OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

12 CONSUMO E PRODUÇÃO RESPONSÁVEIS

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

15 VIDA TERRESTRE

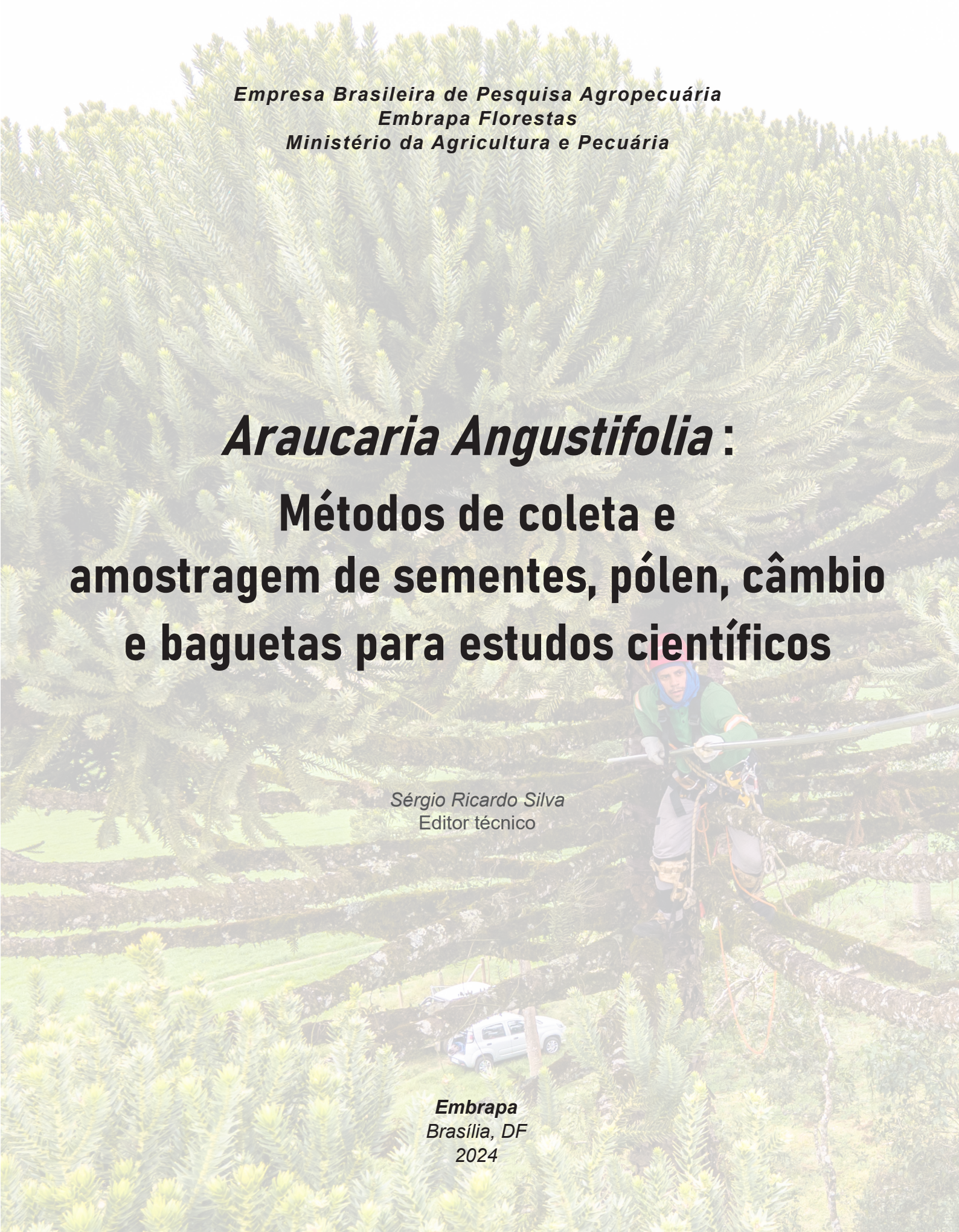
ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA: MÉTODOS DE COLETA E AMOSTRAGEM DE SEMENTES, PÓLEN, CÂMBIO E BAGUETAS PARA ESTUDOS CIENTÍFICOS

Sérgio Ricardo Silva
Editor técnico

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura e Pecuária

Araucaria Angustifolia: Métodos de coleta e amostragem de sementes, pólen, câmbio e baguetas para estudos científicos



Sérgio Ricardo Silva
Editor técnico

Embrapa
Brasília, DF
2024

Exemplares desta publicação não podem ser comercializados, podendo ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente
José Elidney Pinto Júnior

Secretária-executiva
Elisabete Marques Oaida

Membros
Annete Bonnet
Cristiane Aparecida Fioravante Reis
Elenice Fritzsons
Guilherme Schnell e Schühli
Marilice Cordeiro Garrastazú
Sandra Bos Mikich
Susete do Rocio Chiarello Penteado
Valderês Aparecida de Sousa

Supervisão editorial e revisão de texto
José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica
Francisca Rasche

Projeto gráfico e editoração eletrônica
Celso Alexandre de Oliveira Eduardo

Capa
Celso Alexandre de Oliveira Eduardo

Foto da capa
André Kasczeszen

1ª edição
1ª impressão (2024): 500 exemplares

Todos os direitos reservados
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Florestas

Silva, Sérgio Ricardo.
Araucaria angustifolia : métodos de coleta e amostragem de sementes, pólen, câmbio e baguetas para estudos científicos / Sérgio Ricardo Silva, editor técnico. – Brasília, DF : Embrapa, 2024.
85 p. : il. color. ; 21,0 x 27,0 cm.

ISBN 978-65-5467-072-2

1. Pinheiro do Paraná. 2. Coleta de dados. 3. Pesquisa florestal. 4. Recurso genético. 5. Conservação. 6. Manejo florestal. I. Embrapa Florestas.

CDD (21. ed.) 634.9751

Francisca Rasche (CRB-9/1204)
© Embrapa 2024

Autores

Ananda Virginia de Aguiar

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR

Sérgio Ricardo Silva

Engenheiro-agrônomo, doutor em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR

Tiago Luiz Daros

Engenheiro Florestal e Biólogo, mestre em Botânica, Especialista em Conservação Ambiental da Arauco Brasil, Curitiba, PR

Valderês Aparecida de Sousa

Engenheira Florestal, doutora em Ciências Florestais, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR

Agradecimentos

À Engie Brasil Energia, por financiar o projeto "ConservAção da Araucária", que teve como um dos objetivos o estabelecimento de coleção de material genético de *Araucaria angustifolia*. Este livro é um dos resultados do projeto.

Aos proprietários rurais João Andreata, Artur Soares, Pedro Rosenente e Egas Aragão, e aos proprietários da empresa Pizzatto, pela permissão ao acesso nas respectivas propriedades, para coleta de sementes, câmbio e baguetas de araucária em florestas naturais.

Aos alpinistas florestais da empresa Kolecti pela coleta de sementes nas árvores de araucária.

Aos técnicos da Embrapa Florestas Carlos Roberto Urio, Décio Adams Júnior, Jacir Faber e Harry Hoffmann, e aos assistentes Ozias Nunes da Veiga, Marcos Gonçalves Tenorio, Mário Kioshi Yamada e Reginaldo Gonçalves (in memoriam), pelos trabalhos de campo. À técnica Marianne Bernardes e às estagiárias Ana Correa e Janaina Spoladore, pelo processamento em laboratório das amostras coletadas em campo.

Aos autores dos capítulos deste livro, pelo comprometimento e esmero na redação científica.

À equipe editorial do Comitê Local de Publicações da Embrapa Florestas e aos dez revisores ad hoc anônimos pelas contribuições e dedicação para a melhoria da qualidade desta obra.

Sérgio Ricardo Silva

Editor técnico

Apresentação

Este livro é resultado da parceria da Engie Brasil Energia com a Embrapa Florestas. O compromisso das empresas com a inovação e sustentabilidade motivou o desenvolvimento de um projeto de pesquisa pautado na integração de práticas de campo com tecnologias geradas no meio científico. Assim, os métodos propostos nesta obra almejam ser eficazes, sustentáveis e aplicáveis em diferentes contextos acadêmicos e ambientais, em prol do desenvolvimento da sociedade.

As informações apresentadas contemplam métodos consolidados e exploram recentes inovações para a coleta, beneficiamento e conservação de sementes, pólen, câmbio e baguetas de araucária. Cada capítulo foi cuidadosamente elaborado para oferecer um guia abrangente e prático para estudantes, pesquisadores e outros profissionais, integrando conhecimentos adquiridos na vivência de campo com tecnologias validadas cientificamente. O conteúdo deste trabalho enriquece o entendimento teórico e inspira novas abordagens para os desafios futuros na conservação e manejo de *Araucaria angustifolia*.

Além de seu valor científico, o livro oferece exemplos que ilustram a aplicação prática das técnicas em diversos cenários de pesquisa. Neste contexto, a colaboração entre instituições de pesquisa e empresas privadas tem demonstrado um compromisso de ambas as partes com a sustentabilidade e a preservação de recursos genéticos vegetais, inspirando futuras gerações a continuar avançando nesse campo crucial para garantir a biodiversidade dos ecossistemas.

Deste modo, o tema abordado neste livro está alinhado às metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos pela Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), em especial dos ODS 12 e 15, por apresentar técnicas importantes para estudos direcionados ao entendimento e à gestão sustentável deste importante recurso florestal.

Que este trabalho seja uma fonte de conhecimento e um catalisador para avanços significativos na ciência da conservação genética e manejo da araucária e de outras espécies da flora brasileira, beneficiando as gerações presentes e futuras.

Marcelo Francia Arco Verde

Chefe-Geral Interino da Embrapa Florestas

Prefácio

Este trabalho decorre do esforço conjunto para o avanço do entendimento e da prática na conservação e manejo dos recursos genéticos da araucária, espécie emblemática da Floresta Ombrófila Mista, pertencente ao bioma Mata Atlântica, especialmente na região Sul do Brasil.

Ao longo das últimas décadas, a amostragem de sementes tem sido fundamental para a propagação de plantas destinadas à restauração de áreas ambientais de alto valor de conservação. Além disso, as amostragens de pólen, câmbio e baguetas têm se mostrado igualmente essenciais para estudos científicos abrangentes e precisos, especialmente no que diz respeito à conservação e ao melhoramento genético de espécies arbóreas. O foco está na manutenção e/ou aumento da biodiversidade e adaptabilidade das espécies, considerando especialmente as mudanças climáticas em curso no nosso planeta.

Para contribuir com a preservação de *Araucaria angustifolia*, o livro contou com a participação de especialistas de diversas áreas que apresentam desde os fundamentos teóricos até as aplicações práticas mais atualizadas. O capítulo 1 detalha métodos essenciais de coleta de sementes, visando a produção de mudas de alta qualidade para plantios destinados à restauração de áreas ambientais e à conservação genética da araucária. No capítulo 2, são discutidos procedimentos de coleta de pólen, essencial para os programas de melhoramento genético da espécie. O capítulo 3 explora técnicas alternativas e inovadoras para a amostragem de câmbio, material biológico utilizado em estudos de caracterização genética de populações naturais de diversas espécies de árvores. Por fim, o capítulo 4 apresenta métodos de amostragem de baguetas utilizados nos estudos de dendrocronologia, para melhor entendimento do crescimento e da adaptação da araucária ao longo do tempo.

Espera-se que esta obra seja um guia indispensável para pesquisadores, estudantes e profissionais que se dedicam à ecologia, silvicultura, produção de mudas, melhoramento e conservação genética de *Araucaria angustifolia*, contribuindo para a promoção de práticas ambientais cada vez mais eficientes e responsáveis.

Sérgio Ricardo Silva

Editor técnico

Este livro é dedicado a todos os pesquisadores, cientistas e professores do Brasil envolvidos com a conservação de *Araucaria angustifolia*. E também a todos os agricultores e silvicultores que cuidam das florestas, sabendo conciliar a produção de alimentos e madeira com a conservação do meio ambiente.

Sumário

Capítulo 1

Método de coleta de sementes de *Araucaria angustifolia* para produção de mudas e plantios destinados à conservação genética 10

Capítulo 2

Método de coleta de pólen de *Araucaria angustifolia* para uso em programas de melhoramento e conservação genética 31

Capítulo 3

Método de amostragem de câmbio para extração de DNA e caracterização genética de populações naturais de *Araucaria angustifolia*.....45

Capítulo 4

Método de amostragem de baguetas para estudos de dendrocronologia em populações naturais de *Araucaria angustifolia* 57

Capítulo 1

Método de coleta de sementes de *Araucaria angustifolia* para produção de mudas e plantios destinados à conservação genética

Sérgio Ricardo Silva
Valderês Aparecida de Sousa
Ananda Virginia de Aguiar

Introdução

Araucaria angustifolia (Bertol.) O. Kuntze, espécie popularmente conhecida como pinheiro-do-paraná ou simplesmente araucária, presta importantes serviços ecossistêmicos de alto valor ambiental e econômico (Garcia; Parron, 2021). Sua madeira possui várias aplicações nas indústrias madeireira e moveleira, sendo utilizada na construção civil e na fabricação de instrumentos musicais e utensílios domésticos. As sementes da araucária, ou pinhões, estão acondicionadas dentro da pinha ou cone, que é o estróbilo feminino da espécie (Figura 1). Os pinhões são um produto florestal não madeireiro amplamente utilizado na culinária, particularmente na região Sul do Brasil, além de serem fonte de alimento para diversas espécies da fauna silvestre presente na Floresta Ombrófila Mista (FOM), pertencente ao bioma Mata Atlântica. As árvores da espécie desempenham importantes funções ecológicas na FOM, contribuindo para a conservação do solo e da água, além de proporcionar abrigo para a fauna e outros organismos. Além disso, a araucária apresenta alta relevância paisagística devido à singularidade e exuberância de seu formato, contribuindo para a beleza cênica de paisagens rurais e urbanas.

