30 \text{ g de sacarosa L}^{-1}$, 6 g de

cultures were maintained in a growth room at temperature of 25 ± 2 °C on a 16 h photoperiod under light intensity of $14.3 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ supplied by fluorescent lamps. Indolebutyric acid (IBA) concentrations of 0, 4.9, 9.8, 14.7 and $19.6 \mu\text{M}$ were tested. The experiment was a factorial 2×5 (type of explant and IBA concentration), with five replications of four explants. Survival and rooting percentages and number and length (cm) of roots were evaluated after 60 d in culture.

For acclimatization, the explants rooted *in vitro* in five concentration of IBA were removed from the glass culture tubes. The roots were washed in running water and randomly transferred to individual plastic pots (330 mL), with approximately 110 g substrate; this was previously sterilized by autoclaving for 1 h. Equal proportions of commercial substrate + vermiculite + coarse sand and commercial substrate + vermiculite were evaluated. In all treatments, pine bark commercial substrate (H.DECKER®), medium vermiculite (particles between 0.50 and 1.19 mm diameter) and coarse sand (particles between 1.0 and 3.0 mm diameter) were used. The containers were kept in a growth room in plastic trays (55 x 34 x 15 cm) covered with transparent PVC film. Irrigation was applied daily using distilled water to maintain substrate humidity. Once a week, irrigation applied contained nutrient solution with (mmol): 0.61 potassium nitrate, 1.0 calcium nitrate, 1.67 magnesium sulfate, 0.14 ammonium nitrate, 0.14 potassium monophosphate and 0.16 5% chelated iron. The micronutrients were added to the nutrient solution in a prepared solution (mmol): 0.015 sodium molybdate, 0.089 boric acid, 0.125 copper sulfate, 0.123 manganese sulfate and 0.028 zinc sulfate. The experiment was a complete random design, with two treatments and eight replications of four containers with one plantlet. After 30 d of growth, survival percentage, height of the aerial part (cm) and number of leaves were evaluated.

***Ex vitro* rooting and acclimatization**

Nodal segments and one-bud micro-cuttings (Figure 1), with 1.0 to 1.5 cm length, excised from shoots produced during *in vitro* multiplication, were put with the base immersed in a solution with 0 or $4920 \mu\text{M}$ IBA, for 10 s. Then they were grown in plastic containers (50 mL) containing approximately 20 g of substrate, previously sterilized by autoclaving for 1 h. Equal proportions of the compositions of substrate were tested: commercial substrate + vermiculite + coarse sand, commercial substrate + vermiculite, and commercial substrate + coarse sand. Pine bark commercial substrate and medium grain vermiculite were used. The containers were kept in trays covered by transparent PVC film for 7 d in a room at 25 ± 2 °C and 16 h photoperiod under $14.3 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity supplied by fluorescent lamps. Two irrigations with distilled water were applied daily to maintain substrate humidity. Then, the

agar L^{-1} , 0.1 g de inositol L^{-1} y 1.5 g de carbón activado L^{-1} . El medio de cultivo se esterilizó 20 min por autoclave a 121 °C y presión de 1 atm. El pH se ajustó a 5.8 antes del autoclavado y todos los cultivos se mantuvieron en una habitación de crecimiento a una temperatura de 25 ± 2 °C en un fotoperíodo de 16 h bajo una intensidad de luz de $14.3 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ suministrado por lámparas fluorescentes. Se probaron concentraciones de 0, 4.9, 9.8, 14.7 y $19.6 \mu\text{M}$ de ácido indolbutírico (IBA). El experimento fue un factorial 2×5 (tipo de explante y concentración de IBA), con cinco repeticiones de cuatro explantes. Los porcentajes de supervivencia y enraizamiento y el número y la longitud (cm) de las raíces se evaluaron después de 60 d en cultivo.

