

ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS JUVENILES DE *Bertholletia excelsa* CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO INDOL-BUTÍRICO

ROOTING OF JUVENILE CUTTINGS OF *Bertholletia excelsa* UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS OF INDOLEBUTYRIC ACID

Iracema M. Castro Coimbra Cordeiro^{1*}; Osmar Alves Lameira²;
Francisco de Assis Oliveira¹; Ivar Wendling³

¹Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA, Av. Tancredo Neves Nº 250, Terra Firme, CEP: 66.077-530, Belém, Pará, Brasil. (iracema3c@gmail.com) (francisco.oliveira@ufra.edu.br). ²Embrapa Amazônia Oriental, Travessa Enéas Pinheiro, Nº 100, Montese, CEP: 66095-100, Belém, Pará, Brasil. (osmar.lameira@embrapa.br). ³Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, km 11, bairro Guaraituba, CEP: 83.411-000, Colombo, Paraná, Brasil. (ivar.wendling@embrapa.br).

RESUMEN

El comportamiento recalcitrante y la germinación lenta e irregular son factores limitantes en la producción de plántulas de *Bertholletia excelsa* mediante el proceso convencional. El objetivo de este estudio fue evaluar el enraizamiento de estacas juveniles de *B. excelsa* asociadas a la aplicación de ácido indolbutírico (AIB) en propagador de subirrigación. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial $3 \times 3 \times 2$ de tratamientos: tres dosis (0, 1000 y 3000 mg L⁻¹) de AIB como regulador de crecimiento; tres tipos de estacas (apical, media y basal); y dos tiempos de inmersión (1 s y 60 s). Los datos se analizaron con un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de SNK ($p \leq 0.05$). A los 180 d se evaluó el número y la longitud media de las raíces, el porcentaje de enraizamiento, la presencia de callo y la supervivencia de las estacas. Los resultados muestran que las estacas medias y basales sumergidas 1 s a 1000 mg L⁻¹ de AIB tuvieron los porcentajes mayores de enraizamiento, 58.3 % y 41.7 %, respectivamente. Las estacas sólo presentaron, en promedio, la formación de una raíz única. Las longitudes medias mayores de raíces se obtuvieron en las estacas medias sumergidas 1 s en 3000 mg L⁻¹ de AIB (7.0 cm) y 1000 mg L⁻¹ de AIB (6.4 cm). Así, las concentraciones de AIB estimulan el surgimiento de raíces en diferentes tipos de estacas de *B. excelsa*, el segmento medio inmerso en 1000 mg L⁻¹ por 1 s es el más indicado para aumentar el porcentaje de enraizamiento, y el proceso

ABSTRACT

Recalcitrant behavior and slow and irregular germination are limiting factors for the production of *Bertholletia excelsa* seedling production, through the conventional process. The objective of this study was to evaluate the rooting of juvenile cuttings of *B. excelsa* associated to the application of indolebutyric acid (IBA) in subirrigation propagator. The experimental design was completely random with a factorial arrangement of $3 \times 3 \times 2$ of treatments: three doses (0, 1000 and 3000 mg L⁻¹) of IBA as growth regulator; three types of cuttings (apical, middle, basal); and two immersion times (1 s and 60 s). The data were analyzed with ANOVA and the treatment means were compared with the SNK test ($p \leq 0.05$). At 180 d the number and mean length of roots, percentage of rooting, presence of callus, and survival of the cuttings were evaluated. The results show that the middle and basal cuttings immersed for 1 s in 1000 mg L⁻¹ of IBA had the highest percentages of rooting, 58.3 % and 41.7 %, respectively. The cuttings only presented, in average, the formation of a single root. The highest average root lengths were obtained with middle cuttings submerged for 1 s in 3000 mg L⁻¹ of IBA (7.0 cm) and 1000 mg L⁻¹ of IBA (6.4 cm). Thus, the IBA concentrations stimulate the surge of roots in different types of *B. excelsa* cuttings, the middle segment immersed in 1000 mg L⁻¹ for 1 s is the most appropriate to increase the percentage of rooting, and the process of cuttings with *B. excelsa* juvenile material can be adopted for the vegetative propagation of the species.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2015. Aprobado: noviembre, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 227-238. 2016.

Key words: Vegetative propagation, Amazon species, *Bertholletia excelsa*, growth regulator, indolebutyric acid, juvenile cuttings.

de estacas con material juvenil de *B. excelsa* puede adoptarse para la propagación vegetativa de la especie.

Palabras clave: Propagación vegetativa, especies amazónicas, *Bertholletia excelsa*, regulador de crecimiento, ácido indolbutírico, estaca juvenil.

INTRODUCCIÓN

La castaña de Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) es una especie abundante en la región amazónica y sus frutos se cosechan casi exclusivamente en bosques naturales, donde varias comunidades se benefician con su producción (Tonini *et al.*, 2008). Esta especie es clave para la conservación y el desarrollo de la región amazónica, debido a su uso múltiple por las comunidades que la usufructúan, es una fuente de empleo e ingresos para trabajadores rurales y urbanos de esta región y por el uso de su madera (Tonini, 2011). En el norte de Brasil, *B. excelsa* es una especie nativa con gran potencial para la reforestación (Tonini y Arco-Verde, 2005) y tiene una combinación de aspectos favorables, como madera de excelente calidad, rápido crecimiento, abundante fructificación, y la recolección de frutos causa un impacto ambiental bajo (Tonini *et al.*, 2008).