Fotos : André Kaszczeszen

Figura 1. Pinha (A) e sementes (B) de *Araucaria angustifolia* coletadas em área nativa da Floresta Ombrófila Mista em Castro, PR.

Não obstante o relevante valor ambiental e econômico da araucária, a espécie foi submetida a um intenso processo de exploração e extrativismo, principalmente no século XX, o que resultou em grande declínio de sua população original, levando à sua inclusão na Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção, sendo classificada como "em perigo" (Brasil, 2014). Desde então, a conservação genética da espécie tem ocupado lugar de destaque na pauta de várias entidades do setor público e da sociedade civil, abrangendo ambientalistas, cientistas, agricultores e diversas organizações, sendo parte de políticas públicas estaduais e federais (Ganem, 2011).

A conservação genética da araucária baseia-se em técnicas fundamentadas em bases científicas, de modo a promover a manutenção permanente da diversidade e variabilidade do germoplasma em condições específicas. Há duas estratégias principais utilizadas para esse tipo de conservação denominadas in situ e ex situ, que não são excludentes, e sim complementares, sendo amplamente utilizadas para espécies ameaçadas de extinção (Kageyama et al., 2001; Costa; Bajgielman, 2016; Sousa et al., 2021). No processo de conservação in situ, a espécie permanece em seu habitat natural, de modo que a evolução natural ocorra de forma contínua a partir da diversidade genética disponível. Assim, as populações in situ contribuem para a geração de novos genes e combinações alélicas (genótipos), o que resulta em melhor resposta às mudanças ambientais e no estabelecimento de resistência a novos patógenos, pragas e doenças que surgirem. Por outro lado, a conservação ex situ considera a manutenção dos genes e alelos em condições artificiais e/ou controladas (e.g., câmara fria, criopreservação e banco ativo de germoplasma), externamente

ao habitat natural, utilizando coleções de pólen, sementes, cultura de tecidos, embriões zigóticos ou mesmo de plantas cultivadas em campo experimental (Paiva; Valois, 2001; Steiner et al., 2020; Sousa et al., 2021). Assim, estes materiais mantidos em condições mais controladas, após serem caracterizados e documentados, podem ser utilizados em programas de melhoramento genético para diversas finalidades. Além disso, a manutenção de populações ex situ servem como "estoque" de indivíduos (*pool* gênico) para possíveis reintroduções e ampliação do tamanho de populações nativas.

Nesse contexto, as sementes coletadas em florestas naturais ocupam papel de destaque como insumo-chave para produção de mudas de araucária, que podem ser utilizadas em projetos de restauração e/ou recomposição de áreas desflorestadas, tais como: Áreas de Preservação Permanente (APP), Reserva Legal (RL) e Unidades de Conservação (UC). Essas áreas são importantes na promoção de serviços ambientais e ecossistêmicos de modo permanente e sustentável, combinados com a conservação da espécie.

A coleta de sementes em árvores de araucária demanda o domínio de diversas áreas de conhecimento, incluindo procedimentos para amostragem das matrizes, caracterização fenológica das pinhas, técnicas de escalada de árvores, beneficiamento e armazenamento de sementes, dentre outras. No entanto, as informações disponíveis, seja na literatura ou na forma de conhecimento tradicional em posse de povos indígenas e comunidades locais, ainda estão dispersas e fragmentadas. Assim, há uma demanda por um documento que sintetize de forma estruturada os métodos existentes, como subsídio para que a coleta de sementes seja bem-sucedida.

O objetivo deste trabalho é colaborar no atendimento desta demanda, por meio de um manual prático e acessível a todos aqueles envolvidos na conservação genética desta importante espécie florestal.

Legislação sobre coleta de sementes de espécies nativas

Há uma legislação federal que contempla a coleta, produção e comercialização de sementes de espécies nativas, que é regulamentada pela Instrução Normativa (IN) nº 17, de 26 de abril de 2017 (Brasil, 2017). Deste modo, antes de iniciar a coleta de sementes de araucária é preciso conhecer os procedimentos legais para realizar esta atividade. De modo simplificado, destacam-se os seguintes tópicos desta IN:

- De acordo com o artigo 3º, caso o objetivo seja a comercialização de sementes, é preciso que as pessoas físicas e jurídicas se inscrevam no Registro Nacional de Sementes e Mudas (Renasem). Esta inscrição também é obrigatória para execução de atividades de responsabilidade técnica, como amostragem, coleta, certificação e análise laboratorial de sementes.
- Quando se tratar de um produtor de sementes, é preciso encaminhar ao órgão de fiscalização da Unidade da Federação, até 30 de março do ano subsequente, o Relatório Anual de Produção e Comercialização de Sementes (inciso VII do artigo 5º).
- O produtor que coleta as próprias sementes deverá declarar a fonte de sementes ao órgão de fiscalização da Unidade da Federação correspondente (i.e., onde as sementes serão coletadas), no prazo de 30 de março do ano corrente (artigo 6º). Esta declaração acompanha os seguintes documentos: i) "croqui ou roteiro de acesso à fonte de sementes"; ii) "autorização do detentor dos direitos da propriedade intelectual da cultivar protegida no Brasil, quando for o caso".
- As sementes das espécies florestais são classificadas em quatro categorias (artigo 7º): i) identificada (provenientes de matrizes com determinação botânica e localização da população); ii) selecionada (de matrizes em populações selecionadas fenotipicamente em uma determinada condição ecológica); iii) qualificada (de matrizes selecionadas em populações selecionadas e isoladas contra pólen externo); iv) testada (de matrizes selecionadas geneticamente, com base em testes de progênie ou testes aprovados pela entidade certificadora, para áreas isoladas contra pólen externo).

- O "Coletor de Sementes de Espécies Florestais" deverá se credenciar no Renasem, sendo que sua prestação de serviços deverá ser comprovada por meio de contrato ou documento similar, ou por meio de identificação do coletor no Laudo de Vistoria (artigos 8° e 9°).
- "O beneficiamento das sementes deverá ser realizado pelo próprio produtor ou por beneficiador inscrito no Renasem" (artigo 11).
- "As sementes ou os frutos, contendo as sementes, deverão estar acompanhados da nota fiscal, ou do Laudo de Vistoria ou do contrato de prestação de serviço do coletor, quando estiverem sendo transportados para beneficiamento ou armazenamento fora da propriedade onde se realizou a coleta dos frutos ou das sementes" (artigo 12).
- "O armazenamento das sementes poderá ser realizado pelo próprio produtor ou por armazenador inscrito no Renasem" (artigo 15).
- "As sementes deverão ser identificadas desde a coleta até sua comercialização [...] com, no mínimo, as seguintes informações: i) nome da espécie e da cultivar, quando for o caso; ii) nome do município onde as sementes foram coletadas, conforme a declaração da fonte de sementes; iii) categoria; iv) data de coleta; e v) nome do produtor" (artigos 34 e 35). No entanto, para a finalidade de comercialização de sementes de espécies florestais, a identificação deve ser mais ampla, incluindo, por exemplo: nome científico da espécie, identificação do lote, período de coleta (mês/ano), percentagem de germinação e viabilidade do lote de sementes, dentre outros (artigo 36).
- O responsável técnico pela coleta e produção de sementes "deverá ser um profissional qualificado e devidamente registrado no respectivo conselho profissional, que o habilite para: i) orientar a seleção fenotípica ou genética de matrizes nas fontes de sementes; ii) recomendar procedimentos de beneficiamento, de armazenamento, de tecnologia de sementes e de manejo a serem adotados na fonte de sementes" (artigo 50). Entre as suas obrigações, ele deve executar vistorias e supervisionar as atividades relativas à produção e à fonte de sementes, emitir e assinar os documentos correspondentes, e manter toda a documentação atualizada e organizada à disposição do produtor contratante (artigo 51).
- Quando a coleta de sementes de espécies florestais destina-se exclusivamente ao uso próprio, no mesmo imóvel rural de origem das matrizes produtoras de sementes, a IN prevê um processo simplificado, no qual o agricultor poderá coletar as sementes e produzir as respectivas mudas, respeitando as seguintes normas quanto aos materiais (sementes e mudas) produzidos: i) "serem utilizados apenas em propriedade de sua posse, sendo proibida a comercialização do material produzido; ii) estar em quantidade compatível com a área a ser plantada; e iii) declarar sua produção de sementes, de material de propagação vegetativa ou de mudas para uso próprio ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), quando o material de propagação utilizado for de cultivar protegida no Brasil [...], antes do início da produção" (artigo 61).

Portanto, a coleta de sementes de espécies florestais nativas não pode ser realizada arbitrariamente, devendo seguir as normas e os protocolos estabelecidos pela legislação. Além disso, vale ressaltar que a coleta de sementes deve ser precedida de autorização formal do proprietário do imóvel rural ou dos representantes legais de UCs públicas, onde as árvores matrizes de araucária estão presentes.

Fenologia e maturidade de pinhas

A araucária, por pertencer ao grupo das gimnospermas, que não produzem flores, mas sim estróbilos masculinos e femininos em plantas distintas, é uma espécie dioica e alógama, com reprodução cruzada (Sousa et al., 2021). Também não produz frutos, e sim pinhas, que demoram aproximadamente dois anos para alcançarem a maturidade fisiológica das sementes após a polinização dos estróbilos femininos (Sousa et al., 2021). Deste modo, pode-se encontrar em uma única árvore pinhas em diversos estádios fenológicos: i) recém-formadas, após a efetivação da

fecundação (Figura 2A); ii) intermediárias, originadas no ano anterior (±12 meses) (Figura 2B); iii) maduras (±24 meses) (Figuras 2C e 2D).

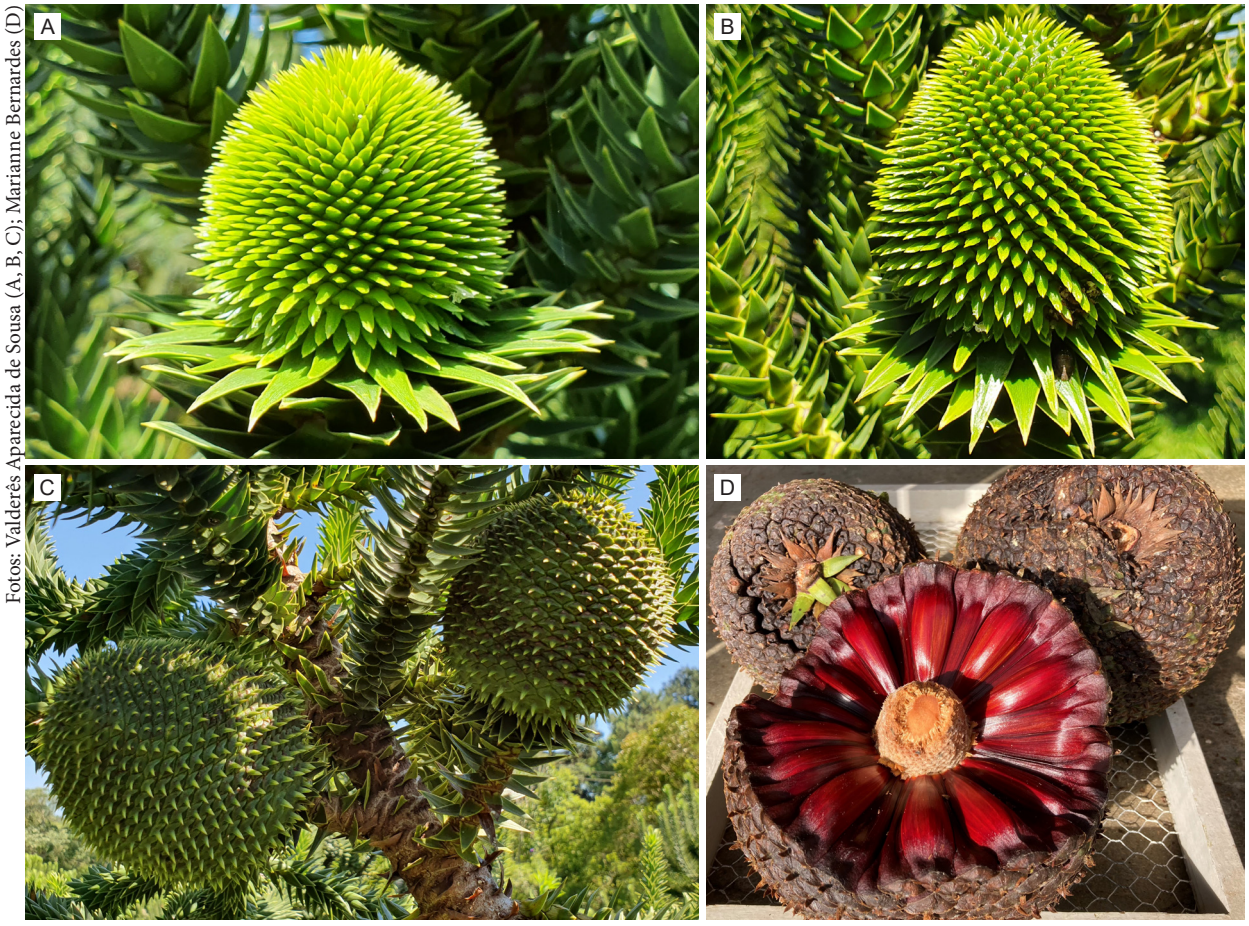


Figura 2. Pinhas de *Araucaria angustifolia* em diversos estádios fenológicos: recém-formada (A); intermediária com ±12 meses (B); e maduras com ±24 meses na árvore (C) e depois da queda natural ao chão (D).