Para la aclimatación, los explantes arraigados *in vitro* en cinco concentraciones de IBA se retiraron de los tubos de cultivo de vidrio. Las raíces se lavaron con agua corriente y se transfirieron al azar a macetas de plástico individuales (330 mL), con cerca de 110 g de sustrato; antes, esto se esterilizó 1 h en autoclave. Se evaluaron proporciones iguales de sustrato comercial + vermiculita + arena gruesa y sustrato comercial + vermiculita. En todos los tratamientos se usaron sustrato comercial de corteza de pino (H.DECKER®), vermiculita mediana (partículas entre 0.50 y 1.19 mm de diámetro) y arena gruesa (partículas entre 1.0 y 3.0 mm de diámetro). Los recipientes se mantuvieron en una sala de cultivo en bandejas de plástico (55 x 34 x 15 cm) cubiertas con una película de PVC transparente. El riego se aplicó cada día con agua destilada para mantener la humedad del sustrato. Una vez a la semana, se aplicó un riego con una solución nutritiva (mmol): 0.61 nitrato de potasio, 1.0 nitrato de calcio, 1.67 sulfato de magnesio, 0.14 nitrato de amonio, 0.14 monofosfato de potasio y 0.16 % hierro quelado. Los micronutrientes se añadieron a la solución nutritiva en una solución preparada (mmol): 0.015 molibdato sódico, 0.089 ácido bórico, 0.125 sulfato de cobre, 0.123 sulfato de manganeso y 0.028 sulfato de zinc. El experimento se hizo con un diseño completamente aleatorio, con dos tratamientos y ocho repeticiones de cuatro contenedores con una plántula. Después de 30 d de crecimiento, se evaluó el porcentaje de supervivencia, la altura de la parte aérea (cm) y el número de hojas.

Enraizamiento y aclimatación *ex vitro*

Segmentos nodales y microcortes de un brote (Figura 1) de una longitud de 1.0 a 1.5 cm, excisados de los brotes producidos durante la multiplicación *in vitro*, se colocaron con la base sumergida en una solución con 0 o $4920 \mu\text{M}$ de IBA, por 10 s. Luego se cultivaron en recipientes de plástico (50 mL) que contenían cerca de 20 g de sustrato, ya esterilizados en autoclave 1 h. Proporciones iguales de las composiciones de sustrato fueron evaluadas: sustrato comercial + vermiculita + arena gruesa, sustrato comercial + vermiculita, y sustrato comercial + arena

cultures were transferred to a moist chamber in an acclimatized greenhouse where they were grown for 45 d. The experimental design was complete random with a factorial arrangement 2 x 2 x 3 (explant type, IBA concentration and substrate composition), with five replication of five containers with one explants. After 7, 15, 30, and 45 d in a moist chamber, survival and rooting percentage and number and length (cm) of roots were evaluated in the explants.

The percentage data were transformed by the arc-sine function of $\sqrt{x/100}$ and ANOVA. Means were compared by Tukey test ($p \leq 0.05$), using ESTAT software (Estat, 1994).

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro rooting and acclimatization

For *in vitro* rooting, there was no interaction between explant type and IBA concentration for all variables analyzed at 60 d. For survival, rooting and root length, there were differences for explant type, with the best results found in nodal segments (97.5 % survival, 28.9 % rooting and 6.2 cm mean root length) as compared to micro-cuttings (Table 1). Both nodal segments and micro-cuttings are originated from pre-formed meristematic organs (axillary bud), which generally present satisfactory

gruesa. Sustrato comercial de corteza de pino y vermiculita de grano medio se utilizaron. Los contenedores se mantuvieron 7 d en bandejas cubiertas con película de PVC transparente en una habitación a 25 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 h con una intensidad luminosa de $14,3 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ suministrada por lámparas fluorescentes. Dos riegos con agua destilada se aplicaron cada día para mantener la humedad del sustrato. Luego los cultivos se trasladaron a una cámara húmeda en un invernadero aclimatado donde se cultivaron 45 d. El diseño experimental fue completamente al azar y con arreglo factorial 2 x 2 x 3 (tipo de explante, concentración de IBA y composición del sustrato), con cinco repeticiones de cinco contenedores con un explante. Después de 7, 15, 30 y 45 d en una cámara húmeda, se evaluó el porcentaje de supervivencia y enraizamiento y el número y longitud (cm) de las raíces en los explantes.

Los datos porcentuales fueron transformados por la función arco-seno $\sqrt{x/100}$ de y ANOVA. Los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey con $p=0.05$, utilizando el software ESTAT (Estat, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Enraizamiento *in vitro* y aclimatación

Para el enraizamiento *in vitro*, no hubo interacción entre el tipo de explante y la concentración de

Table 1. Survival and rooting percentages and number and length of roots formed from nodal segments and micro-cuttings of *Apuleia leiocarpa* grown *in vitro* for 60 days in WPM medium with five concentrations of IBA.

Cuadro 1. Porcentajes de supervivencia y enraizamiento y número y longitud de raíces formadas a partir de segmentos nodales y microcortes de *Apuleia leiocarpa* cultivadas *in vitro* durante 60 días en medio WPM con cinco concentraciones de IBA.

