

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze A PARTIR DE MICROESTACAS

MÁRCIA APARECIDA NOVAES GOMES¹

¹Fatec Capão Bonito – Tecnologia em Silvicultura

marcia.angomes@fatec.sp.gov.br

In Vitro Establishment of Brazilian Pine (Araucaria Angustifolia) Obtained from Microcutting

Eixo Tecnológico: Recursos Naturais

Resumo

Araucaria angustifolia, conhecida como araucária ou pinheiro brasileiro, é o principal componente arbóreo das Florestas de Araucárias, a qual está presente dentro da Mata Atlântica. Tem alto valor econômico, por sua madeira e pela semente, o pinhão, entretanto possui problemas quanto à propagação via semente devido à baixa viabilidade desses propágulos. A propagação vegetativa, utilizando a técnica da micropropagação, pode ser uma alternativa para a produção de mudas da espécie. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabelecimento *in vitro* da espécie a partir de segmentos nodais coletados em duas diferentes posições na muda – apical e intermediária. Para tanto, segmentos caulinares de 3 cm de *A. angustifolia* foram coletados em duas diferentes posições de segmentos caulinares de mudas resultantes da germinação de sementes e com 30 dias: apical e intermediária, constituindo as microestacas as quais foram submetidas a dois tratamentos, T1 com desinfestação de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) durante 10 min e T2 com (NaOCl) a 1,5% (v/v) durante 15 min e o antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) (250 mg L⁻¹) acrescido ao meio de cultivo. Aos 90 dias após a inoculação, observou-se que o NaOCl, nos dois períodos testados, foi eficiente para a assepsia das microestacas, apical e intermediária. A descontaminação foi maior para as apicais, com apenas 10% destas com contaminação para o tratamento T1. Entretanto, no tratamento T2 as microestacas apresentaram 100% oxidadas e não sobreviveram. Brotações foram formadas em 30% das microestacas intermediárias do tratamento T1. Conclui-se que, dentro das condições testadas, é possível o estabelecimento *in vitro* de *Araucaria angustifolia* a partir de microestacas obtidas da posição intermediária de segmentos caulinares, utilizando como tratamento para desinfestação hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% por 10 min.

Palavras-chave: Pinheiro-brasileiro, Propagação Vegetativa, Micropropagação, Cultura de Tecidos.

Abstract

Araucaria angustifolia, known as araucaria or Brazilian pine, is the main tree component of the Araucaria Forests, which are present within the Atlantic Forest. It has a high economic value, due to its wood and the seed, the pinhão, however it has problems regarding seed propagation due to the low viability of these propagules. Vegetative propagation, using the micropropagation technique, can be an alternative to produce seedlings of the species. Thus, the objective of the present work was to evaluate the *in vitro* establishment of the species from nodal segments collected in two different positions in the seedling. For that, 3 cm stem segments of *A. angustifolia* were collected in two different positions of stem segments of seedlings resulting from seed germination and 30 days old: apical and intermediary, constituting the microcuttings which were submitted to two treatments, T1 with disinfection with sodium hypochlorite (NaOCl) at 1.5% (v/v) for 10 min and T2 with (NaOCl) at 1.5% (v/v) for 15 min and the antioxidant polyvinylpyrrolidone (PVP) (250 mg L⁻¹) added to the culture medium. At 90 days after inoculation, it was observed that NaOCl, in the two periods tested, was efficient for asepsis of microcuttings, apical and intermediary. Decontamination was greater for the apical, with only 10% of these with contamination for the T1 treatment. However, in the T2 treatment, the microcuttings were 100% oxidized and did not survive. Shoots were formed in 30% of the intermediary microcuttings of the T1 treatment. It is concluded that, within the conditions tested, it is possible to establish *in vitro* *Araucaria angustifolia* from microcuttings obtained from the intermediate position of stem segments, using sodium hypochlorite at a concentration of 1.5% for 10 min as a treatment for disinfection.

Key-words: Brazilian pine, Vegetative Propagation, Micropropagation, Tissue Culture.

1 espaço

1. Introdução

Araucaria angustifolia (Bert.), conhecida como araucária, pinheiro-brasileiro ou pinheiro-do-paraná, devido ao intenso extrativismo sofrido, foi colocada na classificação de espécie “em perigo” na “Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção”, publicada pela Portaria nº 443, de 17/12/2014 [1]. Entretanto, existe um projeto de lei que institui a permissão para o manejo consciente da espécie, permitindo plantios comerciais e a produção sustentável para o comércio de pinhões e de sua madeira [2].

A madeira que produz é destaque em áreas como a construção civil, moveleira e na marcenaria [3]. Sua semente, o pinhão, tem potencial comercial na indústria de alimentos e pode ser uma alternativa viável e rentável para a sua exploração [4]. Ecologicamente tem importância pelo fato do pinhão ser o alimento mais importante durante o inverno para os animais que vivem na Floresta com Araucária [3].