Na região Sul do Brasil, a araucária emite estróbilos masculinos (androestróbilos) anualmente, no período de fevereiro a outubro, alcançando a maturação com liberação total de pólen de agosto a outubro (Sousa et al., 2021). Por sua vez, os estróbilos femininos (ginoestróbilos) são emitidos um pouco antes, tornando-se visíveis a partir de maio e aptos para serem polinizados geralmente de agosto a setembro em Santa Catarina e em outubro no Paraná, cujos períodos variam de acordo com as condições ambientais (Sousa; Hattemer, 2003; Mantovani et al., 2004). É importante destacar que a fertilização do óvulo pelo pólen no interior do ginoestróbilo ocorre aproximadamente 14 meses depois da polinização, sendo que o pólen permanece em estado de dormência na micrópila até este momento da fecundação (Goeten et al., 2020).

Após a polinização, as pinhas alcançam a maturidade após duas estações de crescimento (aproximadamente de 18 a 20 meses), geralmente entre os meses de março e junho, ocasião adequada para serem amostradas (Sousa et al., 2021). Portanto, se houver recursos para realizar várias expedições ao campo, o ideal, para fins de conservação genética da espécie, é amostrar pinhas durante todo o período da safra, de modo a ampliar a variabilidade genética das sementes coletadas. Vale destacar que os pinhões no início e no final da safra apresentam menor variabilidade genética, pois são provenientes de fertilizações de menor número de indivíduos masculinos. Consequentemente,

caso seja possível realizar apenas uma expedição ao campo, recomenda-se amostrar pinhas quando as araucárias estiverem em "plena safra", por volta de abril na região Sul, de modo a contemplar a maior variabilidade genética possível dos pinhões coletados.

Descrição dos métodos

Seleção de locais para coleta de sementes

É importante que cada local selecionado para coleta de sementes, para fins de conservação de recursos genéticos da araucária, seja restrito a uma população natural situada em um ambiente edafoclimático específico, dentro da formação fitogeográfica. Além disso, quando disponíveis, características demográficas, geográficas e genéticas da população a ser amostrada devem ser consideradas no processo de amostragem (Montagna et al., 2012). Quanto à demografia, em populações naturais conservadas, com alta densidade de árvores de araucária, deve-se amostrar um mínimo de 25 matrizes para cada população, como comentado mais adiante. Por outro lado, em populações com árvores muito dispersas, típico de áreas com certo grau de desmatamento ou degradação, deve-se amostrar o número de indivíduos disponíveis dentro de cada ambiente edafoclimático, mesmo que não se atinja o número mínimo de 25 matrizes. Por sua vez, em relação às características geográficas, a amostragem de uma determinada população natural deve contemplar indivíduos localizados em diferentes altitudes e tipos de solos (i.e., ao longo da toposequência), além de várias faces do relevo. Finalmente, caso haja estudo prévio com caracterização genética de uma população, é possível definir com maior exatidão o número mínimo de matrizes a serem amostradas, com base em parâmetros genéticos. Seguindo estas recomendações, eleva-se a probabilidade de aumentar a variabilidade genética das amostras de sementes, considerando o conjunto de coletas de várias populações provenientes de diversos ambientes com características distintas.

Critérios para escolha das árvores a serem amostradas

A representatividade genética de uma população de árvores de uma espécie alógama (i.e., que realiza preferencialmente polinização cruzada, usualmente acima de 95%) depende do número de matrizes amostradas e do número de sementes amostradas por matriz. Esta representatividade pode ser avaliada por meio de estimativas de parâmetros genéticos, principalmente o tamanho efetivo populacional e a frequência alélica (Nunes et al., 2021).

Em termos práticos, para fins de conservação da diversidade genética de populações naturais sem informações prévias de parâmetros genéticos, recomenda-se amostrar um mínimo de 25 matrizes para cada população não endogâmica ou 30 matrizes quando há indícios de endogamia (Sebbenn, 2002). Por sua vez, Nunes et al. (2021) mencionam que, para garantir a conservação da variabilidade genética de uma espécie florestal alógama, é preciso amostrar pelo menos quatro populações distintas, incluindo 15 matrizes em cada população.

Durante o processo de amostragem das árvores para coleta de pinhas, recomenda-se manter uma distância mínima de 70 a 100 m entre as matrizes, de modo a reduzir o grau de parentesco entre elas (Sebbenn, 2002; Mantovani et al., 2006). Neste contexto, Bittencourt e Sebbenn (2008) sugeriram uma distância mínima de 75 m entre árvores para a coleta de sementes com fins de conservação genética da araucária, baseando-se nas distâncias médias de polinização de 102 m e 98 m em uma floresta contínua, estimadas por duas técnicas diferentes: análises de paternidade e TwoGener, respectivamente. Por sua vez, Medina-Macedo et al. (2015), corroboraram esta distância mínima, pois estimaram que o raio médio efetivo de dispersão de pólen de araucária foi 75 m no interior de um fragmento florestal. Como a finalidade desta amostragem é a conservação genética da espécie, os indivíduos são amostrados aleatoriamente, sem considerar características específicas de interesse silvicultural ou de produtividade. Em termos práticos e

operacionais, a partir da primeira matriz amostrada no campo, é realizado o caminhamento aleatório considerando uma distância aproximada de 100 m no interior da floresta até encontrar outra árvore contendo pinhas, que será a segunda matriz, e assim sucessivamente. Normalmente, se adota o caminhamento em zigue-zague dentro da área, em um sentido pré-determinado no transecto da floresta. Caso não haja uma árvore com pinhas maduras nessa distância de 100 m, deve-se escolher a vizinha mais próxima para realizar a amostragem. Reforça-se a recomendação de que não se deve selecionar as árvores e sim tomá-las ao acaso, pois a representatividade genética é o fator mais importante para o objetivo deste trabalho.

No entanto, quando o objetivo da coleta de sementes está voltado para o melhoramento genético da espécie, visando plantios comerciais, é importante que sejam adotados critérios específicos para a amostragem de árvores. Deste modo, os indivíduos são selecionados com base nas características fenotípicas adequadas para a silvicultura, principalmente para produção e qualidade de madeira e pinhões. Assim, durante as expedições em florestas naturais, para seleção de árvores, devem ser seguidas as etapas: i) observar se as árvores matrizes apresentam boas características sanitárias e biométricas, com destaque para o formato cilíndrico do tronco e/ou produção de pinhas; ii) mensurar as árvores selecionadas [diâmetro à altura do peito (DAP; ± 1,30 m), altura da árvore, diâmetro médio da copa, altura do primeiro verticilo, espessura da casca etc.]; iii) além disso, quando possível, recomenda-se a coleta de baguetas para estudos de dendrocronologia (ver capítulo 4) e de câmbio para extração de DNA (ver capítulo 3), que permitirão estimar a idade de cada indivíduo amostrado e realizar a sua caracterização genética.

Em ambos os casos, conservação e melhoramento genético, é necessário realizar o georreferenciamento de cada árvore com equipamento de precisão, identificá-la com etiqueta metálica inox, numerada sequencialmente, cuja numeração é também registrada com tinta amarela ou vermelha no tronco da árvore (ver detalhes no capítulo 3).

Métodos de coleta de pinhas em árvores de araucária

O melhor momento para a coleta é quando a pinha está completamente formada e atinge a maturação fisiológica, caracterizada externamente por uma coloração verde-amarronzada, pois suas sementes apresentam melhor qualidade fisiológica e maior poder germinativo nesse estádio (Fowler, 2018). Na prática não é fácil identificar este "ponto ideal" de maturação, o que requer experiência de campo e boa capacidade de observação (Figura 3). Por exemplo, pinhas verdes escuras com áreas amarronzadas nas bases dos pinhões é um indicativo de que estas sementes estão maduras.

Fotos: Valderês Aparecida de Sousa

Figura 3. Pinhas de *Araucaria angustifolia* imaturas (A) e no "ponto ideal" de coleta (B).

A coleta de pinhas diretamente na árvore é preferível em relação à coleta daquelas caídas no chão, de modo a garantir a origem genética das sementes, seja para programas de conservação da espécie ou para a implantação de testes de progênies. Quando possível, particularmente em árvores mais baixas, pode-se utilizar uma corda-coleta [incluindo estilingue ou baladeira, peso de pescaria (chumbo), cordas ou linhas, molinete etc.] para remover as pinhas dos ramos (Figura 4). Em algumas situações, também é possível a derrubada de pinhas com bambus longos, que é um método muito utilizado por agricultores na região Sul do Brasil.

Foto: Carlos Roberto Urio

Figura 4. Coleta de pinhas em árvore de *Araucaria angustifolia* por equipe especializada, utilizando uma corda-coleta.

Considerando que a araucária inicia a produção de estróbilos entre 14 e 16 anos de idade em florestas naturais (Sousa et al., 2021), quando apresenta altura geralmente acima de 15 metros e largo diâmetro, a escalada técnica das árvores – popularmente conhecida como alpinismo florestal – é o método mais indicado, principalmente, em situações onde as pinhas-alvo estão envolvidas por muitos obstáculos, como galhos sobrepostos (Figura 5).

Fotos : André Kaszczeszen

Figura 5. Escalada técnica em árvore de *Araucaria angustifolia*, desde a base do tronco (A) até a copa (B), para coleta de sementes.

Os equipamentos para escalada técnica em árvores incluem: esporas com garras de aço para adaptação em calçados, cadeirinha, cinto de segurança, capacete, estribo, descensor freio oito, trava quedas blocante, descensor auto-blocante, polias de aço dupla, mosquetões de aço, corda estática e cordolete (Figuras 6A–6L). Além disso, é necessário um podão com cabo longo dotado de cortador ou gancho (Figura 6M).

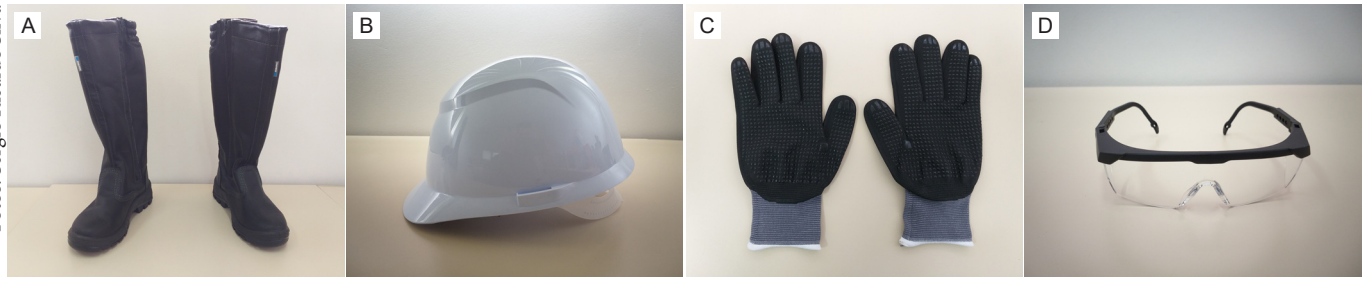
Figura 6. Alguns equipamentos utilizados na escalada técnica de árvores de *Araucaria angustifolia* para coleta de sementes: esporas com garras de aço (A), cadeirinha (B), cinto de segurança (C), capacete (D), estribo de quatro degraus (E), descensor freio oito (F), trava quedas blocante (G), descensor auto-blocante (H), polia de aço dupla (I), mosquetão de aço (J), corda estática (K), cordolete (L) e cabo longo com cortador ou gancho (M).

Ilustração: Sérgio Ricardo Silva

Devido ao significativo nível de risco envolvido na escalada de árvores, é preciso realizar treinamento específico para esta finalidade, incluindo conceitos teóricos e vivência prática. Frequentemente, a melhor alternativa é contratar equipes especializadas que prestam este tipo de serviço.

Há outros métodos que podem ser utilizados para a escalada de árvores, como o uso de escadas acopláveis, escadas de corda, esporas com cinto de segurança, blocante ao tronco com cinto de segurança do rapel etc. (Medeiros et al., 2007; Leão et al., 2015a, 2015b; Bento et al., 2018). Porém, eles são pouco utilizados para araucária.

Independentemente do método utilizado para a coleta de pinhas, é imprescindível o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados, como calçados tipo "perneira", capacete, luvas e óculos de proteção (Figura 7), particularmente durante o caminhamento no interior da floresta.



Fotos: Sérgio Ricardo Silva

Figura 7. Equipamentos de proteção individual (EPIs) utilizados na coleta de pinhas e sementes de *Araucaria angustifolia*: calçado tipo "perneira" (A), capacete (B), luvas (C) e óculos de proteção (D).