Factor and levels	Survival (%)	Rooting (%)	Root number	Root length (cm)
Explant type				
Nodal segment	97.5 a [†]	28.9 a	1.8 a	6.2 a
Micro-cutting	92.3 b	11.8 b	1.8 a	2.8 b
IBA (μM)				
0	96.1 a	20.3 a	1.9 a	6.3 a
4.9	96.6 a	14.3 a	2.4 a	4.1 ab
9.8	92.5 a	26.4 a	1.5 a	5.5 a
14.7	94.1 a	21.5 a	1.4 a	3.0 b
19.6	93.7 a	19.2 a	1.8 a	3.9 ab
Mean	94.6	20.3	1.8	4.5
SE	2.43	4.05	0.07	0.12
CV (%)	12.9	74.5	21.3	26.6

[†] Values within the same factor with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$). SE: Standard error; CV: Coefficient of variation ♦ Valores dentro del mismo factor con letra diferente son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). SE: Error estándar; CV: coeficiente de variación.

growth and uniformity (Watt *et al.*, 2003). We believe that the different responses among the explant types do not derive from differing morphogenic competences, since they are formed from the same meristematic tissue, but rather because they present differing endogenous concentrations of phytohormones. Auxin synthesis takes place in the plant apex and presents unidirectional movement in the parenchymatous tissues toward the root apex (Taiz and Zeiger, 2013). Because of this the greater rooting capacity in the *A. leiocarpa* nodal segments may be related to a higher quantity of endogenous auxin in comparison to that of the micro-cuttings, since this phytohormone acts as a cell signaler in rooting. Contrasting from our results, Pimentel *et al.* (2016) found that micro-cuttings explants of *Handroanthus heptaphyllus* showed better *in vitro* rooting response compared to nodal segments.

IBA concentrations did not influence the evaluated variables, except for root length, where the best results were observed in explants grown in IBA-free medium or with $9.8 \mu\text{M}$ IBA (Table 1). Many forest species present difficulties of adventitious rooting even in culture medium supplemented with auxins, indicating that other factors influence the differentiation of the tissues during this process (Souza and Junghans, 2006). In addition, it is possible that the concentrations of IBA used were not adequate to favor *in vitro* rooting of apuleia. Inefficient *in vitro* rooting was also observed in *Lavandula angustifolia* (Miller) treated with 0.5, 1.0 and $2.0 \mu\text{M}$ of IBA (Machado *et al.*, 2013).

In the acclimatization of *A. leiocarpa* plantlets produced *in vitro*, the substrate compositions evaluated did not affect survival, height of the aerial part and number of leaves, with a mean of 73.4 % surviving plantlets after 30 d of growth (Table 2). In the acclimatization of *Cydonia oblonga* Mill. micropropagated plantlets, there was 81.8 % survival at 30 d when commercial substrate and vermiculite (v/v 1:1) were used (Erig *et al.*, 2004). *Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville plantlets obtained from *in vitro* rooting presented 41 % survival when acclimatized in commercial substrate and vermiculite (v/v 1:1), at 30 d of growth (Nicioli *et al.*, 2008). The combination of soil and vermicomposting (v/v 3:1) resulted in 80 % survival of *Azadirachta indica* A. Juss plantlets after 30 d of acclimatization (Reddy *et al.*, 2006). An average survival of 73 % was

IBA para todas las variables analizadas a los 60 d. Para la supervivencia, el enraizamiento y la longitud de la raíz, hubo diferencias en el tipo de explante, con los mejores resultados encontrados en segmentos nodales (97.5 % de supervivencia, 28.9 % de enraizamiento y 6.2 cm de longitud media de raíz) en comparación con microcortes (Cuadro 1). Tanto los segmentos nodales como los microcortes se originan de órganos meristemáticos preformados (yema axilar), que por lo general presentan un crecimiento y uniformidad satisfactorios (Watt *et al.*, 2003). Creemos que las diferentes respuestas entre los tipos de explantes no derivan de diferentes competencias morfogénicas, ya que se forman a partir del mismo tejido meristemático, sino más bien porque presentan diferentes concentraciones endógenas de fitohormonas. La síntesis de auxina ocurre en el ápice de la planta y presenta un movimiento unidireccional en los tejidos parenquimatosos hacia el ápice de la raíz (Taiz y Zeiger, 2013). Debido a esto, la mayor capacidad de enraizamiento en los segmentos nodales de *A. leiocarpa* puede estar relacionada con una mayor cantidad de auxina endógena en comparación con la de los microcortes, ya que esta fitohormona actúa como un señalizador celular en el enraizamiento.