A propagação da araucária é realizada sexuadamente, entretanto, a produção de sementes depende da polinização cruzada e, uma vez que são na maior parte dioicas, existe a dependência de as árvores masculinas e femininas estarem próximas para a maior produção de pinhões. Também, as condições estacionais interferem na formação dos pinhões. Outra desvantagem da produção de mudas por sementes visando plantios comerciais é a grande variabilidade genética presente entre as árvores [5].

A aplicação de técnicas de propagação assexuada *in vitro*, a partir de segmentos do caule, pode ser uma ferramenta para elevar a produção de mudas de araucária, visando à conservação da espécie, bem como para a formação de novos plantios com o objetivo de produção de madeira e disponibilizar o pinhão [6]. A técnica pode ser adotada para propagar e conservar espécies florestais ameaçadas [7], entretanto, no Brasil, são poucas as pesquisas voltadas utilizando a biotecnologia em espécies nativas e a principal dificuldade encontrada naquelas realizadas está na fase da desinfestação de micro-organismos, tanto exógenos quanto endógenos [6].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o estabelecimento *in vitro* de *Araucaria angustifolia*, a partir de segmentos nodais coletados em duas diferentes posições na muda – apical e intermediária.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Equipamentos do laboratório: beckeres, bastão de vidro, funil para filtração e filtro de papel, balança digital, peagâmetro e liquidificador.

Equipamentos da casa de vegetação: tubetes de 50 cm³ de capacidade e bandejas de poliestireno expandido para acondicionar os tubetes, bancada e sistema de nebulização.

Insumos necessários: substrato comercial; fertilizante orgânico Biofertilizante; e soluções de hidróxido de sódio, ácido clorídrico e hipoclorito de sódio.

2.2. Metodologia

Em mudas de araucária, contendo em torno de 20 cm de altura, foram realizadas aplicações do fungicida Captan® (3 g L⁻¹) três dias antes da implantação do experimento, quando foram seccionadas na região apical, obtendo-se segmentos de 6,0 cm e sem as acículas/folhas. Estes

foram esterilizados em solução com Tween 20 a 0,1%, fungicida Captan® (3 g L⁻¹) e amoxicilina (500 mg L⁻¹).

Na câmara de fluxo laminar a, desinfestação superficial dos segmentos foi efetuada com a imersão em solução de etanol a 70% (v/v), por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) durante 10 min e 20 min. Na sequência, os segmentos foram divididos em duas posições: apical e intermediária com aproximadamente 3,0 cm de comprimento, constituindo as microestacas apicais e basais.

As microestacas foram, então, inoculadas em frascos de vidro contendo 100 mL do meio nutritivo de Murashige e Skoog [8] (MS), acrescido de sacarose (30 g L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) (250 mg L⁻¹). Em cada frasco foram inoculados duas microestacas. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos contendo os segmentos caulinares foram revestidos com papel alumínio, visando impedir a oxidação, e mantidos na câmara climatizada (BOD), sob temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 h diárias e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹. Após sete dias foi retirado o papel alumínio e os explantes foram mantidos nas mesmas condições.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, totalizando 4 tratamentos em esquema fatorial 2x2, sendo os fatores: tipos de microestacas (apical e intermediária) e período de desinfestação com NaOCl (10 min e 20 min). Para cada tratamento foram utilizadas 10 microestacas e duas repetições. Após 90 dias da produção das microestacas foram mensuradas a sobrevivência destas, a porcentagem de microestacas com contaminação (contaminação geral por micro-organismos), com oxidação fenólica e crescimento de brotos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

3. Resultados e Discussão

Os resultados mostraram que o uso de NaOCl nos dois períodos testados foi eficiente para a assepsia dos segmentos nodais para as duas posições testadas, apical e intermediária. A descontaminação foi maior para as microestacas apicais, com apenas 10% destas apresentando contaminação para o tratamento com NaOCl 1,5% por 10 min) e 5% para o tratamento por 20 min, enquanto as microestacas da posição intermediária apresentaram 30% e 15%, respectivamente (Tabela 1).

A porcentagem de oxidação foi superior para as microestacas tratadas com o NaOCl por 20 min com 100% das microestacas apresentando-se oxidadas, o que resultou na morte destas. Para o tratamento com NaOCl por 10 min, 20% das microestacas da posição apical apresentaram oxidação, enquanto para as da posição intermediária 45% estavam oxidadas, impedindo a sobrevivência, com 80% e 55% de microestacas vivas aos 90 dias de cultivo, respectivamente, para as da posição apical e intermediária (Tabela 1).

Em relação à formação de brotos, apenas 30% das microestacas da posição intermediária sob o tratamento com NaOCl 1,5% por 10 min apresentaram as brotações, estas com um tamanho médio de 15 mm (Tabela 1), resultado similar ao obtido para *A. angustifolia* [9].