La propagación por semilla de *B. excelsa* es limitada por una pérdida rápida de su viabilidad, causada por su comportamiento recalcitrante, la germinación lenta e irregular de hasta seis meses y dificultades en el enraizamiento. Además sus frutos son susceptibles a los ataques por predadores antes de su maduración (Figueiredo y Carvalho, 2002). Para obtener germinación rápida es necesario retirar el tegumento, y en la mayoría de las veces se producen daños mecánicos en la semilla. Dadas estas limitaciones, la propagación vegetativa por estacas y la aplicación de reguladores de crecimiento, en especial la auxina sintética ácido indolbutírico (AIB) es una técnica prometedora para la mayoría de las especies. El AIB es una sustancia fotoestable, no tóxica, de acción localizada y menos sensible a la degradación biológica (Husen, 2012). El uso es recomendado para estimular el enraizamiento de numerosas plantas (Bortoline, 2008) y se usan concentraciones bajas y altas como los tipos y tamaños de estacas (Vernier e Cardoso, 2013). Según Xavier *et al.* (2009), el grado de éxito de la propagación vegetativa también depende de la temporada, las condiciones fisiológicas de la planta, la

INTRODUCTION

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is an abundant species in the Amazon region and its fruits are harvested almost exclusively in natural forests, where several communities are benefited with its production (Tonini *et al.*, 2008). This species is key for the conservation and development of the Amazon region, due to its multiple uses by the communities that exploit it, is a source of employment and income for rural and urban workers in this region, and because of the use of its wood (Tonini, 2011). In northern Brazil, *B. excelsa* is a native species with great potential for reforestation (Tonini and Arco-Verde, 2005), and has a combination of favorable aspects such as wood of excellent quality, quick growth, abundant fructification; also, fruit collection causes a low environmental impact (Tonini *et al.*, 2008).

Seed propagation in *B. excelsa* is limited by a quick loss of its viability, caused by its recalcitrant behavior, slow and irregular germination of up to six months, and difficulties to root. In addition, its fruits are susceptible to attacks by predators before their maturation (Figueiredo and Carvalho, 2002). To obtain a quick germination, it is necessary to remove the tegument, and in most cases mechanical damage is produced on the seed. Given these limitations, vegetative propagation through cuttings and the application of growth regulators, especially the synthetic auxin indolebutyric acid (IBA), is a promising technique for most species. IBA is a photostable substance, non-toxic, of localized action, and less sensitive to biological degradation (Husen, 2012). Its use is recommended to stimulate rooting in a large number of plants (Bortoline, 2008), and low and high concentrations are used, as are types and sizes of cuttings (Vernier and Cardoso, 2013). According to Xavier *et al.* (2009), the degree of success of vegetative propagation also depends on the season, physiological conditions of the plant, concentration of growth regulators, meteorological conditions, location, size and type of propagule, means for rooting, fungicides, and the influence of the substrate on rooting.

For some trees like *Eucalyptus*, the technique for propagation with cuttings is well-established, with dominion in the production of seedlings of high quality and low cost. In *Schizolobium amazonicum*

concentración de los reguladores de crecimiento, las condiciones meteorológicas, la ubicación, el tamaño y el tipo de propágulo, los medios de enraizamiento, los fungicidas y la influencia del sustrato sobre el enraizamiento.

Para algunos árboles como *Eucalyptus*, la técnica de propagación por estacas está bien establecida, con dominio en la producción de plántulas de alta calidad y bajo costo. En *Schizolobium amazonicum* (Rosa y Pinheiro, 2001), *Calophyllum brasiliensis* (Silva *et al.*, 2010) e *Ilex paraguariensis* (Brondani *et al.*, 2008) existen protocolos de propagación, pero no para la mayoría de las especies forestales. Los estudios de Pinheiro (1967) y Moraes *et al.* (2008) son los únicos con estacas con *B. excelsa* y los resultados no fueron eficientes para el desarrollo de protocolos, por lo cual la información es insuficiente para la aplicación de esta técnica.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el enraizamiento de estacas juveniles de *B. excelsa* asociadas a la aplicación de AIB en propagadores de subirrigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el vivero forestal de Embrapa Amazonia Oriental, en la ciudad de Belém, capital del Estado de Pará, Brasil, usando semillas compradas a productores. Para la producción de las plantas, las semillas de *B. excelsa* se sumergieron en agua 24 h y se sembraron en bolsas de plástico de 17 cm × 28 cm, las cuales contenían una mezcla de sustrato de 60 % de tierra negra, 30 % de estiércol de pollo y 10 % de arena, y se colocaron en un invernadero bajo riego artificial intermitente.

Cuando las plántulas alcanzaron 45 cm de altura, se seccionaron en estacas de 10 cm de largo, cortadas en forma oblicua en la base, conteniendo al menos dos yemas y dos pares de hojas reducidas a la mitad de su tamaño original, con el fin de evitar la transpiración excesiva. Los cortes se separaron en tres grupos: posición apical, media y basal. Con el fin de mantener el vigor y la turgencia del material vegetal, inmediatamente después de la recolección, las estacas se lavaron con agua y se colocaron en una caja térmica con agua.

Para el enraizamiento las estacas se colocaron seis meses en un propagador tipo cámara de subirrigación, con estructura metálica envuelta con plástico de polietileno que lo tornaba impermeable. La base estaba forrada con cuatro capas: 1) arena (6-10 cm); 2) grava (10-15 cm); 3) piedras (5 cm); y 4) sustrato (5 cm), compuesto por arena estéril, según el modelo de Leakey *et al.* (1990) y adaptado por Longman (1993). El propagador estaba dentro de un invernadero con luminosidad interna reducida

(Rosa and Pinheiro, 2001), *Calophyllum brasiliensis* (Silva *et al.*, 2010) and *Ilex paraguariensis* (Brondani *et al.*, 2008), there are propagation protocols, but not for the majority of forest species. Studies by Pinheiro (1967) and Moraes *et al.* (2008) are the only ones with *B. excelsa* cuttings, and the results were not efficient for the development of protocols, which is why information is insufficient for the application of this technique.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the rooting of juvenile cuttings of *B. excelsa* associated to the application of IBA in subirrigation propagators.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed in the forest nursery of Embrapa Amazonia Oriental, in the city of Belém, capital of the state of Pará, Brazil, using seeds bought from producers. For the plant production, the seeds of *B. excelsa* were submerged in water for 24 h and sown in plastic bags of 17 cm × 28 cm, which contained a mixture of substrate of 60 % black soil, 30 % chicken dung, and 10 % sand, and they were placed in a nursery under intermittent artificial irrigation.

When the plants reached 45 cm of height, they were selected in cuttings 10 cm long, cut obliquely at the base, containing at least two buds and two pairs of leaves reduced to half of their original size, with the goal of avoiding excessive transpiration. The cuts were separated into three groups: apical, middle and basal position. With the aim of maintaining the vigor and turgidity of the plant material, immediately after the collection, the cuttings were washed with water and placed in a thermal box with water.