En contraste a nuestros resultados, Pimentel *et al.* (2016) encontraron que los explantes de microcortes de *Handroanthus heptaphyllus* mostraron una mejor respuesta de enraizamiento *in vitro* en comparación con los segmentos nodales.

Las concentraciones de IBA no influyeron en las variables evaluadas, excepto en la longitud de la raíz, donde se observaron los mejores resultados en explantes cultivados en un medio sin IBA o con $9.8 \mu\text{M}$ IBA (Cuadro 1). Muchas especies forestales presentan dificultades de enraizamiento adventicio, incluso en un medio de cultivo con suplemento de auxinas, lo que indica que otros factores influyen en la diferenciación de los tejidos durante este proceso (Souza y Junghans, 2006). Además, es posible que las concentraciones de IBA utilizadas no fueran adecuadas para favorecer el enraizamiento *in vitro* de *A. leiocarpa*. También se observó enraizamiento *in vitro* ineficiente en *Lavandula angustifolia* (Miller) tratado con 0.5, 1.0 y $2.0 \mu\text{M}$ de IBA (Machado *et al.*, 2013).

En la aclimatación de las plántulas de *A. leiocarpa* producidas *in vitro*, las composiciones de sustrato evaluadas no afectaron la supervivencia, la altura de

Table 2. Survival percentage, height of aerial part and number of leaves of *Apuleia leiocarpa* plantlets rooted *in vitro* and acclimatized for 30 days in growth room.

Cuadro 2. Porcentaje de supervivencia, altura de la parte aérea y número de hojas de las plántulas de *Apuleia leiocarpa* enraizadas *in vitro* y aclimatadas durante 30 días en sala de crecimiento.

Substrate [†]	Survival (%)	Aerial part height (cm)	Number of leaves
CS + V + S	62.5 a [*]	1.2 a	2.0 a
CS + V	84.4 a	1.2 a	3.1 a
Mean	73.4	1.2	2.5
SE	3.44	0.03	0.12
CV (%)	30.1	15.1	42.2

[†]Values with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$). SE: Standard error; CV: coefficient of variation ♦ [†]Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). SE: Error estándar; CV: coeficiente de variación.

^{*}Equal proportions (v/v) of commercial substrate (CS), vermiculite (V) and coarse sand (S) ♦ ^{*}Proporciones iguales (v/v) de sustrato comercial (CS), vermiculita (V) y arena gruesa (S).

observed in *Pterocarpus santalinus* L. plantlets during acclimatization in a combination of organic manure and sand (v/v 1:1) (Balaraju *et al.*, 2011). In our study, the acclimatization conditions provided during the transition from heterotrophic to autotrophic state may have been adequate to favor survival of plantlets.

***Ex vitro* rooting and acclimatization**

There was no significant interaction between explant types, IBA concentration or substrate for all variables analyzed at 7, 15, 30, and 45 d. Root formation occurred only at 30 d of growth; however, without differences among explant types, IBA concentration or substrate for any of the variables analyzed. At 45 d of evaluation, survival was affected only by explant type, with the best response found in nodal segments when compared to micro-cuttings (Table 3). For *ex vitro* rooting, the best responses were in the nodal segments (14.6 % rooting), 4,920 μ M IBA (12 % of rooted explants) and in commercial substrate + vermiculite+ coarse sand (14 % rooted explants) (Table 3).

Despite the small number of experimental units evaluated in our study, these results suggest that nodal segments respond better to *ex vitro* rooting

la parte aérea y el número de hojas, con una media de 73.4 % de plántulas supervivientes después de 30 d de crecimiento (Cuadro 2). En la aclimatación de *Cydonia oblonga* Mill. de plántulas micropropagadas, hubo 81.8 % de supervivencia a los 30 d cuando se utilizó sustrato comercial y vermiculita (v/v 1: 1) (Erig *et al.*, 2004). Las plántulas de *Stryphnodendron adstringens* Mart. obtenidas de un enraizamiento *in vitro* presentaron 41 % de supervivencia cuando se aclimataron en sustrato comercial y vermiculita (v/v 1: 1), a los 30 d de crecimiento (Nicioli *et al.*, 2008).

La combinación de suelo y vermicompostación (v/v 3: 1) resultó en una supervivencia de 80 % de las plántulas de *Azadirachta indica* A. Juss después de 30 d de aclimatación (Reddy *et al.*, 2006). La supervivencia promedio fue 73 % en las plántulas de *Pterocarpus santalinus* L. durante la aclimatación, en una combinación de estiércol orgánico y arena (v/v 1: 1) (Balaraju *et al.*, 2011). En nuestro estudio, las condiciones de aclimatación proporcionadas durante la transición del estado heterotrófico al autotrófico pueden haber sido adecuadas para favorecer la supervivencia de las plántulas.