Quando não se dispõe dos recursos descritos anteriormente (i.e., corda-coleta ou equipe de escalada), pode-se realizar a coleta das pinhas caídas no chão e próximas da árvore matriz escolhida (Figura 8). No entanto, é imprescindível que a borda da copa das outras árvores femininas em reprodução, com pinhas, se encontre a uma distância mínima de 50 m do local onde as pinhas serão coletadas. Esta é uma condição fundamental para minimizar o risco de mistura de pinhas provenientes de árvores diferentes, particularmente quando a amostragem tem foco em cada indivíduo (matriz) da população selecionada.

Figura 8. Coleta de pinhas no chão sob a copa de uma árvore de *Araucaria angustifolia* (A) e agrupadas por matriz após a conclusão do trabalho (B).

Outra recomendação importante consiste em não coletar pinhas de matrizes totalmente isoladas, sem árvores adultas masculinas na vizinhança, pois as pinhas podem apresentar sementes "chochas" (não viáveis), devido à reduzida taxa de fecundação. Neste contexto, o pólen da araucária se dispersa pelo vento, podendo alcançar até 600 m de distância em campo aberto; porém, no interior da floresta, devido aos obstáculos naturais e às características morfológicas e estruturais do grão de pólen, que é relativamente pesado, ele percorre curtas distâncias, geralmente menores que 263 m dentro de capão e 458 m em floresta aberta (Medina-Macedo et al., 2015). Além disso, a concentração do pólen no ar é inversamente proporcional à distância percorrida (Niklas, 1985), reforçando a necessidade de maior proximidade entre indivíduos masculinos e femininos para a ocorrência da polinização e formação de sementes viáveis.

Para fins de conservação genética da araucária, é preciso coletar aproximadamente oito pinhas por árvore matriz, localizadas em diferentes pontos cardeais (norte, sul, leste e oeste) da copa, de modo que as sementes coletadas sejam oriundas da fertilização de uma maior diversidade de pólens provenientes de várias árvores masculinas. Neste contexto, a direção dos ventos pode afetar essa diversidade de pólens, dependendo da posição do estróbilo feminino na copa. A quantidade de sementes por pinha deve ser em torno de 72 a 120, de modo a permitir a formação de suficiente quantidade de mudas, com alta variabilidade genética. No entanto, se for coletar pinhas (ou sementes) caídas no chão, é necessário aumentar o número total de sementes por árvore matriz, atingindo de 800 a 1.000 unidades, pois estas sementes em contato com o solo podem ter sofrido algum grau de deterioração ou ataque de brocas. Além da formação de mudas para plantio em banco ativo de germoplasma, parte das sementes coletadas são geralmente reservadas e armazenadas em freezer para posterior caracterização genética dos descendentes das árvores matrizes coletadas.

As pinhas coletadas no campo deverão ser acondicionadas em sacos de tecido (Figura 9A) para transporte até o laboratório ou viveiro, na brevidade possível para evitar que as sementes sequem ou sofram outros danos, como o ataque de broca. Durante o transporte do campo até o local de beneficiamento, o ideal é mantê-las resfriadas sob temperatura de 3 a 5 °C (Bianchetti, 1999) em caixas térmicas contendo gelo ou bolsa térmica gel. Após o beneficiamento

das sementes, as amostras são transferidas para sacos de papel kraft (Figura 9B). Ressalta-se que sacos plásticos não são adequados para estas finalidades, pois favorecem a proliferação de fungos, devido à retenção de alta umidade proveniente das pinhas e/ou sementes. Além disso, as sementes precisam de oxigênio para sua manutenção vital, o que é dificultado por embalagens impermeáveis ao ar.

Fotos: Ananda Virginia de Aguiar

Figura 9. Pinhas e sementes de *Araucaria angustifolia* coletadas no campo e armazenadas em sacos de tecido (A) para transporte ao laboratório ou viveiro, sendo posteriormente transferidas para sacos de papel kraft (B) após o beneficiamento.

Método de beneficiamento de sementes

Para aumentar o rendimento operacional da coleta de sementes de araucária em áreas de florestas naturais, não é prática a realização da debulha das pinhas, sua classificação e limpeza em condições de campo, sendo preferencialmente transportadas in natura com um pouco de impurezas (e.g., fragmentos de grimpas, galhos, cascas e folhas). Assim, após o recebimento das pinhas e/ou sementes no laboratório ou no viveiro, essas devem ser beneficiadas antes do armazenamento em câmara fria, com o objetivo de uniformizar e melhorar a qualidade dos lotes de sementes. Este processo de beneficiamento inclui as seguintes etapas:

- **Recepção das amostras e manuseio inicial**: para evitar a contaminação das sementes com fungos, bactérias e vírus, recomenda-se que as bancadas e outros locais onde as sementes serão manuseadas sejam previamente limpos e desinfetados por meio de uma solução aquosa quente com detergente e desinfetante à base de Lysoform ou álcool 70% (Brasil, 2009a). Além disso, é importante o uso de ferramentas e luvas limpas e desinfetadas. Antes de iniciar o manuseio de cada lote de sementes (provenientes de uma árvore matriz), é necessário repetir o processo de desinfecção.
- **Organização de bandejas para recebimento de pinhas**: o primeiro passo do beneficiamento é separar os lotes de pinhas e/ou sementes, individualmente por árvore matriz, em bandejas previamente identificadas com os respectivos códigos das árvores (Figura 10). Esta atividade exige muita atenção, de modo a evitar qualquer tipo de mistura de material genético.
- **Limpeza inicial**: as impurezas mais grosseiras são retiradas manualmente antes da debulha. Nessa etapa devem ser descartadas também as pinhas imaturas (Figura 3A).
- **Secagem das pinhas**: as bandejas contendo as amostras devem ser dispostas em um local ventilado e com baixa umidade do ar para acelerar o processo de secagem e abertura das pinhas. Geralmente, as pinhas devem permanecer nas bandejas por um período aproximado de 15 dias, até a sua abertura, facilitando o posterior beneficiamento.

Fotos: Ananda Virginia de Aguiar

Figura 10. Pinhas e sementes de *Araucaria angustifolia* organizadas em bandejas (A, B), devidamente identificadas com plaquetas, contendo os respectivos códigos das árvores matrizes.

- **Extração das sementes das pinhas**: a retirada das sementes da pinha inicia-se com o rompimento do seu tegumento externo para a liberação dos pinhões, prosseguindo com a debulha (Figura 11).

Fotos: Ananda Virginia de Aguiar

Figura 11. Rompimento do tegumento externo de pinhas de *Araucaria angustifolia* (A), debulha das sementes (B) e produto final deste processamento (C).

- **Limpeza final**: os fragmentos mais finos são eliminados pela agitação da bandeja, que possui fundo constituído por uma tela que funciona como peneira (Figura 12).
- **Classificação das sementes**: após os processos de debulha e limpeza, descartam-se as sementes que estejam "chochas" (ou vazias), imaturas, com fungos ou brocas, quebradas e defeituosas. No entanto, as sementes menores não devem ser descartadas, especialmente se o objetivo é a conservação genética da espécie, pois evita-se a redução de variabilidade genética do lote proveniente de uma matriz (Battilani et al., 2006).

Fotos: Marianne Bernardes (A) Valderês Aparecida de Sousa (B)

Figura 12. Limpeza final de um lote de sementes de *Araucaria angustifolia* (A) por meio da agitação da bandeja com fundo telado (B), que funciona como peneira.

Método de armazenamento de sementes

As sementes de araucária são consideradas recalcitrantes por sofrerem danos fisiológicos ao se desidratarem, perdendo progressivamente a capacidade germinativa ao longo da faixa regressiva de 38% a 25% de umidade, tornando-se inviáveis (mortas) quando apresentam apenas 20% de água (Tompsett, 1984). Após atingirem a maturação, com umidade em torno de 55%, as sementes podem perder totalmente a viabilidade em condições ambientais naturais em um período de 4 a 6 meses (Fowler et al., 1998, 2018; Lorenzi, 2002). Deste modo, o ideal é armazenar as sementes na brevidade possível, logo após a coleta no campo.

O sucesso do armazenamento de sementes recalcitrantes depende do método empregado, que precisa ser ajustado para cada espécie de planta. Entretanto, ainda não se dispõe de métodos eficazes de armazenamento no longo prazo, para a maioria das sementes recalcitrantes da flora brasileira (Fowler, 2018). No caso da araucária, alguns trabalhos foram desenvolvidos e proporcionam resultados satisfatórios, como será visto a seguir.

Fowler et al. (1998) recomendam acondicionar as sementes de araucária recém-coletadas em embalagem de polietileno semipermeável de 24 µm (micra) de espessura e posterior disposição no interior de câmara fria ajustada para temperatura de 4 °C e com umidade relativa do ar de 89%, cujo método permite alcançar uma taxa germinativa de 70% aos oito meses e 60% após um ano de armazenamento. Deve-se notar que esse tipo de embalagem de polietileno é geralmente utilizado na pesquisa sobre conservação de sementes, podendo ser encomendado às empresas fabricantes.

Uma adaptação do método citado anteriormente foi proposta por Fowler (2018), cujas sementes recém-coletadas são colocadas em câmara seca (temperatura de 23 °C e umidade relativa do ar de 9%) para reduzir o teor de água para 38%, ou seja, até o "ponto de umidade crítica de sobrevivência" de sementes de araucária (Eira et al., 1994). O restante do processo é idêntico ao descrito previamente (Fowler et al., 1998). Este procedimento resultou em taxa germinativa de 95% aos 810 dias de armazenamento, com o diferencial de as sementes apresentarem maior vigor, medido pelo índice de velocidade de germinação, o que é fundamental para o bom desenvolvimento das plântulas no período de pós-emergência. O autor relata que sementes recalcitrantes armazenadas com umidade acima do "ponto crítico" e que tenham passado pelos estágios iniciais de germinação, ainda dentro da pinha, são susceptíveis a danos fisiológicos semelhantes àqueles causados pela secagem excessiva, levando ao decréscimo de sua germinação.

Outro método alternativo consiste em acondicionar as sementes em embalagens de polietileno de 0,5 µm de espessura e armazená-las em câmara refrigerada, entre 0 e 1 °C, com umidade relativa do ar entre 90% e 95%, cuja técnica pode resultar em capacidade germinativa superior a 97% após seis meses de armazenamento (Caçola et al., 2006).

É importante ressaltar que temperaturas muito baixas, menor que 0 °C, também causam injúrias às sementes de araucária. Portanto, estas não devem ser armazenadas em freezer, sob pena de perderem completamente a viabili-

dade germinativa (Garcia et al., 2014). Além disso, temperaturas mais elevadas, acima de 20 °C, aceleram a deterioração das sementes da espécie, pois aumentam a taxa respiratória que leva ao consumo de substâncias de reserva, além de ocasionarem a desorganização celular associada à desidratação e à senescência dos tecidos (Amarante et al., 2007).

A susceptibilidade ao ataque de fungos é outra preocupação em relação à manutenção da capacidade germinativa das sementes de araucária recém-coletadas em campo. Assim, é recomendado realizar um tratamento fitossanitário antes de seu armazenamento em câmara fria, utilizando uma solução aquosa com 0,5% a 3% de hipoclorito de sódio (NaClO) (Hennipman et al., 2017). Uma forma prática de realizar este tratamento é utilizando água sanitária comercial, que é vendida em solução de até 2,5% de NaClO. A desinfecção superficial das sementes é realizada por meio de sua imersão na solução de NaClO por período de três minutos, quando são retiradas do recipiente e distribuídas uniformemente, em camada única, sobre papel absorvente, deixando-as secar à sombra. Vale ressaltar que esta desinfecção é desnecessária quando a semeadura for realizada em curto prazo após a coleta em campo.

Métodos expeditos para avaliar a viabilidade de sementes

Considerando a redução significativa da capacidade germinativa de sementes de araucária após a maturação fisiológica, além de um percentual de unidades "chochas" (ou vazias) na pinha, é importante realizar uma avaliação do lote de sementes antes da semeadura, de modo a obter sucesso na formação das mudas, que é favorecida pela alta taxa de germinação e vigor das plântulas emergidas.

Um método prático para avaliar a viabilidade de sementes de araucária é por meio de sua imersão em um recipiente com água: as sementes que permanecerem no fundo são consideradas viáveis, com maior capacidade germinativa. Por outro lado, aquelas que boiarem provavelmente estarão "chochas", não devendo ser semeadas para prevenir falhas no lote de mudas (Jankauskis, 1970; Wendling et al., 2017).

Em laboratório tem-se a opção do teste de tetrazólio, que é utilizado para diversas espécies agrícolas e florestais, com adaptações em relação às Regras para Análise de Sementes (RAS) publicadas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (Brasil, 2009b). Este teste visa avaliar rapidamente a viabilidade de sementes, particularmente daquelas que apresentam dormência, que são recalcitrantes ou que germinam lentamente em testes padrões de rotina laboratorial. Por ser um teste bioquímico, pode ser utilizado em qualquer momento, mesmo que as sementes estejam ainda dormentes ou tenham sido expostas a danos por secagem e/ou ataque de insetos, dentre outros. Vale ressaltar que se utiliza apenas uma amostra de sementes de cada lote, de modo a caracterizá-lo em termos de poder germinativo. As sementes submetidas ao teste de tetrazólio são descartadas posteriormente.