For the rooting of the cuttings, they were placed for six months in a subirrigation type chamber propagator, with a metallic structure wrapped in polyethylene plastic that made it waterproof. The base was covered with four beds: 1) sand (6-10 cm); 2) gravel (10-15 cm); 3) rocks (5 cm); and 4) substrate (5 cm), made up of sterile sand, according to the Leakey *et al.* (1990) model, and adapted by Longman (1993). The propagator was inside a greenhouse with internal luminosity reduced to 50 % of the natural light by a middle shadow located on the external superior part of the structure, with relative moisture of 90 % and average temperature of 27 °C. During the period of permanence of the cuttings in the propagator, phytosanitary control was performed through a spray of Benomyl (1 g L⁻¹) every 15 d.

The experimental design was completely random with a factorial arrangement (3 × 3 × 2) of treatments: IBA (0, 1000

a 50 % de la luz natural por una media sombra ubicada en la parte superior externa de la estructura, con una humedad relativa de 90 % y una temperatura promedio de 27 °C. Durante el período de estancia de las estacas, en el propagador se realizó el control fitosanitario mediante un rociado cada 15 d con Benomyl (1 g L⁻¹).

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial (3×3×2) de tratamientos: AIB (0, 1000 y 3000 mg L⁻¹), tipos de estacas (apical, media y basal) y tiempos de inmersión (1 s y 1 min). El AIB se disolvió en hidróxido de sodio (NaOH) 1 N, se diluyó en agua destilada (50:50 % en v/v) y la base de las estacas fue inmersa en la solución. Cada tratamiento tuvo tres unidades experimentales de 12 estacas.

Las mediciones se realizaron en intervalos de 30 d durante 180 d, y las variables fueron porcentaje de estacas enraizadas, número y longitud de raíces, presencia de callosidades y porcentaje de mortalidad. Los valores medios del porcentaje de enraizamiento se transformaron con la función raíz cuadrada de arco seno para cada observación y el número promedio de raíces transformadas en $\sqrt{x+0.5}$ (Pimentel Gomes, 2009), donde x =datos muestreados.

Las estacas con raíces se transfirieron a bandejas de plástico de 24 celdas, las cuales contenían suelo negro y vermiculita en la proporción de 1:1 (v/v) y se colocaron en un invernadero con riego intermitente para el crecimiento de la parte aérea. Las plántulas formadas se transfirieron a bolsas de plástico de polietileno negro de 14 cm×20 cm con tierra negra y estiércol vacuno en la proporción de 1:1 (v/v), para evaluación de la adaptación en vivero y futura plantación en campo.

Análisis estadístico

Con los datos se realizó un ANDEVA, regresión, y las medias se compararon con la prueba SNK α ($p \leq 0.05$), usando SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010), porque usa la distribución de la prueba de Tukey. El método Keuls es relativamente fácil de aplicar y considera el número total de tratamientos utilizados en el experimento, y es una prueba de amplitud múltiple que evalúa la significancia de un conjunto de diferencias, haciendo un balance entre los Errores de Tipo I y II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estacas enraizadas, presencia de callos y mortalidad

Los porcentajes de enraizamiento (de 8 % a 58 %) fueron relativamente bajos, pero los tipos de estacas ($Pr > F$ 0.002), las concentraciones de AIB

and 3000 mg L⁻¹), types of cuttings (apical, middle and basal) and immersion times (1 s and 1 min). The IBA was dissolved in sodium hydroxide (NaOH) 1 N, was diluted in distilled water (50:50 % in v/v), and the base of the cuttings was immersed in the solution. Each treatment had three experimental units of 12 cuttings.

The measurements were performed in intervals of 30 d during 180 d, and the variables were a percentage of the cuttings rooted, the number and length of the roots, the presence of calluses and the percentage of mortality. The mean values of the percentage of rooting were transformed with the square root function of the arcsine for each observation and the average number of roots transformed into $\sqrt{x+0.5}$ (Pimentel Gomes, 2009), where x =data sampled.

The cuttings with roots were transferred to plastic trays with 24 cells, which contained black soil and vermiculite in 1:1 (v/v) proportion and placed in a greenhouse with intermittent irrigation for the growth of the aerial part. The seedlings formed were transferred to black polyethylene plastic bags of 14 cm×20 cm with black soil and cow manure in the proportion of 1:1 (v/v), for the evaluation of the adaptation in the nursery and future planting in the field.

Statistical analysis

With the data, ANOVA was performed, regression, and the measurements were compared with the SNK α test ($p \leq 0.05$), using SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010), because it uses the distribution of the Tukey test. The Keuls method is relatively easy to apply and considers the total number of treatments used in the experiment, and is a multiple amplitude test that evaluates the significance of a set of differences, making a balance between Errors of Type I and II.

RESULTS AND DISCUSSION

Rooted cuttings, presence of calluses and mortality

The percentages of rooting (from 8 % to 58 %) were relatively low; however, the types of cuttings ($Pr > F$ 0.002), IBA concentrations ($Pr > F$ 0.002), immersion times ($Pr > F$ 0.026) and the interactions between these factors ($Pr > F$ 0.000) showed significant differences ($p < 0.05$) (Tables 1 and 2). The positive interaction with the same factors was verified by Dias *et al.* (2012a) with vegetative propagation for mini cuttings of *Anadenanther amacrocarpa* and different IBA concentrations.

(Pr>F 0.002), el tiempo de inmersión (Pr>F 0.026) y las interacciones entre estos factores (Pr>F 0.000) mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Cuadros 1 y 2). La interacción positiva con los mismos factores fue verificada por Dias *et al.* (2012a) con propagación vegetativa por mini estacas de *Anadenanther amacrocarpa* y diferentes concentraciones de AIB.