Enraizamiento *ex vitro* y aclimatación

No hubo interacción significativa entre los tipos de explantes, la concentración de IBA o el sustrato para todas las variables analizadas a los 7, 15, 30 y 45 d. La formación de raíces ocurrió sólo a los 30 d de crecimiento, pero sin diferencias entre los tipos de explantes, la concentración de IBA o el sustrato para cualquiera de las variables analizadas. A los 45 d de evaluación, la supervivencia fue afectada sólo por el tipo de explante, con la mejor respuesta en los segmentos nodales, comparada con los microcortes (Cuadro 3). Para el enraizamiento *ex vitro*, las mejores respuestas fueron en los segmentos nodales (14.6 % de enraizamiento), 4,920 μ M de IBA (12 % de explantes enraizados) y en sustrato comercial + vermiculita + arena gruesa (14 % de explantes enraizados) (Cuadro 3).

A pesar del pequeño número de unidades experimentales evaluadas en nuestro estudio, estos resultados sugieren que los segmentos nodales responden mejor al enraizamiento *ex vitro* en comparación con los microcortes. Además, para el enraizamiento *ex vitro* en *A. leiocarpa*, el uso de IBA es necesario, contrario a los hallazgos en el enraizamiento *in vitro*. En los brotes obtenidos de la multiplicación *in vitro* de

Table 3. Survival and rooting percentage of *Apuleia leiocarpa* nodal segments and micro-cuttings treated with IBA and grown *ex vitro* for 45 days in different substrates.**Cuadro 3. Porcentaje de supervivencia y enraizamiento de los segmentos nodales de *Apuleia leiocarpa* y microcortes tratados con IBA y cultivados *ex vitro* durante 45 días en diferentes sustratos.**

Factor and levels	Survival (%)	Rooting (%)	Root number	Root length (cm)
Explant type				
Nodal segment	33.3 a [†]	14.6 a	1.1 a	1.3 a
Micro-cutting	14.0 b	3.3 b	1.3 a	0.9 a
IBA (μ M)				
0	22.6 a	6.6 b	1.6 a	1.4 a
4920	24.6 a	12.0 a	0.9 b	0.8 b
Substrates [‡]				
CS + V + S	21.0 a	14.0 a	1.6 a	1.5 a
CS + V	23.0 a	9.0 b	1.2ab	1.3 a
CS + S	27.0 a	4.0 b	0.9 b	0.6 b
Mean	23.6	9.0	1.2	1.1
SE	2.68	2.07	0.03	0.05
CV (%)	41.9	62.3	14.0	22.1

[†]Values within the same factor followed by the same letter do not differ by Tukey test at $p=0.05$. SE: Standard error; CV: coefficient of variation \diamond [‡]Los valores dentro del mismo factor seguidos por la misma letra no difieren en la prueba de Tukey con $p=0.05$. SE: Error estándar; CV: coeficiente de variación.

[‡]Equal proportions (v/v) of commercial substrate (CS), vermiculite (V) and coarse sand (S)

\diamond [†]Proporciones iguales (v/v) de sustrato comercial (CS), vermiculita (V) y arena gruesa (S).

when compared to micro-cuttings. In addition, for *ex vitro* rooting in *Apuleia leiocarpa*, IBA use is necessary, contrary to findings for *in vitro* rooting. In shoots obtained from *in vitro* multiplication of *Tectona grandis* L. treated with 4,920 μ M IBA and grown in commercial substrate or vermiculite 100 % *ex vitro* rooting was observed at 30 d of growth, whereas in those not treated with IBA, 85 % rooting was observed in vermiculite and 95 % rooting in commercial substrate (Fermino *et al.*, 2011). Micro-cuttings of *T. grandis* treated with 2460 μ M of IBA resulted in 85 % rooting in vermiculite at 30 d (Ramesh *et al.*, 2009). Micro-cuttings of *Dalbergia sissoo* Roxb. treated with 984 μ M IBA presented a 90 % of *ex vitro* rooting in a commercial peat, perlite and vermiculite (Vibha *et al.*, 2014).

For root number and length, there were IBA concentration and substrate composition effects at 45 d of growth (Table 3). The greatest number and length of roots were obtained in cultures not treated with IBA, with averages of 1.6 and 1.4 cm, or grown in commercial substrate + vermiculite + sand or in commercial substrate+ vermiculite (Table 3).