Oliveira et al. (2014) apresentam uma alternativa para o teste de tetrazólio, específico para sementes de araucária, que tem proporcionado bons resultados. De maneira resumida, as sementes são embebidas em água durante 18 horas, visando ativar o metabolismo, realizando-se na sequência a remoção dos tegumentos e do tecido nutritivo (megagametófito) com auxílio de estilete, restando apenas os embriões que são imersos em solução de tetrazólio (0,5% ou 0,1% de concentração) sob temperatura de 25 °C e mantidos no escuro durante 1 hora. Após este período, os embriões são classificados em viáveis ou inviáveis, com base na coloração, aparência dos tecidos, extensão dos danos e posição das colorações em relação às áreas essenciais de crescimento. Maiores detalhes sobre os critérios de classificação e fotos ilustrativas dos embriões ao final do teste de tetrazólio são encontrados no artigo científico original. De modo similar, Silva et al. (2016) apresentam critérios ajustados para a condução do teste de tetrazólio com sementes de araucária, incluindo fotos ilustrativas.

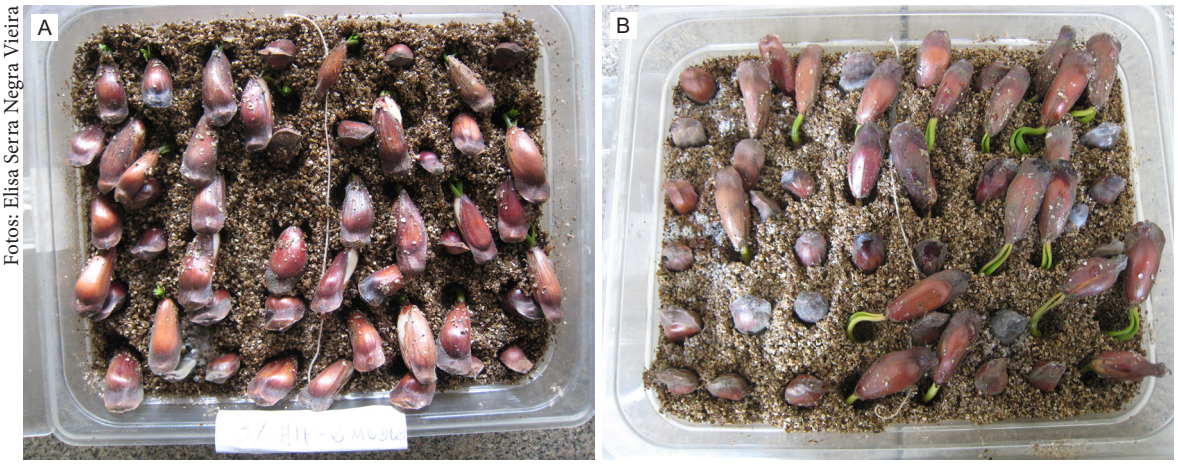
Método para avaliar a taxa de germinação de sementes

A determinação da taxa de germinação de um lote de sementes é fundamental para o planejamento da semeadura, de modo a reduzir falhas na formação de mudas e, consequentemente, os gastos com insumos e mão de obra.

Há métodos práticos que podem ser realizados no próprio viveiro, sem controles específicos de substrato, temperatura e umidade. Porém, os resultados, por serem influenciados pelas condições ambientais locais, não são reprodutíveis e eficazes para comparar, com maior assertividade, lotes distintos de sementes. Assim, métodos de análise de germinação realizados em laboratório, sob condições controladas, têm sido desenvolvidos com a finalidade de padronizar os procedimentos e permitir uma germinação mais uniforme, rápida e completa das sementes, sendo específicos para cada espécie. Deste modo, é possível comparar os resultados obtidos por diferentes trabalhos, além de aumentar a eficácia da produção de mudas pelo viveirista.

O método oficial para avaliar a germinação de sementes é baseado nas RAS (Brasil, 2009b), sendo empregado principalmente por produtores de sementes certificadas e em estudos científicos. A seguir são apresentadas as principais etapas deste teste laboratorial para sementes de araucária (adaptado de Oliveira et al., 2014):

- **Sementes**: são utilizados quatro conjuntos ou repetições de 25 ou 50 sementes para cada lote a ser avaliado.
- **Recipiente e substrato para semeadura**: bandejas plásticas contendo areia autoclavada sob temperatura de 120 °C, por 20 minutos, que deve ser posteriormente umedecida com água destilada até atingir a retenção de umidade correspondente a 60% da capacidade de campo.
- **Semeadura**: as sementes são inseridas no substrato de forma inclinada e com a porção mais fina voltada para baixo (Figura 13). Deve ser utilizado um espaçamento uniforme entre as sementes e suficiente para minimizar a contaminação (por patógenos) e a competição entre as plântulas em desenvolvimento. Um espaçamento entre as sementes de 1,5 a 2,0 vezes o seu comprimento é o ideal.



Fotos: Elisa Serra Negra Vieira

Figura 13. Sementes de *Araucaria angustifolia* inseridas inclinadamente no substrato de areia, com a porção mais fina voltada para baixo (A), para posterior processo de germinação (B) e avaliação da taxa germinativa.

- **Incubação**: as bandejas contendo as sementes são acondicionadas em câmara germinadora do tipo BOD (*biochemical oxygen demand*) ajustada para temperatura de 25 °C e sob luz constante. O período total de incubação é de 35 dias.
- **Avaliação da germinação**: após a incubação, é realizada a contagem somente das plântulas normais, cuja soma é usada no cálculo da percentagem de germinação, em relação ao total de sementes. Finalmente, o resultado final será a média das quatro repetições.

Plântulas normais são aquelas que possuem sistema radicular bem desenvolvido, além de hipocótilo, epicótilo e folhas primordiais (eófilos) saudáveis (Figuras 14A e 14B), que mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais. Por outro lado, plântulas anormais (Figura 14C) são aquelas caracterizadas

pela ausência ou deformação de uma ou mais estruturas essenciais (como raiz e parte aérea) ou que apresentam desenvolvimento fraco ou distúrbios fisiológicos que comprometam seu desenvolvimento normal (Brasil, 2009b).

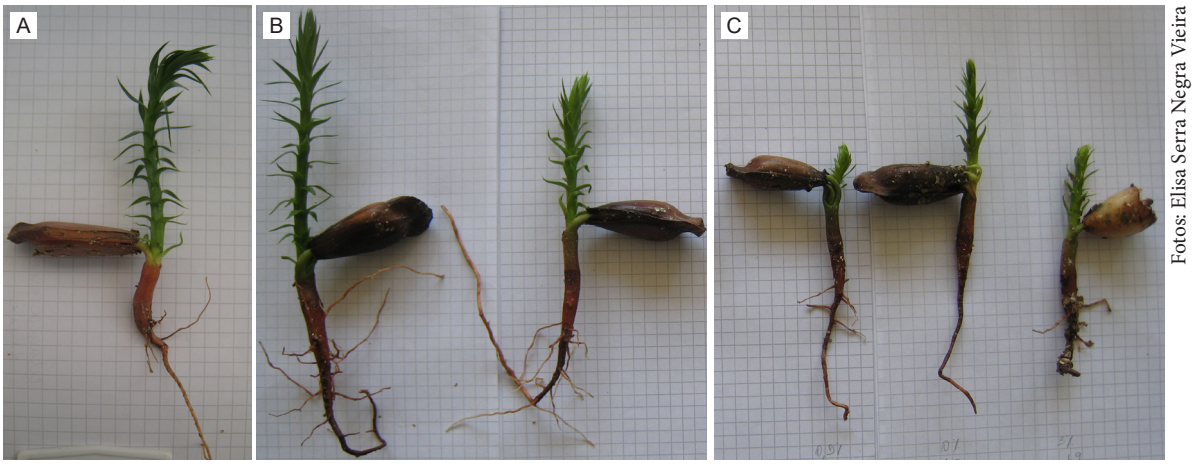


Figura 14. Exemplo de classificação, após a germinação, de plântulas normais (A, B) e anormais (C) de *Araucaria angustifolia*.

Método de extração e isolamento de DNA de embriões para análises genéticas

A genotipagem de sementes de araucária por meio de marcadores moleculares possibilita estimar parâmetros genéticos, principalmente aqueles relacionados ao sistema reprodutivo, além de outros atributos biológicos de interesse para estudos de populações naturais de araucária (Stefenon et al., 2008). Vários trabalhos relacionados ao tema foram publicados nos últimos anos, com o objetivo de nortear a amostragem de sementes em populações naturais para uso em programas de conservação genética da espécie (Sousa et al., 2021). Por exemplo, a diversidade genética, a taxa de endogamia, a estrutura genética espacial e a dispersão de pólen de duas populações naturais de araucária da região Sul do Brasil foram estimadas com a finalidade de estabelecer estratégias de conservação da espécie (Medina-Macedo et al., 2015).

A extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) é realizada geralmente no embrião que compõe a semente, por conter as informações genéticas dos dois genitores. No entanto, o endosperma da semente contém somente as informações genéticas do genitor feminino, sendo utilizado apenas quando se necessita saber o genótipo da planta mãe e não se tem tecidos foliares ou cambial. O material genético purificado é utilizado, posteriormente, para o sequenciamento de nucleotídeos de DNA por duas técnicas principais: i) marcadores microssatélites [*simple sequence repeats* (SSRs)]; e ii) marcadores baseados no polimorfismo de um único nucleotídeo [*single nucleotide polymorphism* (SNP)], como comentado no capítulo 3.

A etapa-chave para a genotipagem de sementes de araucária é o isolamento e a purificação de DNA, em quantidade e qualidade adequadas, precisando estar íntegro, livre de impurezas e ser passível de amplificação pelas técnicas de sequenciamento (Mazza; Bittencourt, 2000).

Em síntese, o método de extração de DNA dos embriões de sementes de araucária, utilizado na Embrapa Florestas, possui as seguintes etapas:

– **Retirada dos embriões das sementes**: cada semente é alojada sobre uma depressão feita em uma plataforma de madeira, seguida de corte com uma guilhotina acoplada nesta estrutura (Figuras 15A e 15B), que foi desenvolvida na Embrapa Florestas, pelo pesquisador Jarbas Yukio Shimizu.

Fotos: Marianne Bernardes

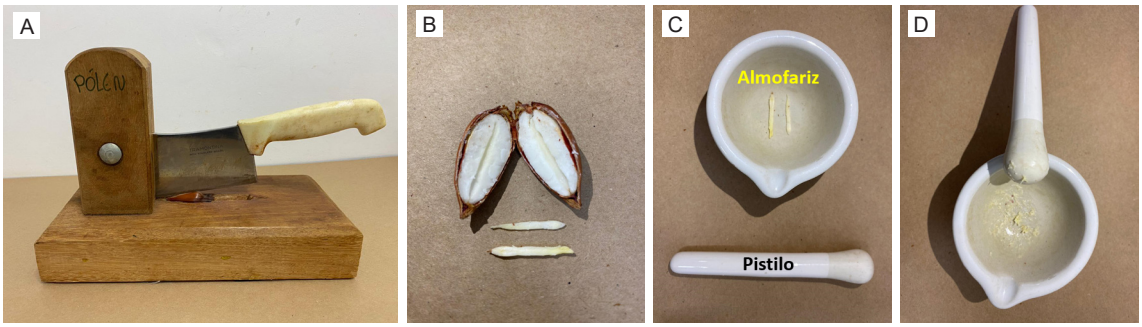


Figura 15. Corte de semente de *Araucaria angustifolia* em guilhotina (A) para a retirada do embrião (B) e sua maceração em almofariz (C, D), visando a posterior extração de DNA.

- **Maceração dos tecidos embrionários**: cada embrião é colocado em um almofariz (gral) previamente resfriado sob temperatura aproximada de -18 °C, seguido de maceração com o pistilo (Figuras 15C e 15D). Outra opção é realizar a maceração do embrião junto com nitrogênio líquido dentro do almofariz seco. Atualmente, as amostras de embrião também podem ser maceradas no equipamento TissueLyser™ após serem resfriadas com nitrogênio líquido. Neste caso, para a ruptura das amostras podem ser usadas esferas (*beads*) de aço inoxidável ou carboneto de tungstênio com 3 a 7 mm de diâmetro (Qiagen, 2010). Deve-se notar que o tubo contendo as amostras e as esferas não deve ser resfriado, para evitar rachaduras em sua estrutura.
- **Isolamento e purificação de DNA dos embriões**: são realizados segundo o método de Doyle e Doyle (1987) ou, ainda, usando kits específicos de extração de DNA de plantas (e.g., Kit de Plantas DNasy 96 – Qiagen; Figura 16).
- **Armazenamento do DNA isolado**: é realizado em câmara fria sob temperatura de -20 °C, até o momento da genotipagem de DNA a partir das técnicas de SSR ou SNP.

Foto: Valderês Aparecida de Sousa

Figura 16. Isolamento de DNA de embriões de *Araucaria angustifólia* usando Kit de Plantas DNasy 96 – Qiagen.

Considerações finais

A coleta de sementes de araucária com fins de conservação genética requer conhecimentos específicos sobre genética de populações, estratégias de amostragem, fenologia de desenvolvimento e amadurecimento das sementes, método de escalada em árvores, procedimentos de beneficiamento e armazenamento de sementes, legislação sobre sementes de espécies florestais nativas, dentre outros. Portanto, envolve uma equipe multidisciplinar para o êxito da atividade.