Wendling y Xavier (2005) obtuvieron 80 a 100 % de enraizamiento al usar concentraciones de 500 a 1000 mg L⁻¹ de AIB en estacas de clones de *Eucalyptus*. Según Santos *et al.* (2011), además del efecto del regulador de crecimiento, las características propias de cada especie también afectan el enraizamiento de las estacas, como observó en su estudio con 20 especies forestales. Estos resultados destacan que el enraizamiento de las estacas presentó un comportamiento diferenciado y que en la iniciación de las raíces influyeron factores intrínsecos relacionados con la propia planta y

Wendling and Xavier (2005) obtained 80-100 % of rooting when using concentrations of 500 to 1000 mg L⁻¹ of IBA in cuttings of *Eucalyptus* clones. According to Santos *et al.* (2011), in addition to the effect of the growth regulator, the specific characteristics of each species also affect the rooting of cuttings, as was observed in their study with 20 forest species. These results highlight that the rooting of cuttings presented differentiated behavior and that for the start of rooting, intrinsic factors related to the plant itself influenced as well as extrinsic ones linked to environmental conditions (Hartmann *et al.*, 2002; Pio *et al.*, 2003).

The low percentage of root formation is explained because the cuttings responded differently to the action of the hormone; some need to remain in contact with the growth regulating solution for longer and others root sporadically or they do not root. This difference is due to the physiological variations between cuttings from

Cuadro 1. Efecto de la concentración y el tiempo de inmersión de ácido indolbutírico (AIB) y la posición de la estaca con el porcentaje de las estacas enraizadas (EE), formación de callo (C), mortalidad (M) y los valores medios de número de raíz (NR) y longitud de raíz (LR) en *Bertholletia excelsa*.

Table 1. Effect of the concentration and immersion time in indolebutyric acid (IBA) and the position of the cutting with the percentage of cuttings rooted (EE), callus formation (C), mortality (M) and the mean values of the number of roots (NR) and root length (LR) in *Bertholletia excelsa*.

AIB (mg L ⁻¹)	Tiempo (s)	Posición	EE	C	M	NR	LR (cm)
			%				
0	-	Apical	0.0a	100f	0.0a	0.0a	0.0a
		Media	0.0a	66.67e	33.33dc	0.0a	0.0a
		Basal	0.0a	75.0e	25.0c	0.0a	0.0a
1000	1	Apical	25.0c	41.67d	8.33b	3.0c	1.5b
		Media	58.33d	33.34d	8.33b	9.0dc	6.4d
		Basal	41.67c	16.66cb	25.0c	5.0c	4.7dc
3000	1	Apical	0.0a	8.33b	16.67c	0.0a	0.0a
		Media	8.33b	33.33d	16.67c	1.0b	7.0 d
		Basal	16.67c	0.0a	83.33e	3.0b	5.2dc
1000	60	Apical	0.0a	66.66e	8.33b	0.0a	0.0a
		Media	8.33b	75.0e	16.67c	1.0b	4.50c
		Basal	25.0c	41.66d	16.67c	3.0b	2.46b
3000	60	Apical	25.0c	41.66d	16.67c	3.0b	5.67dc
		Media	41.67d	41.66d	16.67c	8.0c	3.56cb
		Basal	41.67d	0.0a	8.33b	5.0c	6.30d

Los valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) ❖ Values with different letters in a column are statistically different ($p \leq 0.05$).

Cuadro 2. Efecto de la concentración y tiempo de inmersión en ácido indolbutírico (AIB) y la posición de la estaca, en los valores medios de número de raíz (NR) y longitud de raíz (LR) en estacas juveniles de *Bertholletia excelsa*.
Table 2. Effect of the concentration and immersion time in indolebutyric acid (IBA) and the position of the cutting, on the mean values of the root number (NR) and root length (LR) in *Bertholletia excelsa* juvenile cuttings.

AIB (mg L ⁻¹)	Tiempo	Posición	NR [†]	LR (cm)
0	-	Apical	0.0a	0.0a
		Media	0.0a	0.0a
		Basal	0.0a	0.0a
1000	1s	Apical	3.0c	1.5b
		Media	9.0dc	6.4d
		Basal	5.0c	4.7dc
3000	1s	Apical	0.0a	0.0a
		Media	1.0b	7.0 d
		Basal	3.0b	5.2dc
1000	60 s	Apical	0.0a	0.0a
		Media	1.0b	4.50c
		Basal	3.0b	2.46b
3000	60 s	Apical	3.0b	5.67dc
		Media	8.0c	3.56cb
		Basal	5.0c	6.30d

Los valores medios con letra diferente en una columna son diferentes (test de SNK; $p \leq 0.05$);

[†]Datos transformados a $\sqrt{x+0.5}$; NR (dp \pm 2.93); CR (dp \pm 2.74) * The mean values with a different letter in a column are different (SNK test; $p \leq 0.05$); [†]Data transformed to $\sqrt{x+0.5}$; NR (dp \pm 2.93); CR (dp \pm 2.74).

extrínsecos vinculados con las condiciones ambientales (Hartmann *et al.*, 2002; Pio *et al.*, 2003).

El porcentaje bajo de formación de raíces se explica porque las estacas respondieron de forma diferente a la acción de la hormona; unas necesitan permanecer por más tiempo en contacto con la solución reguladora de crecimiento y otras enraízan esporádicamente o no enraízan. Esta diferencia se debe a las variaciones fisiológicas entre las estacas de la misma planta, aunque estas sean juveniles; además, el proceso se puede inhibir según la concentración del regulador de crecimiento. Estos resultados sugieren que un material vegetal juvenil no siempre es propicio para el proceso de enraizamiento de especies leñosas provenientes de semillas, como lo comprobado con estacas de *B. excelsa*. Fachinello *et al.* (2005) señalan que a pesar de la capacidad de enraizamiento de especies leñosas, el potencial de una estaca para formar raíces

the same plant, although they may be juvenile; in addition, the process can be inhibited based on the concentration of the growth regulator. These results suggest that juvenile plant material is not always favorable for the rooting process of woody species from seeds, as found with *B. excelsa* cuttings. Fachinello *et al.* (2005) point out that despite the capacity for rooting of woody species, the potential of a cutting to form roots varies with the species and type of crop due to the interaction of factors such as manipulation of the plant, good nutritional status, period of recollection and age of the plant, length and diameter of cuttings, presence of leaves and buds, hormonal treatment, illumination, temperature and relative moisture.