Tectona grandis L. tratada con 4920 μ M IBA y cultivada en sustrato comercial o vermiculita, se observó un enraizamiento *ex vitro* de 100 % a los 30 días de crecimiento, mientras que en los no tratados con IBA se observó un 85 % de enraizamiento en vermiculita y 95 % de enraizamiento en sustrato comercial (Fermino *et al.*, 2011). Los microcortes de *T. grandis* tratados con 2460 μ M de IBA resultaron en 85 % de enraizamiento en vermiculita a los 30 d (Ramesh *et al.*, 2009). Los microcortes de *Dalbergia sissoo* Roxb. tratados con 984 μ M IBA presentaron 90 % de enraizamiento *ex vitro* en turba comercial, perlita y vermiculita (Vibha *et al.*, 2014).

En número de raíces y longitud, hubo concentración de IBA y efectos de la composición del sustrato a los 45 d de crecimiento (Cuadro 3). El mayor número y longitud de raíces se obtuvieron en cultivos no tratados con IBA, con promedios de 1.6 y 1.4 cm respectivamente, o cultivados en sustrato comercial + vermiculita + arena o en sustrato comercial + vermiculita (Cuadro 3). Con base en el análisis físico, la composición de proporciones iguales de sustrato comercial + vermiculita + arena presentó densidad

Based on physical analysis, the composition of equal proportions of commercial substrate + vermiculite + sand presented dry density of 770.7 kg m^{-3} , aeration porosity of 25.3 % and water retention capacity of 38.7 %. Whereas commercial substrate + vermiculite presented 277.8 kg m^{-3} dry density, 19.9 % aeration porosity and 57.2 % water retention capacity and commercial substrate + sand presented dry density of 997.1 kg m^{-3} , 29.6 % aeration porosity and 30.9 % water retention capacity. In commercial substrate + vermiculite + sand and commercial substrate + sand, higher dry density was reported in comparison to reference values between 400 and 500 kg m^{-3} (Bunt, 1973). This result may be explained by the presence of sand in these mixtures, which is a highly dense component. The three combinations of substrates tested in our study presented adequate aeration porosity, within the range recommended by De Boodt and Verdonck (1972) between 20 and 40 %. For production of *Sesbania virgata* Cav. Pers seedlings, aeration porosity of up to 25 % increased root production after 150 d (Delarmelina *et al.*, 2014).

Higher water retention capacity values were observed in the commercial substrate + vermiculite + sand and commercial substrate + vermiculite compositions, which may be related to the lower proportion of sand in comparison to commercial substrate + sand. Thus, the greater *Apuleia leiocarpa* explants rooting in commercial substrate + vermiculite + sand (Table 3) may be associated to higher water retention capacity provided by this substrate composition.

The results of our study demonstrate that *Apuleia leiocarpa* is a species with difficult rooting *in vitro* and *ex vitro* considering that the highest rooting percentages were 28.9 % and 14.0 %, respectively. In both *in vitro* and *ex vitro* rooting, nodal segments presented higher rooting capacity when compared to micro-cuttings. However, even though there was significantly higher rooting in nodal segments, both explants presented rooting *in vitro*. In addition, considering that maintenance of microstumps may be an important strategy for increasing multiplication rate in *A. leiocarpa*, additional studies should be performed to find solutions to minimize these differences. In relation to the use of auxin, the concentrations of IBA evaluated did not alter rooting percentage *in vitro*, but did favor *ex vitro* rooting.

seca de 770.7 kg m^{-3} , porosidad de aireación de 25.3 % y la capacidad de retención de agua de 38.7 %. Mientras que el sustrato comercial + vermiculita presentó 277.8 kg m^{-3} de densidad seca, 19.9 % de porosidad de aireación y 57.2 % de capacidad de retención de agua, y el sustrato comercial + arena presentó densidad seca de 997.1 kg m^{-3} , 29.6 % de porosidad de aireación y 30.9 % de capacidad de retención de agua. En el sustrato comercial + vermiculita + arena y sustrato comercial + arena, se reportó una mayor densidad seca en comparación con valores de referencia entre 400 y 500 kg m^{-3} (Bunt, 1973). Este resultado se puede explicar por la presencia de arena en estas mezclas, que es un componente altamente denso. Las tres combinaciones de sustratos probadas en nuestro estudio presentaron una porosidad de aireación adecuada, dentro del rango recomendado por De Boodt y Verdonck (1972), entre 20 y 40 %. Para la producción de plántulas de *Sesbania virgata* Cav. Pers, la porosidad de aireación de hasta 25 % aumentó la producción de raíces después de 150 d (Delarmelina *et al.*, 2014).