Para as contaminações observadas, sugere-se que para as espécies lenhosas cultivadas *in vitro*, elas são geralmente de origem endógena e os processos de desinfestações comumente utilizados são pouco eficientes [10]. No presente trabalho o uso de NaOCl na concentração de 1,5% em um período de 10 min de exposição das microestacas foi satisfatório. A menor taxa de contaminação, bem como de oxidação, nas microestacas da posição apical pode ser pelo fato dos tecidos mais jovens apicais, por estarem em intenso processo de divisão celular, serem mais

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

resistentes à ação de patógenos e de substâncias tóxicas em relação às microestacas da posição intermediária, com tecidos com mais baixa atividade metabólica e com concentração de nutrientes nas células [11].

Tab 1 - Porcentagem de contaminação, de oxidação e de sobrevivência de microestacas de *Araucaria angustifolia* submetidas a dois tratamentos: desinfestação com NaOCl 1,5% por 10 min (T1) e por 20 min (T2), bem como a porcentagem de microestacas com brotações.

Posição do segmento nodal	Tratamentos	Contaminação (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)	Brotações (%)
Apical	T1	10 c	20 c	80 a	0 b
	T2	5 d	100 a	0 c	0 b
Intermediária	T1	30 a	45 b	55 b	30 a
	T2	15 b	100 a	0 c	0 b
Média		85,00%	66,25%	33,75%	7,50%
CV		12,71%	60,81%	119,36%	200%

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: (Autor, 2025).

A ação tóxica pelo NaOCl quando as microestacas foram submetidas a um maior período de exposição também foi observada para a micropropagação de outras arbóreas nativas, como aroeira do sertão [12] e falso-pau-brasil [13].

A maior formação de brotações nas microestacas intermediárias, posição mais próximas à base do caule, pode estar relacionada ao gradiente de juvenilidade em direção à base da árvore [14].

4. Considerações finais

Dentro das condições testadas, é possível o estabelecimento *in vitro* de *Araucaria angustifolia* a partir de microestacas obtidas da posição intermediária de segmentos caulinares de mudas de origem seminal, utilizando como tratamento para desinfestação hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% por 10 min.

Agradecimentos

Agradecemos à Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito, à CPRJI e ao Centro Paula Souza.

Referências

[1] MMA. Portaria MMA N° 443, de 17 de dezembro de 2014. Disponível em: <http://cncflora.ibri.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf>. Acesso em 20 mar. 2025.

[2] BRASIL. Projeto de Lei N° 6.914, de 2017. Institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Consciente e de Qualidade da Araucária. 2017. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/1528362.pdf>>. Acesso em 20 mar. 2025.

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

- [3] VIDOLIN, G. P.; BATISTA, D. B.; WANDEMBRUCK, A. Landscape valuation based on the ecological requirements of 'Tayassu pecari' and 'Tapirus terrestris' - a forest with araucaria, in Paraná State, Brazil. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 3, p. 505-515, 2011. <https://doi.org/10.5902/198050983808>
- [4] DANNER, M. A.; ZANETTE, F.; RIBEIRO, J. Z. O cultivo da araucária para produção de pinhões como ferramenta para a conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 441-451, 2012. <https://doi.org/10.4336/2012.pfb.32.72.44>
- [5] WENDLING, I.; STUEPP, C.A.; ZANETTE, F. Produção de mudas de araucária por estaquia e miniestaquia. In: WENDLING, I.; ZANETTE, F. (orgs.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa Brasília, DF, 2017, p. 63 -106
- [6] OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>
- [7] ARAGÃO, V. P. M.; NAVARRO, B.V.; SILVA, A.T.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Micropropagation of *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze, an endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 13, n. 2, p. 41-50, 2017.
- [8] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [9] PEREIRA, M. M.O; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; TEIXEIRA, D.S; MISSIO, F.F; TONETT, E. L. Estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de Araucária (*Araucaria angustifolia*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 4, p. 303-309, 2014. <https://doi.org/10.18188/sap.v13i4.7845>
- [10] MORAES, L.K.A.D.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; SILVA, A.L.D. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura 'dupla-fase'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n.3 p. 403-405, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000300008>
- [11] TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- [12] NOGUEIRA, A.S; SOUZA, N.D.S.; HONORATO, G.A.S.; OLIVEIRA, L.S. Ácido ascórbico e carvão ativado no controle de oxidação fenólica em explantes de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. In: 9º Congresso Florestal Brasileiro. **Anais...** Brasília/DF, 2022. Disponível em: <<https://publicacoes.softaliza.com.br/congressoflorestalbrasileiro/>>. Acesso em 25 mar. 2025.
- [13] HASS, O. O.; ORNELLAS, T. S.; BITTENCOURT, R. Propagação *in vitro* de *Colubrina glandulosa* Perkins: espécie nativa com potencial para programas de reflorestamento. **Ciência Florestal**, v. 32, n. 1, p. 287-308, 2022. <https://doi.org/10.5902/1980509853294>
- [14] WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado e espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 187-94, 2001.