The use of IBA increased the number of roots per cutting, and promotes a greater percentage of rooting according to Endres *et al.* (2007). The same

varía con la especie y el tipo de cultivo debido a la interacción de factores como la manipulación de la planta, el buen estado nutricional, el periodo de recolección y la edad de la planta, el largo y el diámetro de las estacas, la presencia de hojas y yemas, el tratamiento hormonal, la iluminación, la temperatura y la humedad relativa.

El uso de AIB aumentó el número de raíces por estaca, y promueve un mayor porcentaje de enraizamiento según Endres *et al.* (2007). Lo mismo observaron Gratieri-Sossella *et al.* (2008), en estudios con palo del brasil (*Caesalpinia echinata*) y ceibo (*Erythrina crista-galli*), respectivamente.

En ausencia de AIB la formación de callos varió de 66 a 100 %, en especial en la posición apical (Cuadro 1; Figura 1). La presencia de callos en las secciones de cortes ocurrió independientemente de la presencia del regulador de crecimiento o posición de corte. Hernández *et al.* (2013), respecto a la propagación vegetativa por estacas de *Cariniana estrellensis*, reportan que la presencia de callo se produce con o sin la presencia de AIB, tanto en estacas apicales como intermedias.

Fachinello *et al.* (2005) señalan que el callo se forma desde una masa de células parenquimatosas y desorganizadas, como resultado de las lesiones de los tejidos del xilema y el floema durante la preparación de la estaca. La auxina natural producida en las hojas y en los brotes se mueve hacia la parte inferior de las estacas estimulando la actividad de enraizamiento, acumulándose en la base de corte, junto con azúcares y otros nutrientes (Janick, 1996), actúan como sustancias inhibitoras en la iniciación de las raíces adventicias preformadas y potencializan la formación de callos en la base de las estacas (Hartmann y Kester, 2011).

Iritani *et al.* (1986) y Caldwell *et al.* (1988) afirman que las raíces pueden aparecer directamente desde el tejido caulinar o sólo a través del callo. La formación de callos se debe a la presencia del equilibrio de la auxina aplicada (AIB) en presencia de una citocinina endógena y, según Hartmann y Kester (2011), ese equilibrio también puede ocurrir cuando se aplica citocinina con la auxina endógena. Así, la presencia de callos en estacas de *B. excelsa* indicaría que si las estacas permanecen un período más largo en el entorno de enraizamiento, habrá un aumento en el porcentaje de estacas enraizadas. Sin embargo, las raíces que surgen por

was observed by Gratieri-Sossella *et al.* (2008), in studies with Brazilwood (*Caesalpinia echinata*) and ceibo (*Erythrina crista-galli*), respectively.

In absence of IBA the formation of calluses varied from 66 to 100 %, especially in the apical position (Table 1; Figure 1). The presence of calluses in the sections of cuttings occurred independently from the presence of the growth regulator or position of the cut. Hernández *et al.* (2013), with regard to the vegetative propagation with cuttings of *Cariniana estrellensis*, report that the presence of callus is produced with or without the presence of IBA, both in apical and in intermediate cuttings.

Fachinello *et al.* (2005) point out that the callus is formed from a mass of parenchyma and disorganized cells, as a result of the lesions of the tissues of the xylem and phloem during the preparation of the cutting. The natural auxin produced in the leaves and buds moves towards the inferior part of the cuttings stimulating the rooting activity and accumulating in the base of the cutting, together with sugars and other nutrients (Janick, 1996), acting as inhibiting substances in the initiation of the preformed adventitious roots and potentiating the formation of calluses at the base of the cuttings (Hartmann and Kester, 2011).

Iritani *et al.* (1986) and Caldwell *et al.* (1988) affirm that the roots can appear directly from caulinar tissue or solely through the callus. The formation of calluses must be due to the presence of equilibrium of the auxin applied (IBA) in the presence of an endogenous cytokinin and, according



Figura 1. Formación de callo en la base de la estaca de *Bertholletia excelsa*.

Figure 1. Callus formation on the base of the *Bertholletia excelsa* cutting.

diferenciación de las células del callo raramente poseen conexiones vasculares con las estacas, por lo cual no se recomienda la propagación a partir de estos (George *et al.*, 2008).

Respecto a la mortalidad, las estacas en la posición basal, inmersas 1 s con 3000 mg L^{-1} de AIB, presentaron mayor porcentaje (83.3 %) comparado con otros tipos de posición y tiempo de inmersión, lo cual sugiere que hubo fitotoxicidad a esa concentración. Entre los tratamientos, sólo las estacas apicales en ausencia de AIB no presentaron mortalidad (Cuadro 1). Bastos *et al.* (2004) estudiaron el enraizamiento de las estacas de la fruta de estrella (*Averrhoa carambola*) y sugieren que hubo fitotoxicidad con concentraciones diferentes de AIB e inmersas 10 s, y que la capacidad de supervivencia de las estacas apicales en ausencia de regulador del crecimiento fue mayor que las expuestas a AIB.

Número y longitud de las raíces

Las estacas presentaron, en promedio, la formación de una sola raíz (Figura 2). El tratamiento que causó un número mayor de raíces fue aquel con una concentración de 3000 mg L^{-1} de AIB (Cuadro 1).

Las estacas medias sumergidas 1 s a 1000 mg L^{-1} de AIB mostraron un porcentaje más alto de enraizamiento (58.3 %), seguida por las estacas basales en el mismo tiempo de inmersión y misma concentración (41.7 %) (Cuadro 1). Sin embargo, estas últimas no difirieron de las estacas medias y basales,



Figura 2. Aspecto de las raíces en los cortes de *Bertholletia excelsa* a los 180 días.

Figure 2. Aspects of roots on the *Bertholletia excelsa* cuttings at 180 days.

to Hartmann and Kester (2011), this equilibrium can also occur when cytokinin is applied with the endogenous auxin. Thus, the presence of calluses in *B. excelsa* cuttings would indicate that if the cuttings remain for a longer period in the rooting environment, there would be an increase in the percentage of rooted cuttings. However, the roots that arise from differentiation of callus cells rarely have vascular connections with the cuttings, so propagation from these is not recommended (George *et al.*, 2008).