Valores más altos de capacidad de retención de agua se observaron en el sustrato comercial + vermiculita + arena y sustrato comercial + arena, lo cual puede estar relacionado con la menor proporción de arena en comparación con el sustrato comercial + arena. Así, los mayores explantados de *A. leiocarpa* enraizados en sustrato comercial + vermiculita + arena (Cuadro 3) pueden estar asociados a una mayor capacidad de retención de agua derivada de esta composición del sustrato.

Los resultados de muestreo estudio demuestran que *A. leiocarpa* es una especie con difícil enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, dado que los mayores porcentajes de enraizamiento fueron 28.9 % y 14.0 %, respectivamente. Tanto en el enraizamiento *in vitro* como en el *ex vitro*, los segmentos nodales presentaron una mayor capacidad de enraizamiento que los microcortes. Sin embargo, aunque hubo un enraizamiento significativamente mayor en los segmentos nodales, ambos explantes presentaron enraizamiento *in vitro*. Además, al considerar que el mantenimiento de microcepas puede ser una estrategia importante para aumentar la tasa de multiplicación en *A. leiocarpa*, es necesario realizar más estudios para encontrar soluciones que minimicen estas diferencias. En relación al uso de auxina, las concentraciones de IBA evaluadas no alteraron el porcentaje de enraizamiento

In *ex vitro* rooting, 14% of the explants rooted in commercial substrate + vermiculite + sand, showing adjustments are needed to better define ideal conditions for *ex vitro* rooting and acclimatization of *A. leiocarpa* plantlets. In addition, these plantlets can be utilized in micro-clonal hedges (for plantlet production by micro-cuttings), which would make their mass production technically viable.

CONCLUSIÓN

Use of IBA is not necessary for *in vitro* rooting of *Apuleia leiocarpa* nodal segments and micro-cuttings and acclimatization was not affected by substrate compositions. For *ex vitro* rooting and acclimatization of *A. leiocarpa* plantlets, nodal segments can be treated with 4920 μM IBA and grown in commercial substrate + vermiculite + coarse sand, but further adjustments of these and other factors are required to increase rooting percentage and survival of plantlets after the acclimatization period.

LITERATURE CITED

- Backes, P. e B. Irgang. 2004. Mata Atlântica: As Árvores e a Paisagem. Ed. Paisagem do Sul, Porto Alegre. 396 p.
- Balaraju, K., P. Agastian, S. Ignacimuthu, and K. Park. 2011. A rapid *in vitro* propagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using shoot tip explants. Acta Physiol. Plant. 33: 2501-2510.
- Bunt, A. C. 1973. Some physical and chemical characteristics of loam less pot-plant substrates and their relation to plant growth. Plant Soil 38: 1954-1965.
- Carvalho, P. E. R. 2003. Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa Florestas. Brasília. 1039 p.
- De Boodt, M., and O. Verdonck, 1972. The physical properties of the substrates in horticulture. Acta Hortic. 26: 37-44.
- Delarmelina, W. M., M. V. W. Caldeira, J. C. T. Faria, E. O. Gonçalves, e R. L. F. Rocha. 2014. Diferentes substratos para a produção de mudas de *Sesbania virgata*. Flor@ 21: 224-233.
- Erig, A. C., and M. W. Schuch. 2005. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. Ciênc. Rural 35: 961-965.
- Erig, A. C., M. W. Schuch, e A. da C. Chaves. 2004. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro Cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. Sci. Agraria 5: 61-68.
- Estat. Sistema para análises estatísticas. 1994. Jaboticabal, Departamento de Ciências Exatas, FCAV-UNESP, v. 02.
- Fermino, P. C. P., A. Raposo, e J. E. Scherwinski-Pereira. 2011. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. Floresta 41: 79-86.

in vitro, pero sí favorecieron el enraizamiento *ex vitro*. En el enraizamiento *ex vitro*, 14 % de los explantes enraizados en sustrato comercial + vermiculita + arena, muestran que ajustes son necesarios para definir mejor las condiciones ideales para el enraizamiento *ex vitro* y la aclimatación de las plántulas de *A. leiocarpa*. Además, estas plántulas pueden utilizarse en setos micro-clonales (para la producción de plántulas por microcortes), con lo cual su producción masiva sería técnicamente viable.