A obtenção de sementes de araucária com alto valor, em termos de variabilidade genética e qualidade fisiológica, é uma condição essencial para a formação de mudas destinadas a programas de conservação genética e restauração de áreas de UC, RL e APP. Portanto, esta atividade constitui um processo-chave que deve ser desenvolvido baseado em métodos bem estabelecidos cientificamente e, preferencialmente, de fácil execução em nível de campo e laboratório.

O treinamento permanente de equipes técnicas, capazes de desempenhar adequadamente as diversas etapas de coleta, beneficiamento e armazenamento de sementes de araucária, é fundamental para a continuidade de programas de conservação genética da espécie, que têm sido desenvolvidos por instituições de pesquisa, órgãos ambientais, universidades, comunidades rurais, organizações da sociedade civil, dentre outras.

Investimentos em recursos humanos e infraestrutura para a realização dos trabalhos de campo e laboratoriais são requeridos continuamente, de forma a garantir a manutenção dos projetos e programas de pesquisa em andamento, assim como a ampliação da rede de pesquisa para conservação da araucária em nível nacional.

Referências

AMARANTE, C. V. T. do; MOTA, C. S.; MEGGUER, C. A.; IDE, G. M. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 346-351, 2007. DOI: https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000200008.

BATTILANI, J. L.; SOUZA, A. L. T. de; PEREIRA, S. R.; KALIFE, C.; SOUZA, P. R. de; JELLER, H. **Produção de sementes de espécies florestais nativas**. Campo Grande: Ed. da UFMS, 2006. 43 p.

BENTO, M. de C.; MELO, B. K. O. de; ROCHA, A. A. da; CAMPOS, C. A. **Manual de boas práticas**: técnicas de produção e análise de sementes florestais. Rio Branco: Edufac, 2018. 96 p. Disponível em: http://www2.ufac.br/editora/livros/LivroSementes18122019.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

BIANCHETTI, A. **Produção de sementes florestais**. Macapá: Embrapa Amapá, 1999. 38 p. (Embrapa Amapá. Documentos, 8). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/96204/1/CPAF-AP-1999-Producao-Sementes.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TwoGener analysis. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 855-868, 2008. DOI: https://doi.org/10.1007/s10592-007-9411-2.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 17, de 26 de abril de 2017. Regulamentar a produção, a comercialização e a utilização de sementes e mudas de espécies florestais ou de interesse ambiental ou medicinal, nativas e exóticas, visando garantir sua procedência, identidade e qualidade. **Diário Oficial da União**: seção 1, n. 81, p. 6-14, 28 abr. 2017. Disponível em: https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=28/04/2017&jornal=1&pagina=6&totalArquivos=208. Acesso em: 23 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, DF, 2009a. 200 p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes. Acesso em: 23 ago. 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014. Reconhecer como espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da "Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção". **Diário Oficial da União**: seção 1, n. 245, p. 110-121, 18 dez. 2017. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/MMA/PT0443-171214.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009b. 399 p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

CAÇOLA, A. V.; AMARANTE, C. V. T. do; FLEIG, F. D.; MOTA, C. S. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 391-398, 2006. DOI: https://doi.org/10.5902/198050981920.

COSTA, M. L. M. N. da; BAJGIELMAN, T. (coord.). **Estratégia nacional para a conservação *ex situ* de espécies ameaçadas da flora brasileira**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Conservação da Flora; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016. 24 p. Disponível em: https://dspace.jbrj.gov.br/jspui/handle/doc/66. Acesso em: 23 ago. 2023.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

EIRA, M. T. S.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; CARRARA, D. K.; MELLO, C. M. C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze – Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

FOWLER, J. A. P. Armazenamento das sementes de pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Ktze.). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 4., 2018, Ribeirão Preto. **Anais** [...]. Brasília, DF: Embrapa; Colombo: Embrapa Florestas, 2018. p. 201-224. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/178902/1/2018-AAC-J.Fowler-EBS-Armazenamento.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A.; ZANON, A. **Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens**. Colombo: Embrapa Florestas, 1998. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 34). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/16620/1/com_tec34.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

GANEM, R. S. (org.). **Conservação da biodiversidade**: legislação e políticas públicas. Brasília, DF: Câmara dos Deputados, 2011. 437 p. Disponível em: https://livraria.camara.leg.br/conservacao-da-biodiversidade-legislacao-e-politicas-publicas. Acesso em: 23 ago. 2023.

GARCIA, C.; COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M.; OLIVEIRA, L. M. de. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014. DOI: https://doi.org/10.5902/1980509816586.

GARCIA, J. R.; PARRON, L. M. Avaliação de serviços ecossistêmicos em florestas com Araucária. In: SOUSA, V. A. de; FRITSONS, E.; PINTO JÚNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária**: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021, p. 289-306. Disponível em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1137523. Acesso em: 23 ago. 2023.

GOETEN, D.; ROGGE-RENNER, G. D.; SCHMIDT, É. C.; BOUZON, Z. L.; FARIAS-SOARES, F. L.; GUERRA, M. P.; STEINER, N. Updating embryonic ontogenesis in *Araucaria angustifolia*: from Burlingame (1915) to the present. **Protoplasma**, v. 257, p. 931-948, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s00709-020-01481-5.

HENNIPMAN, H. S.; SANTOS, A. F. dos; VIEIRA, E. S. N.; AUER, C. G. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de araucária durante armazenamento. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 2, p. 643-654, 2017. DOI: https://doi.org/10.5902/1980509827749.

JANKAUSKIS, J. Ensaio sobre a influência da imersão na seleção e germinação de *Araucaria angustifolia*. **Revista Floresta**, v. 2, n. 3, p. 53-57, 1970. Disponível em: https://revistas.ufpr.br/floresta/article/download/5689/4131. Acesso em: 14 dez. 2023.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; VENCOVSKY, R. Conservação in situ de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (ed.). **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 149-158.

LEÃO, N. V. M.; FREITAS, A. D. D. de; FELIPE, S. H. S. **Coleta de sementes de espécies florestais**: a história do Seu Valdir das sementes: uma experiência de manejo de produtos florestais não madeireiros. Brasília, DF: Embrapa, 2015a. 39 p. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/120945/1/Cartilha-sementes.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

LEÃO, N. V. M.; OHASHI, S. T.; FREITAS, A. D. D. de; NASCIMENTO, M. R. S. M. do; SHIMIZU, E. S. C.; REIS, A. R. S.; GALVÃO FILHO, A. F.; SOUZA, D. de. **Colheita de sementes e produção de mudas de espécies nativas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2015b. 47 p.

(Embrapa Amazônia Oriental, Documentos, 374). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/124762/1/DOC-374-2Ed-ONLINE.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1. 368 p.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. dos. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000400017.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. dos. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 5, p. 466-472, 2006. DOI: https://doi.org/10.1093/jhered/esl031.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 41, p. 12-17, 2000. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/3015/1/mazza.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

MEDEIROS, A. C. de S.; CHODOR, J.; BULGACOV, A. **Coleta de sementes em árvores altas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. (Embrapa Florestas, Documentos, 145). Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/313877/1/Doc145.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

MEDINA-MACEDO, L.; SEBBENN, A. M.; LACERDA, A. E. B.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M. High levels of genetic diversity through pollen flow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscape level study in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, artigo 814, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/s11295-014-0814-1.

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; SILVA, F. A. L. S. da; BITTENCOURT, R.; SILVA, J. Z. da; MONTOVANI, A.; REIS, M. S. dos. A importância das Unidades de Conservação na manutenção da diversidade genética de araucária (*Araucaria angustifolia*) no Estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 17-24, 2012. DOI: https://doi.org/10.37002/biobrasil.v%25vi%25i.270.

NIKLAS, K. J. The aerodynamics of wind pollination. **The Botanical Review**, v. 51, p. 328-386, 1985. DOI: https://doi.org/10.1007/BF02861079.

NUNES, A. C. P.; RESENDE, M. D. V. de; SANTOS, G. A. dos; FREITAS, A. F. Conservação genética de espécies florestais nativas: número de progênies e indivíduos a conservar para garantir a perpetuação da espécie no ambiente. **Boletim Técnico SIF**, v. 1, n. 5, p. 1-6, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.53661/2763-686020210000005.

OLIVEIRA, L. M. de; GOMES, J. P.; SOUZA, G. K.; NICOLETTI, M. F.; LIZ, T. O. de; PIKART, T. G. Metodologia alternativa para o Teste de Tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 468-474, 2014. DOI: https://doi.org/10.1590/2179-8087.064413.

PAIVA, J. R.; VALOIS, A. C. C. Espécies selvagens e sua utilização no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (ed.). **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 79-100.

QIAGEN. **TissueLyser handbook**: For high-throughput disruption of biological samples. 2nd. ed. Venlo, 2010. 40 p. Disponível em: https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=65e7826c-4d50-4faf-8154-2fbc782c41a6&lang=em. Acesso em: 15 dez. 2023.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, n. 2, p. 115-132, 2002. Disponível em: https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutoflorestal/publicacoes-if/revista-do-if/sumario_v14_2/. Acesso em: 23 ago. 2023.

SILVA, B. A. da; NOGUEIRA, J. L.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Critérios para condução do teste de tetrazólio em sementes de araucária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 61-68, 2016. DOI: https://doi. org/10.1590/S0100-204X2016000100008.

SOUSA, V. A. de; AGUIAR, A. V. de; PINTO JÚNIOR, J. E.; SHIMIZU, J. Y.; STEINER, N. Melhoramento e conservação genética de *Araucaria angustifolia*. In: SOUSA, V. A. de; FRITSONS, E.; PINTO JÚNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária**: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021, p. 161-212. Disponível em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1137523. Acesso em: 23 ago. 2023.

SOUSA, V. A. de; HATTEMER, H. H. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* no Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 47, p. 19-32, 2003. Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/34882/1/pag-19-32.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. The role of gene flow in shaping genetic structures of the subtropical conifer species *Araucaria angustifolia*. **Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 356-364, 2008. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00048.x.

STEINER, N.; HILL, L.; DORR, E.; WALTERS, C. Development of cryobiotechnologies to preserve zygotic embryo tissue of North American tree species. **Cryobiology**, v. 97, p. 281-282, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/journal/cryobiology/vol/97/suppl/C?page=2. Acesso em: 23 ago. 2023.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Biology**, v. 105, n. 3, p. 581-586, 1984. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1984.tb03085.x.

WENDLING, I.; STUEPP, C. A.; ZANETTE, F. Produção de mudas de araucária por semente. In: WENDLING, I.; ZANETTE, F. (ed.). **Araucária**: particularidades, propagação e manejo de plantios. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 41-62. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/160893/1/Araucaria-Capitulo-2.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

Capítulo 2

Método de coleta de pólen de *Araucaria angustifolia* para uso em programas de melhoramento e conservação genética

Valderês Aparecida de Sousa
Ananda Virginia de Aguiar
Sérgio Ricardo Silva

Introdução

A araucária [*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze], popularmente conhecida por pinheiro-do-paraná ou pinheiro-brasileiro, é considerada o destaque da Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou Floresta com Araucárias, pertencente ao bioma Mata Atlântica, particularmente na região Sul do Brasil e nas áreas de altitude elevada da região Sudeste. Seu formato exuberante na forma de cálice, predominante no estrato superior do dossel da floresta, a destaca das outras espécies, resultando em beleza cênica singular que é imediatamente assimilada na memória dos observadores (Figura 1).

Fotos : André Kasczeszen

Figura 1. Árvore (A) e população natural (B) de *Araucaria angustifolia* localizadas em áreas de Floresta Ombrófila Mista, em Castro, PR.

As áreas brasileiras de florestas naturais com presença de araucária compreendiam, originalmente, cerca de 73,8 mil km² no Paraná, 56,7 mil km² em Santa Catarina, 46,8 mil km² no Rio Grande do Sul e 7,7 mil km² em fragmentos na região Sudeste, totalizando 185 mil km² (Machado; Siqueira, 1980). No entanto, devido ao seu elevado valor econômico, proporcionado pelo formato cilíndrico do tronco e qualidade da madeira, a araucária nativa foi intensamente explorada nos séculos XIX e XX, principalmente para exportação de toras e processamento de madeira em serrarias, servindo de matéria-prima para construção civil, indústria moveleira e mesmo como fonte de energia. Como resultado, sua população natural foi reduzida, aproximadamente, a 3% daquela original (Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul, 2005), sendo considerada extinta no Espírito Santo (Simonelli; Fraga, 2007). Deste modo, a espécie foi incluída na Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2014).

Originalmente, a FOM ocupava uma área estimada entre 18,5 e 25,4 milhões de hectares (Machado; Siqueira, 1980; Atlas..., 2015). No entanto, atualmente há um remanescente próximo de 3,2 milhões de hectares de áreas com FOM (em diversos estágios de conservação), dos quais apenas 3,1% estão sob regime de proteção (Ribeiro et al., 2009). Além disso, alguns cenários de mudança climática direcionam para um segundo período (i.e., século XXI) de significativa redução dos indivíduos da espécie, ao ponto de restarem até 2070 apenas 3,5% das atuais populações naturais remanescentes, que encontrarão microrrefúgios em regiões mais frias, de acordo com modelos preditivos de resposta da araucária às alterações do clima no Brasil (Wilson et al., 2019). Adicionalmente, Wrege et al. (2017) estimaram uma grande redução da área de distribuição natural da araucária até 2100 e, também, um possível deslocamento das zonas de araucária para regiões de maiores altitudes e latitudes, onde permanecerão as menores temperaturas.