With regard to mortality, the cuttings in the basal position, immersed 1 s with 3000 mg L^{-1} of IBA presented higher percentage (83.3 %) in comparison to other types of position and immersion time, suggesting that there was phytotoxicity at that concentration. Among treatments, only the apical cuttings in absence of IBA did not present mortality (Table 1). Bastos *et al.* (2004) studied the rooting of cuttings from starfruit (*Averrhoa carambola*) and suggest that there was phytotoxicity under different IBA concentrations and immersed 10 s, and that the survival capacity of the apical cuttings in absence of the growth regulator was higher than those exposed to IBA.

Number and length of roots

The cuttings presented, in average, the formation of only one root (Figure 2). The treatment that caused a higher number of roots was the one with concentration of 3000 mg L^{-1} of IBA (Table 1).

The middle cuttings submerged 1 s at 1000 mg L^{-1} of IBA showed a higher percentage of rooting (58.3 %), followed by the basal cuttings at the same time of immersion and the same concentration (41.7 %) (Table 1). However, the latter did not differ from the middle and basal cuttings, immersed 1 min in 3000 mg L^{-1} of IBA. In absence of IBA, for the three types of cuttings used, there was no root formation, as well as in the apical cuts submerged for 1 s in a concentration of 3000 mg L^{-1} of IBA and immersed for 1 min at 1000 mg L^{-1} of IBA (Table 1).

In the regression equation, the total number of roots obtained through direct morphogenesis tended towards a linear increase in the number of roots produced by cuttings, as the concentration of the growth regulator increases (Figure 3).

inmersas 1 min en 3000 mg L^{-1} de AIB. En ausencia de AIB, para los tres tipos de estacas usadas, no hubo formación de raíces, así como en los cortes apicales sumergidos 1 s en una concentración de 3000 mg L^{-1} de AIB e inmersas 1 min a 1000 mg L^{-1} de AIB (Cuadro 1).

En la ecuación de regresión, el número total de raíces obtenidas por morfogénesis directa tendieron a un aumento lineal en el número de raíces producidas por estacas, al incrementar la concentración del regulador de crecimiento (Figura 3).

Dentro de cada concentración de AIB, las estacas en la posición apical tenían el menor porcentaje de enraizamiento (Cuadro 1). En este sentido, Dias *et al.* (2012b) señalaron que las menores tasas de enraizamiento ocurren en las estacas apicales, ya que contienen el meristemo, que es uno de los lugares principales de síntesis natural de auxina y, por tanto, no se necesita la aplicación exógena de los reguladores sintéticos de crecimiento en la base; si esta ocurre, causa un desequilibrio hormonal e inhibe la aparición de raíces (Hartmann *et al.*, 2002, Lopes *et al.*, 2011). Las longitudes medias mayores de raíz se obtuvieron en los tratamientos con estacas en la posición media, sumergidas 1 s a 3000 mg L^{-1} de AIB (7.0 cm) y en 1000 mg L^{-1} de AIB (6.4 cm) sin diferencias significativas entre sí. La longitud media menor de raíz (1.5 cm), se observó en el tratamiento con las estacas en la posición apical, inmersas 1 s en la concentración de 1000 mg L^{-1} de AIB (Cuadro 2).

Within each IBA concentration, the cuttings in the apical position had the lower percentage of rooting (Table 1). In this sense, Dias *et al.* (2012b) point out that the lower rates of rooting occur in apical cuttings, since they have the meristem, which is one of the principal places of natural auxin synthesis and, therefore, the exogenous application of synthetic growth regulators on the base is not needed; if it takes place, it causes a hormonal imbalance and inhibits the appearance of roots (Hartmann *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2011). The greater mean root lengths were obtained in treatments with cuttings in the middle position, submerged for 1 s at 3000 mg L^{-1} of IBA (7.0 cm) and in 1000 mg L^{-1} of IBA (6.4 cm) without significant differences between them. The smallest mean root length (1.5 cm) was observed with the cuttings in the apical position, immersed for 1 s in the 1000 mg L^{-1} concentration of IBA (Table 2).

The linear regression showed a growing trend with an increase in the concentration of IBA, indicating that it would eventually have better results in higher concentrations. However, per cutting there was broad variation in the root length. This fact could be due to genetic factors, since each cutting presented unique characteristics and, therefore, the requirements for propagation also tended to be unique (Figure 4).

These results are similar to those found by Xavier *et al.* (2003), who found significant differences in the rooting of *Cedrela fissilis* cuttings. Hernández

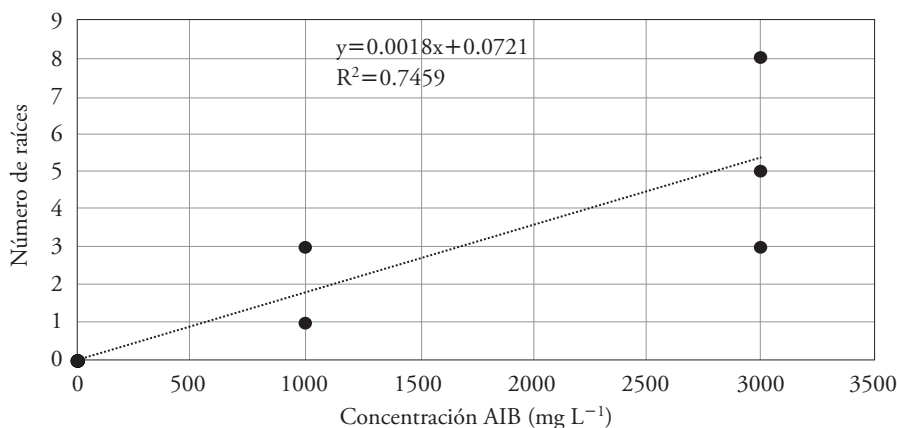


Figura 3. Efecto de ocho concentraciones (mg L^{-1}) de AIB sobre en número de raíces producidas en estacas de *Bertholletia excelsa*. $r=0.864$.

Figure 3. Effect of eight concentrations of IBA (mg L^{-1}) on the number of roots produced in *Bertholletia excelsa* cuttings. $r=0.864$.

