



# ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ARAUCÁRIA (*Araucaria angustifolia*) A PARTIR DE MICROESTACAS

## *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF BRAZILIAN PINE (*Araucaria angustifolia*) OBTAINED FROM MICROCUTTING

Márcia Aparecida Novaes Gomes<sup>1</sup>; Alessandro dos Santos Moraes<sup>2</sup>; Erick Vinicius do Nascimento<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito (Fatec – CB), R. Amantino de Oliveira Ramos, 60, Terras do Imbirucu, Capão Bonito – São Paulo, CEP 18301-225. Brasil. [marcia.angomes@fatec.sp.gov.br](mailto:marcia.angomes@fatec.sp.gov.br). Apresentador do trabalho.

<sup>2</sup>Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito (Fatec – CB), R. Amantino de Oliveira Ramos, 60, Terras do Imbirucu, Capão Bonito – São Paulo, CEP 18301-225. Brasil. [alessandro.moraes01@fatec.sp.gov.br](mailto:alessandro.moraes01@fatec.sp.gov.br).

<sup>3</sup>Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito (Fatec – CB), R. Amantino de Oliveira Ramos, 60, Terras do Imbirucu, Capão Bonito – São Paulo, CEP 18301-225. Brasil. [erick.nascimento7@fatec.sp.gov.br](mailto:erick.nascimento7@fatec.sp.gov.br).

### INTRODUÇÃO

*Araucaria angustifolia* (Bert.), popularmente 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, do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2014). 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 (BRASIL, 2017).

A madeira que produz é destaque em áreas como a construção civil, moveleira e na marcenaria (VIDOLIN; BATISTA; WANDEMBRUCK, 2011). Sua semente, o pinhão, tem potencial comercial na indústria de alimentos e pode ser uma alternativa viável e rentável para a sua exploração (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012). Ecologicamente tem importância pelo fato do pinhão ser o alimento mais importante durante o inverno para os animais que vivem na Floresta com Araucária (VIDOLIN; BATISTA; WANDEMBRUCK, 2011).

A propagação da araucária, como para a maioria das coníferas, 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. (WENDLING; STUEPP; ZANETTE, 2017).

Segundo Oliveira et al. (2014), 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. Segundo Aragão et al. (2017), a técnica pode ser



adotada para propagar e conservar espécies florestais ameaçadas, 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 (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

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.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em mudas de araucária, contendo em torno de 20 cm de altura, foram realizadas aplicações do fungicida Captan® (3 g L<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>) e amoxicilina (500 mg L<sup>-1</sup>).

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 (1962) (MS), acrescido de sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (7 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>) e do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) (250 mg L<sup>-1</sup>). 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<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. 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).

## 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).

**TABELA 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.

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* por Pereira et al. (2014).

Para as contaminações observadas, Moraes et al. (2004) sugerem que para as espécies lenhosas cultivadas *in vitro*, elas são geralmente de origem endógena e os processos de desinfestações comumente utilizados são pouco eficientes. 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 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 (TAIZ; ZEIGER, 2009).

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 (NOGUEIRA et al., 2020) e falso-pau-brasil (HASS; ORNELLAS; BITTENCOURT, 2022).

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 (WENDLING; XAVIER, 2001).

## CONCLUSÕES

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.

## REFERÊNCIAS

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.

BRASIL. **Projeto de Lei Nº 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. 2024.

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.

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.

MMA. **Portaria MMA Nº 443, de 17 de dezembro de 2014.** Disponível em: [http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/static/pdf/portaria\\_mma\\_443\\_2014.pdf](http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf). Acesso em 20 mar. 2024.



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.

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.

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.

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.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

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.

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

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado e espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 187-94, 2001.