Ações para a preservação e/ou recuperação de ecossistemas com araucária ganharam força nas últimas décadas para reverter a situação crítica de sobrevivência da espécie. Assim, a identificação e o mapeamento de fragmentos naturais da FOM têm sido realizados por diversas equipes de pesquisadores, ambientalistas e ecologistas de insti-

tuições públicas e privadas (Medeiros et al., 2004; Wrege et al., 2017). Árvores de araucária presentes em formações fitogeográficas distintas servem como populações (*pool* gênico) de grande utilidade, particularmente para a coleta de material genético (sementes e pólen) a ser utilizado em programas de conservação e melhoramento genético.

A presença de variabilidade genética nas sementes de araucária é essencial para a produção de mudas destinadas aos programas de recuperação de áreas desflorestadas, principalmente quando o objetivo é a reconstituição de populações naturais com alta variabilidade genética, visando garantir a perpetuação da espécie. Além disso, constitui-se em um pré-requisito nos programas de melhoramento genético, cujo fundamento é justamente a disponibilidade de progenitores detentores de ampla variabilidade de genes, particularmente daqueles vinculados à resistência a pragas e doenças e à produção de madeira e pinhão. Neste sentido, durante o processo de polinização (livre ou controlada) é fundamental o balanço sexual entre gametas masculinos e femininos, de modo que gerem descendentes geneticamente diversos (Sousa et al., 2021).

Em programas de melhoramento genético de espécies alógamas (i.e., com reprodução cruzada), como aquelas do gênero *Eucalyptus*, a coleta, o beneficiamento e o armazenamento de pólen são práticas bem consistentes e rotineiras, particularmente quando ocorre assincronia fenológica entre os progenitores-alvo, ou seja, épocas distintas de liberação de pólen e de receptividade das flores femininas, para ocorrência da polinização. No caso da araucária, embora híbridos intervarietais e híbridos interespecíficos sejam parte da estratégia de programas de melhoramento genético (Sousa; Aguiar, 2012) e, inclusive, já tenham sido gerados no Brasil e na Argentina (Tesdorff, 1956; Christian, 2018), esses procedimentos ainda estão sendo desenvolvidos e aprimorados.

O objetivo deste capítulo é apresentar, detalhadamente, as principais etapas, técnicas e procedimentos para a coleta, manuseio, beneficiamento e armazenamento do pólen de araucária, adotados em programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

Fenologia reprodutiva da araucária

A araucária é uma espécie dioica, apresentando estróbilos masculinos (androestróbilos ou microestróbilos) (Figuras 2A e 2B) e femininos (ginoestróbilos ou megaestróbilos) (Figuras 2C, 2D e 2E), cujas estruturas reprodutivas estão presentes em árvores distintas, com algumas exceções, como no caso de árvores monoicas que ocorrem em baixíssima proporção em populações naturais (Stefenon; Caprestano, 2009; Carmo et al., 2021).

Os estróbilos masculinos produzem esporos (i.e., pólen) em seus esporângios, que estão localizados no interior de esporangióforos (Figura 3). Os estróbilos femininos, com aproximadamente 3 a 4 cm de diâmetro (Figura 2E), estão em estádio adequado de receptividade do pólen, ou seja, para a ocorrência de polinização, que geralmente ocorre de outubro a novembro na região Sul (Anselmini; Zanette, 2012; Kuhn; Mariath, 2014). No entanto, a fertilização (i.e., a união dos gametas masculino e feminino) ocorre somente de 13 a 14 meses após a polinização, sendo que, durante este período, o pólen fica em estado de dormência no interior da micrópila do ginoestróbilo (Goeten et al., 2020). Segundo esses autores, os estádios de embriogênese ocorrem entre 15 e 23 meses após a polinização; portanto, as sementes atingem a maturação fisiológica aproximadamente dois anos após a polinização. Os estádios desde a polinização até a formação da pinha madura estão ilustrados nas Figuras 2F, 2G e 2H.

Quando amadurecem, os grãos de pólen são transportados para o exterior dos esporangióforos pela ação do vento, que viabiliza o processo de polinização. Porém, o pólen da araucária é considerado pesado e grande, com aproximadamente 60 µm de diâmetro (Figura 4), apresentando baixa taxa de flotação, o que resulta em dispersão pelo vento em curtas distâncias, geralmente menores que 600 m (Niklas, 1985; Sousa; Hattemer, 2003). Isto contribui para a formação de uma população de araucária com certo grau de endogamia (i.e., fixação de alelos) e uma estruturação genética espacial, considerando uma área territorial restrita, geralmente com diâmetro menor que 70 m (Mantovani et al., 2006; Sousa et al., 2021). Portanto, para fins de conservação e melhoramento genético, a amostragem de pólen em árvores oriundas de florestas naturais deve priorizar indivíduos distantes entre si, de modo a aumentar a variabilidade genética do material coletado.

Fotos: Valderês Aparecida de Sousa (A, F, G, H); Marianne Bernardes (B, E); Ananda Virginia de Aguiar (C, D)

Figura 2. Estróbilos de *Araucaria angustifolia*: masculinos verdes (A) e maduros (B) (sendo os últimos propícios para liberar pólen para seu posterior manuseio), e feminino verde (C, D) e apto para ser polinizado após a abertura das brácteas (E). Estádios de formação da pinha: recém-polinizada (F), com um ano após a polinização (G) e madura aos dois anos de idade (H).

Os estróbilos masculinos são emitidos anualmente, em ramos jovens recém-formados, geralmente de fevereiro a outubro, sendo que alcançam a maturação fisiológica no período de agosto a outubro na região Sul do Brasil (Sousa et al., 2021). Portanto, esta é a melhor época para a coleta de pólen, que normalmente requer várias expedições ao campo para aumentar a amplitude genética de árvores amostradas em plena liberação dos esporos.

Fotos: Marianne Bernardes

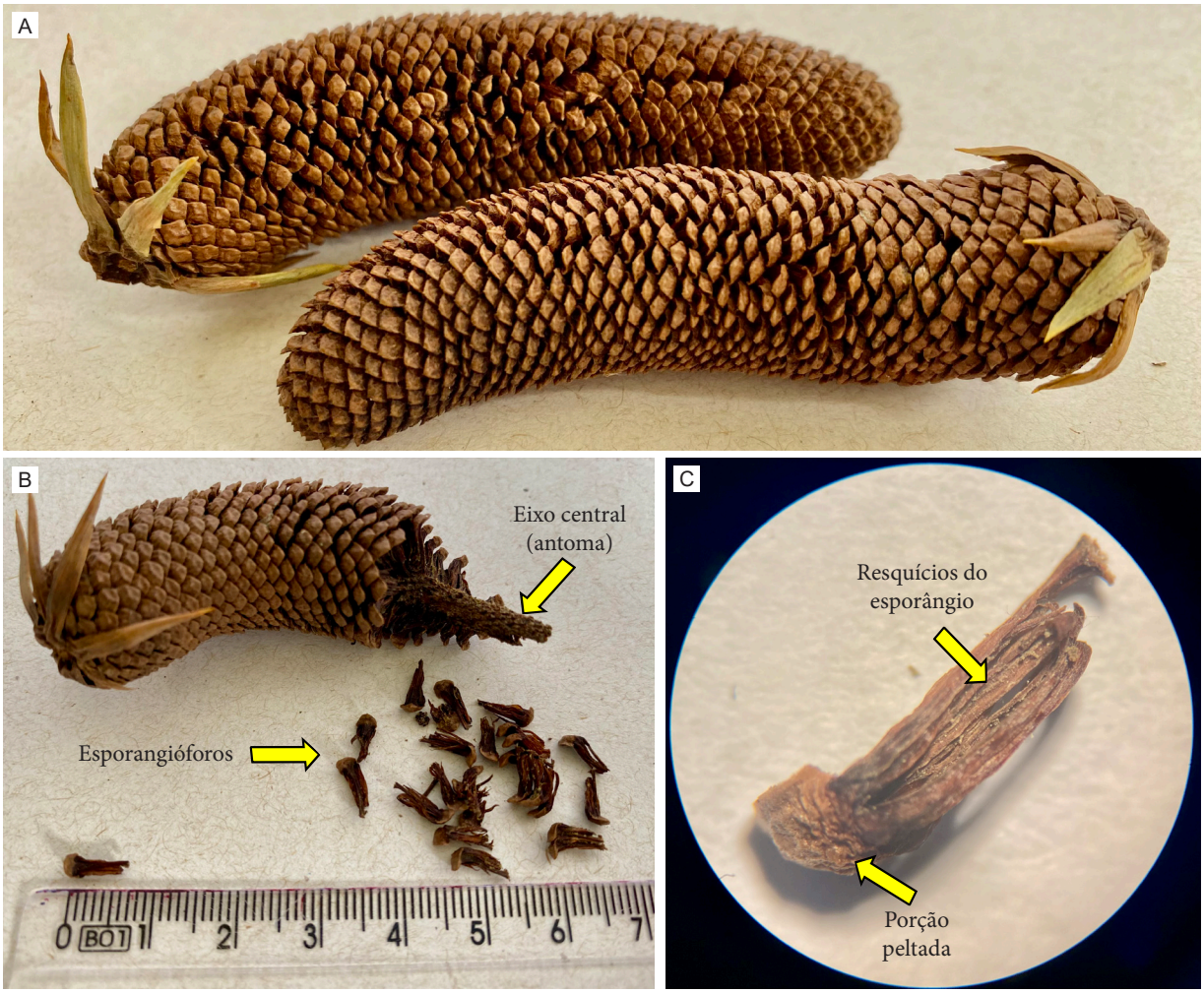


Figura 3. Estróbilos masculinos de *Araucaria angustifolia* (A) e seus componentes: eixo central (antoma ou caule antomático) e esporangióforos (B). Ampliação de um esporangióforo, mostrando a sua porção peltada e resquícios do esporângio (C).

Fotos: Marianne Bernardes

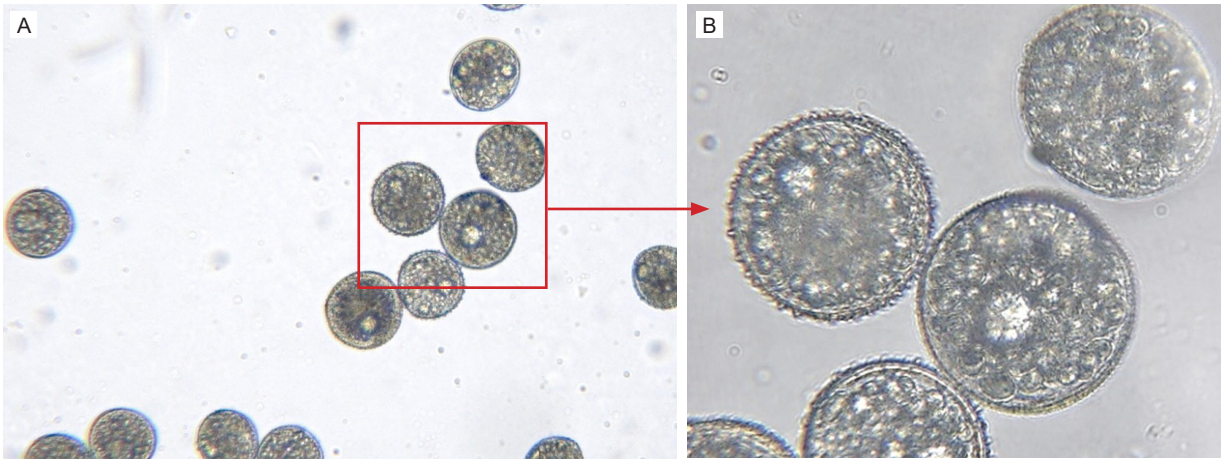


Figura 4. Imagens obtidas por microscopia, com aumentos de 100× (A) e 200× (B), mostrando a estrutura de grãos de pólen de *Araucaria angustifolia* com aproximadamente 60 µm de diâmetro.

Descrição dos métodos

Critérios para a escolha de locais e de árvores para a coleta de pólen

Quando o objetivo da coleta de pólen é a constituição ou enriquecimento de um "banco de pólen", tem-se como pressuposto o incremento da diversidade genética deste material, que será utilizado em programas de polinização controlada. Assim, no caso da "conservação genética", os locais escolhidos para a coleta de pólen devem contemplar diferentes formações fitogeográficas em florestas naturais, onde há maior possibilidade de encontrar diversidade e supostas variedades geográficas da espécie. Neste contexto, para a amostragem abranger a variabilidade genética de uma espécie florestal alógama, Nunes et al. (2021) recomendam amostrar, pelo menos, quatro populações naturais distintas. No entanto, em função da ampla área de ocorrência natural da araucária, um maior número de populações será necessário.

Por sua vez, a escolha de árvores masculinas em cada população natural deve ser realizada com base em critérios técnicos, que reduzam o grau de parentesco (endogamia) entre os indivíduos amostrados, além de proporcionar uma intensidade amostral adequada para capturar a maior variabilidade genética possível e disponível em uma dada população. De modo prático, pode-se utilizar critérios similares àqueles exemplificados para coleta de sementes no capítulo 1, ou seja: coletar pólen, no mínimo, de 25 árvores em cada população natural, priorizando um distanciamento mínimo de 100 m entre as árvores escolhidas ao acaso no interior da floresta, por meio de caminhamento em zigue-zague. É importante ressaltar que o pólen deve ser armazenado individualmente por árvore amostrada, evitando qualquer tipo de mistura ou contaminação. Isto permitirá a realização dos cruzamentos controlados desejáveis e a manutenção desses genes para uso futuro, visando o incremento da variabilidade genética.