La regresión lineal mostró una tendencia creciente con un aumento de la concentración de AIB, indicando que eventualmente en concentraciones mayores proporcionaría mejores resultados. Sin embargo, por estaca existió una amplia variación en la longitud de la raíz. Este hecho pudo deberse a factores genéticos, ya que cada estaca presentó características únicas y por ende, los requisitos para la propagación también tendieron a ser únicas (Figura 4).

Estos resultados son similares a los reportados por Xavier *et al.* (2003), quienes encontraron diferencias significativas en el enraizamiento de estacas de *Cedrela fissilis*. Hernández *et al.* (2012) en un estudio con *Piptadenia gonoacantha* obtuvieron valores promedios mayores en las estacas intermedias y basales al aplicar AIB (6000 mg L^{-1}), y los tres tipos de estacas respondieron a la aplicación de la AIB.

De acuerdo con las observaciones realizadas, al cabo de seis meses, las estacas supervivientes estaban verdes y fortalecidas, sugiriendo iniciación y elongación posterior de raíces adventicias. Sin embargo, el éxito de esta técnica depende del tipo de material vegetal, de la especie y sus condiciones nutricionales, del tipo de regulador de crecimiento, las concentraciones utilizadas y el tiempo de inmersión. Debido al porcentaje bajo de enraizamiento y tiempo para enraizar, es necesario realizar ajustes para que la técnica sea viable y convertirse en una alternativa para la producción de plántulas a lo largo del año, especialmente en situaciones en que la semilla es un insumo limitante.

et al. (2012) in a study with *Piptadenia gonoacantha* obtained higher average values than in the middle and basal cuttings with the application of IBA (6000 mg L^{-1}), so the three types of cuttings responded to the application of IBA.

According to the observations performed, after six months, the surviving cuttings were green and strengthened, suggesting a later initiation and elongation of adventitious roots. However, the success of this technique depends on the type of plant material, the species and its nutritional conditions, the type of growth regulator, the concentrations used and the immersion time. Due to the low percentage of rooting and time for rooting, it is necessary to make adjustments for the technique to be viable and to become an alternative for the production of seedlings throughout the year, especially in situations where the seed is a limiting input.

CONCLUSIONS

The use of IBA stimulated the growth of roots in different types of cuttings of *Bertholletia excelsa*; the concentration of 1000 mg L^{-1} stood out as the most appropriate to increase the percentage of rooting, submerging the base of the cutting in the IBA solution for one second and using the middle segment to obtain the cuttings.

The technique of cuttings may be adopted for the mass vegetative propagation of the species. However, the low rooting suggests that this process depends

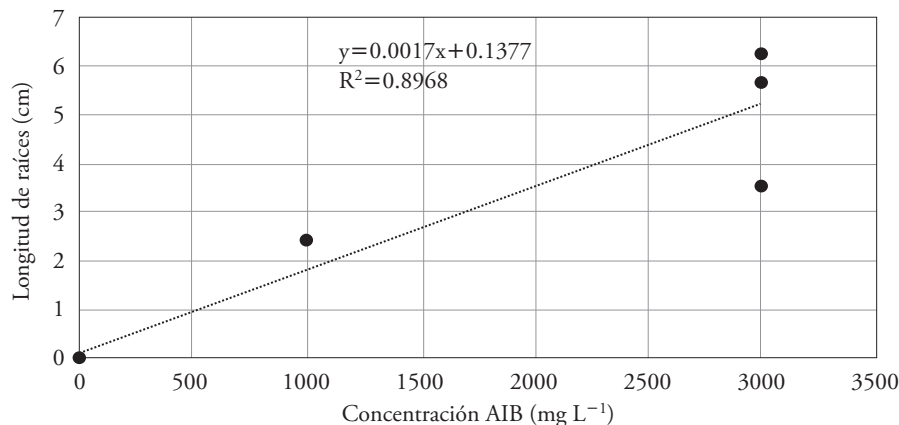


Figura 4. Efecto de ocho concentraciones de AIB (mg L^{-1}) en la longitud de la raíz en estacas de *Bertholletia excelsa*. $R=0.947$.

Figure 4. Effect of eight concentrations of IBA (mg L^{-1}) on the root length in *Bertholletia excelsa* cuttings. $R=0.947$.

CONCLUSIONES

El uso de AIB estimuló el crecimiento de raíces en estacas de diferentes tipos de *Bertholletia excelsa*, destacó la concentración de 1000 mg L⁻¹, sumergiendo la base de la estaca en la solución de AIB por un segundo y usando el segmento medio para obtener estacas, como lo más indicado para aumentar el porcentaje de enraizamiento.

La técnica de estacas para la propagación vegetativa en masa de la especie. Sin embargo, el enraizamiento bajo sugiere que este proceso depende de factores múltiples, que se deben considerar para estimular y optimizar la producción posterior de plántulas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa Nacional de Pós Doutorado (PNPD) y a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por la beca de estudio otorgada al primer autor y a los revisores anónimos, cuyos comentarios permitieron mejorar este trabajo.

LITERATURA CITADA

Bastos, D. C., A. B. G. Martins, E. J. Scaloppi Junior, I. Sarzi, e J. C. Fantinansi. 2004. Influencia do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas apícolas e basais de caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) sob condições de nebulização intermitente. Rev. Bras. Frut. 26: 284-286.

Bortolini, M. F., D. M. de Lima, G. B. de Alcantara, F. P. Fanti, L.A Biasi, M. Quoirin, H. S. Koehler, K. C. Zuffella Toribas. 2008. Enraizamento de estacas de *Ficus benjamina* L. Scientia Agraria 4: 539-543.

Brondani, G., M. A. Araujo, I. Wendling, e D. Kratz. 2008. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. Pes. Flor. Bra. 1: 29-38.

Caldwell, J. D., D. C. Coston, e K. H. Brock. 1988. Rooting of semihard wood "Hayward" kiwifruit cuttings. Hortscience 23: 714-717.

Dias, P. C., L. S. Oliveira, A. Xavier, e I. Wendling. 2012a. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. Pes. Flor. Bra. 32: 453-462.

Dias, P. C., A. Xavier, L. S. Oliveira, H. N. de Paiva, e A. C. G. de Correia. 2012b. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaquia. Rev. Árvore 36: 389-399.