CONCLUSIÓN

El uso de IBA no es necesario para el enraizamiento *in vitro* de los segmentos nodales de *A. leiocarpa* y los microcortes, y la aclimatación no es afectada por las composiciones del sustrato. Para el enraizamiento y aclimatación *ex vitro* de las plántulas de *A. leiocarpa*, los segmentos nodales se pueden tratar con 4920 μM IBA y cultivar en sustrato comercial + vermiculita + arena gruesa, pero se requieren ajustes adicionales de éstos y otros factores para aumentar el porcentaje de enraizamiento y supervivencia de plántulas después del período de aclimatación.

—End of the English version—



- Girardi, C. G., e R. Pescador. 2010. Aclimatização de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. Rev. Bras. Pl. Med. 12: 62-72.
- Lloyd, G., and B. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Int. Plant Propagation Soc. Proc. 30: 421-427.
- Lopez, J., Little, E. L., Rombold Jr., J. S. and Hahn, W. J. 1987. Arboles communes del Paraguay. Washington, D. C., U.S.A.: Peace Corps. 425 p.
- Machado, M. P., C. Deschamps, and L. A. Biasi. 2013. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. J. Biotec. Biodivers. 4: 153-161.
- Martinez-Crovetto, R. 1963. Estudio taxonomico-biometrico de *Schinus molle* y *Schinus areira* (Anacardiaceae), Bonplandia, Corrientes 1: 225-244.
- Nicoli, P. M., R. Paiva, R. C. Nogueira, J. R. F. Santana, L. C. Silva, D. P. C. Silva, e J. M. P. Porto. 2008. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. Ciênc. Rural 38: 685-689.

- Oliveira, L. S., P. C. Dias, e G. E. Brondani. 2013. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesq. Flor. Bras.* 33: 439-453.
- Pimentel, N., Bisognin, D. A., Rodrigues, M. B., Kielse, P., Lencina, and K. H. 2016. Micropropagation of *Handroanthus heptaphyllus* (Velloso Mattos). *Aust. J. Basic App. Sci.* 10: 79-87.
- Ramesh, K., M. K. Chandra, and T. Vijaya. 2009. *In vitro* propagation and *ex vitro* rooting of *Tectona* (L. F.), APNBV-1 Clone. *J. For. Sci.* 25: 119-126.
- Reddy, A. R., M. Bavaji, and J. V. S. Rao. 2006. Micropropagation of *Azadirachta indica* A. Juss. via cotyledonary nodes. *Indian J. Biotechnol.* 5: 309-311.
- Rio Grande do Sul (Estado). Decreto nº 52.109, de 1 de dezembro de 2014. Available in: <http://www.al.rs.gov.br/legis/M010/M0100099.ASP?Hid_Tipo=TEXT0&Hid_TodasNormas=61669&hTexto=&Hid_IDNorma=61669>. (Access: August, 2015).
- Rocha, M. A. C., M.A.P. Costa, S.A. Silva, C. A. S. Ledo, M.J.S. Moreira, e L.P. Bastos. 2008. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). *Rev. Bras. Frutic* 30: 769-774.
- Skrebsky, E. C., F. T. Nicoloso, and J. Maldaner. 2006. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. *Ciênc. Rural* 36: 1416-1423.
- Sobral, M., J. A. Jarenkow, P. Brack, B. Irgang, J. Larocca, e R. S. Rodrigues. 2006. Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul. Ed. RiMA/Novo Ambiente, São Carlos. 350 p.
- Souza, A. S. and T. G. Junghans. 2006. Introdução à Micropropagação de Plantas. 152p.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5ª. ed. Artmed, Porto Alegre. 918 p.
- Watt, M. P., F. C. Blakeway, M. E. O. Mokotedi, and S. M. Jain. 2003. Micropropagation of Eucalyptus. *In: Jain, S. M. and K. Ishii, K. (eds). Micropropagation of Woody Trees and Fruits.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 217-244.
- Vibha, J. B., N. S. Shekhawat, P. Mehandru, and R. Dinesh. 2014. Rapid multiplication of *Dalbergia sissoo* Roxb.: a timber yielding tree legume through axillary shoot proliferation and *ex vitro* rooting. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 20: 81-87.
- Wendling, I., L. F. Dutra, e F. Grossi. 2006. Produção de Mudas de Espécies Lenhosas. Embrapa Florestas, Colombo. 54 p.
- Xavier, A., I. Wendling, e R. L. Silva. 2013. *Silvicultura Clonal, Princípios e Técnicas.* Editora UFV, Viçosa. 279 p.