Endres, L., P. M. G. Marroquim, C. M. Santos, e N. N. F. Souza. 2007. Enraizamento de estacas de Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) tratadas com ácido indolbutírico e ácido naftaleno acético. Ciên. Rural 37: 886-889.

Fachinello, J. C., A. Hoffmann, e J. C. Nachtigal. 2005. Propagação de Plantas Frutíferas. Embrapa Informações Tecnológicas. Brasília. 221 p.

on multiple factors which must be considered to stimulate and optimize the later production of seedlings.

—End of the English version—



Ferreira, D. F. 2010. SISVAR 5.3-Sistema de Análises Estatísticas. Lavras: UFLA, (Software estatístico).

Figueiredo, F. J. C. e C. J. R. de Carvalho. 2002. Aspectos fisiológicos de sementes de castanha-do-Brasil submetidas a condições de estresse: emergência e respiração. Belém: Embrapa Amazonia Oriental, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 05. 19 p.

George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G. J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture: volume 1. The Background. 3rd ed. Dordrecht: Springer. 479 p.

Gratieri-Sossella, A., C. Petry, e A. A. Nienow. 2008. Propagação da corticeira do banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (Fabaceae) pelo processo de estaquia. Rev. Árvore 32: 163-171.

Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies Junior, e R. L. Geneve. 2002. Plant Propagation: Principles and Practices. 7th ed. Upper Saddle River, Prentice-Hall. 8809 p.

Hartmann, H. T. and D. E. Kester. 2011. Plant Propagation: Principles and Practices. 8th ed. Boston: Prentice-Hall. 915 p.

Hernández, W., A. Xavier, H. N. de Paiva, e I. Wendling. 2013. Propagação vegetativa do jequitibá-rosa (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze) por estaquia. Rev. Árvore 37: 955-967.

Hernández, W., A. Xavier, H. N. de Paiva, e I. Wendling. 2012. Propagação vegetativa do pau-jacaré (*Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr.) por estaquia. Rev. Árvore 36: 813-823.

Husen, A. 2012. Changes of soluble sugars and enzymatic activities during adventitious rooting in cuttings of *Grewia optiva* as affected by age of donor plants and auxin treatments. Am. J. Plant. Physiol. 7: 1-16.

Iritani, C., R. V. Soares, e A. V. Gomes. 1986. Aspectos morfológicos da aplicação de reguladores de crescimento nas estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. Acta Biol. Paranaense 15: 21-46.

Janick, J. 1996. Orientação do crescimento da planta. In: Janick, J (ed.) A Ciência da Horticultura. 2 ed. Rio de Janeiro: USAID. pp: 202-237.

Leakey, R. R. B., J. F. T. Mesen, Z. Tchoundjeu, K. A. Longman, J. McP. Dick, A. Newton, A. Matin, J. Grace, R. C. I. Munro, P. N. Muthoka. 1990. Low-technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. Commonwealth For. Rev. 3: 247-257.

Longman, A. K. 1993. Rooting cuttings of tropical trees. In: FAO (ed). Tropical Trees: Propagation and Planting Manuals. London: Commonwealth Science Council 1. 64 p.

Lopes, V. R., C. de S. Mudry, M. M. Bettoni, e K. C. Zuffellato-Ribas. 2011. Enraizamento de estacas caulinares de *Ficus benjamina* L. sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico. Sci. Agraria, Curitiba 12: 179-183.

- Moraes, R. P., L. C. Garcia, e R. M. B. de Lima. 2008. Propagação vegetativa de *Bertholletia excelsa* H.B.K. por estaquia. In: IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus. Anais. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 58. pp: 122-131.
- Pio, R., J. D. Ramos, N. N. J. Chalfun, J. H. C. Coelho, T. C. A. Gontijo, e E. Carrijo. 2003. Enraizamento de estacas apicais de figueira tratadas com sacarose e ácido indolbutírico por imersão rápida. Rev. Bras. Agro. 9: 35-38.
- Pimentel-Gomes, F. Curso de Estatística Experimental. 2009. 15 ed. Piracicaba: Fealq-Usp. 451 p.
- Pinheiro, E. 1967. Propagação vegetativa da castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K.): observações preliminares. Belém, PA: IPEAN. il. Publicação não convencional. Mimeografado. Biblioteca(s): Embrapa Amazônia Oriental. 13 p.
- Rosa, L. S., e K. A. O. Pinheiro. 2001. Propagação vegetativa de estacas de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex. Ducke) obtidas de material juvenil e imersas em ácido indol-3-butírico. Rev. Ciên. Agra. 35: 79-88.
- Santos, J. de P. dos., A. C. Davide, L. A. F. Teixeira, A. J. S. Melo, e L. A. de Melo. 2011. Enraizamento de estacas lenhosas de espécies florestais. Cerne 17: 293-301.
- Silva, R. L., M. L. Oliveira, M. A. Monte, e A. Xavier. 2010. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. Agro. Costarricense 1: 99-104.
- Tonini, H. 2011. Fenologia da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. y Bonpl., Lecythidaceae) no sul do estado de Roraima. Cerne 17: 123-131.
- Tonini, H., e M. F. Arco-Verde. 2005. Morfologia da copa para avaliar o espaço vital de quatro espécies nativas da Amazônia. Pesp. Agro. Bras. 40: 633-638.
- Tonini, H., P. Costa, e P. E. Kaminsky. 2008. Manejo de produtos florestais não madeireiros na Amazônia (Castanheira-do-Brasil). Bol. de Pesq. Desenv. 2. 31p.
- Vernier, R. M., S. B. Cardoso. 2013. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas em espécies frutíferas e ornamentais Rev. Elet. Edu. Ciências. Garça (3):2 11-16.
- Xavier, A., G. A. dos Santos, e M. L. de Oliveira. 2003. Enraizamento de estaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). Rev. Árvore 27: 351-356.
- Xavier, A., G. A. dos Santos, I. Wendling, e M. L. de Oliveira. 2009. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. Rev. Árvore 27: 139-143.
- Wendling, I., e A. Xavier. 2005. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. Rev. Árvore 29: 921-930.