Métodos de coleta de pólen

A liberação de pólen acontece quando os estróbilos masculinos estão maduros, cujo processo inicia-se pela abertura dos esporangióforos. O ponto de maturação do estróbilo ocorre quando este muda da cor verde para amarelada (Figuras 2A e 2B). Após a completa liberação do pólen, os estróbilos tornam-se amarronzados (Figura 3) e, portanto, não devem ser amostrados.

Têm-se duas opções para a coleta de pólen:

i) **Em campo**: esse tipo de coleta deve ser feito apenas nos casos em que não se necessita da identificação precisa do indivíduo, tal como na realização de polinização massal com mix de pólen. Sendo assim, por ocasião do início da abertura natural dos esporangióforos, utiliza-se um frasco de vidro ou plástico que é colocado no entorno do estróbilo, seguido de agitação mecânica de sua estrutura, promovendo a liberação do pólen para o interior do frasco, que é posteriormente fechado com tampa, para um armazenamento provisório antes do beneficiamento a ser realizado em laboratório.

ii) **Em laboratório**: é realizada a coleta prévia de estróbilos masculinos, individualmente para cada árvore, próximo ao seu ponto de maturação, quando ainda não ocorreu a abertura dos esporangióforos. Estes são armazenados em sacos kraft e transportados até o laboratório, onde são lavados em água deionizada e secos com papel toalha. Em seguida, os estróbilos masculinos são distribuídos dentro de caixas com fundo telado sobre papel manteiga, para a continuidade da secagem até a liberação de pólen, preferencialmente em ambiente controlado, com baixa umidade e sob temperaturas entre 20 e 25 °C. Não se deve submeter o pólen à radiação solar direta durante o processo de secagem, de modo a não comprometer a sua viabilidade. Após a liberação do pólen dos estróbilos, a bandeja deve ser agitada vigorosamente para a coleta do pólen, utilizando outro recipiente limpo disposto sob a bandeja. A seguir, o pólen é armazenado proviso-

riamente em frasco de vidro com tampa. Salienta-se que esse procedimento deve ser feito longe das demais bandejas, para evitar contaminação (i.e., mistura de pólens de diferentes árvores). Ademais, quando o procedimento for repetido para o pólen de outra árvore, as bandejas, os frascos e outros utensílios utilizados devem estar lavados e esterilizados.

Para ambos os métodos de coleta de pólen, os frascos "provisórios" devem estar completamente limpos e identificados, com etiquetas escritas com marcador permanente, de modo a evitar qualquer tipo de contaminação ou mistura de pólens. Esta identificação deve incluir o nome da espécie, a data e o local da coleta, e o código da árvore amostrada em uma população natural específica.

Métodos de beneficiamento, secagem e armazenamento definitivo do pólen

O pólen previamente coletado no campo ou extraído no laboratório é submetido a um processo de beneficiamento antes de seu armazenamento definitivo em ambiente refrigerado. O primeiro passo é a retirada de todas as impurezas, incluindo resíduos de estróbilo, por meio da passagem do pólen por um conjunto de duas peneiras, com aberturas de malha de 16 e 170 mesh (ABNT = 18 e 170, respectivamente) (Figura 5).

Fotos: Marianne Bernardes

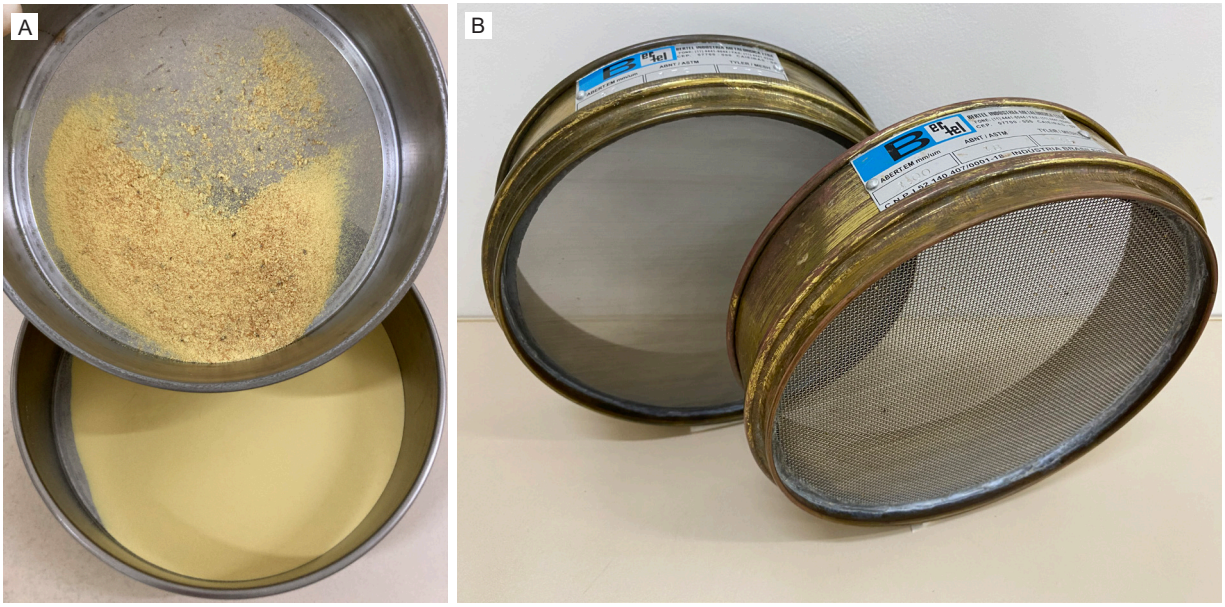


Figura 5. Peneiramento de pólen de *Araucaria angustifolia* (A), sucessivamente por duas peneiras com aberturas de malha de 16 e 170 mesh (B).

A seguir, o pólen peneirado deve ser seco. O adequado grau de desidratação do pólen é inversamente proporcional à temperatura na qual ele será posteriormente armazenado, ou seja, quanto mais frio, maior a desidratação necessária. A redução da umidade do pólen diminui sua taxa metabólica durante o armazenamento e também possíveis injúrias pelo congelamento (i.e., formação de cristais que podem perfurar as membranas celulares), além de minimizar a proliferação de microrganismos, como fungos e bactérias (Sousa et al., 2014).

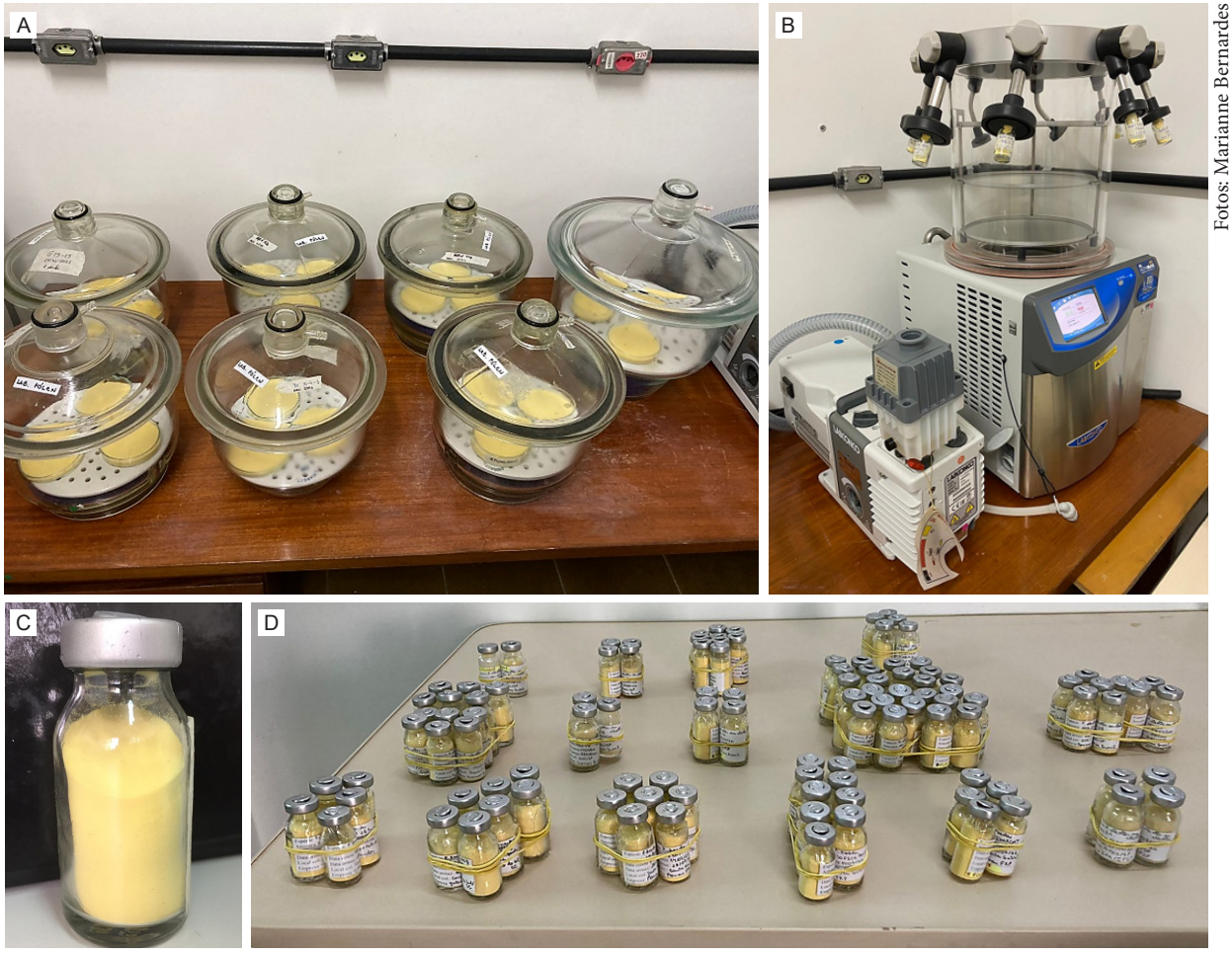
Há três métodos frequentemente utilizados para secagem de pólen de araucária (Sousa et al., 2021):

i) Depositando os fracos de pólen destampados em dessecadores com sílica-gel (Figura 6A) e sob a ação de vácuo, por um período de 24 a 48 horas (dependendo da quantidade de pólen utilizada), em temperatu-

ra ambiente. Após este período, o pólen atinge a umidade adequada para armazenamento na temperatura de -20 °C. Vale ressaltar que, à medida que se aumenta a quantidade de pólen depositada no interior do dessecador, deve-se aumentar a quantidade de sílica-gel seca (com cor azul) e substituí-la quando estiver úmida (com cor rosa). Deve-se notar que a sílica-gel umedecida pode ter sua capacidade de absorção de água recuperada, ao ser seca em estufa com circulação forçada de ar, geralmente sob temperatura entre 60 e 80 °C, por 24 horas.

ii) Utilizando uma estufa de secagem, preferencialmente com circulação forçada de ar, com temperatura controlada de 30 °C, por 24 a 48 horas. Este procedimento possibilita que o pólen atinja a umidade adequada para armazenamento, no médio prazo, na faixa de temperatura de -10 °C até -20 °C.

iii) Realizando uma redução drástica da umidade do pólen, com valor próximo de zero (recomendado para espécies com pólen ortodoxo ou não recalcitrante), por meio de um liofilizador (Figura 6B), que promove o rápido congelamento do material e retira a água por sublimação (i.e., passagem direta da água do estado sólido para o gasoso). O tempo de permanência do pólen no equipamento é definido de acordo com particularidades de cada população ou variedade geográfica da espécie, devendo ser testado previamente. Sendo assim, esse pólen pode ser preservado por criogenia (-80 °C até -196 °C).



Fotos: Marianne Bernardes

Figura 6. Equipamentos utilizados no processo de secagem de pólen de *Araucaria angustifolia* na Embrapa Florestas: dessecadores com sílica-gel (A) e liofilizador de bancada (B). Frasco hermeticamente vedado (com lacre) contendo pólen seco (C) e conjuntos de frascos prontos para o armazenamento em freezer (D).

O pólen seco é acondicionado em recipiente hermético apropriado, como ampola plástica, tubo Eppendorf, frasco de vidro de penicilina (Figuras 6C e 6D) e tubo criogênico, cuja escolha depende da temperatura de armazenamento e da quantidade de pólen a ser armazenado ou usado nas polinizações controladas.

O pólen beneficiado pode ser armazenado em freezer (-20 °C até -40 °C; Figura 7A) ou em equipamento criogênico (-80 °C até -196 °C). Porém, para a conservação da viabilidade do pólen de araucária por longo período (ainda indefinido), o método mais adequado é realizar a secagem por liofilização e, posteriormente, proceder à criopreservação em ultrafreezer (-80 °C; Figuras 7B e 7C) ou em botijão com nitrogênio líquido (-196 °C; Figuras 7D e 7E) (Sousa et al., 2021). É importante destacar que, para o uso em polinizações controladas, o pólen deve ser gradualmente descongelado, não podendo ser novamente congelado e armazenado (Sousa et al., 2014). Além disso, deve-se evitar oscilações de temperatura e manipulação frequente dos frascos armazenados sob refrigeração, de modo que o pólen mantenha a sua viabilidade.

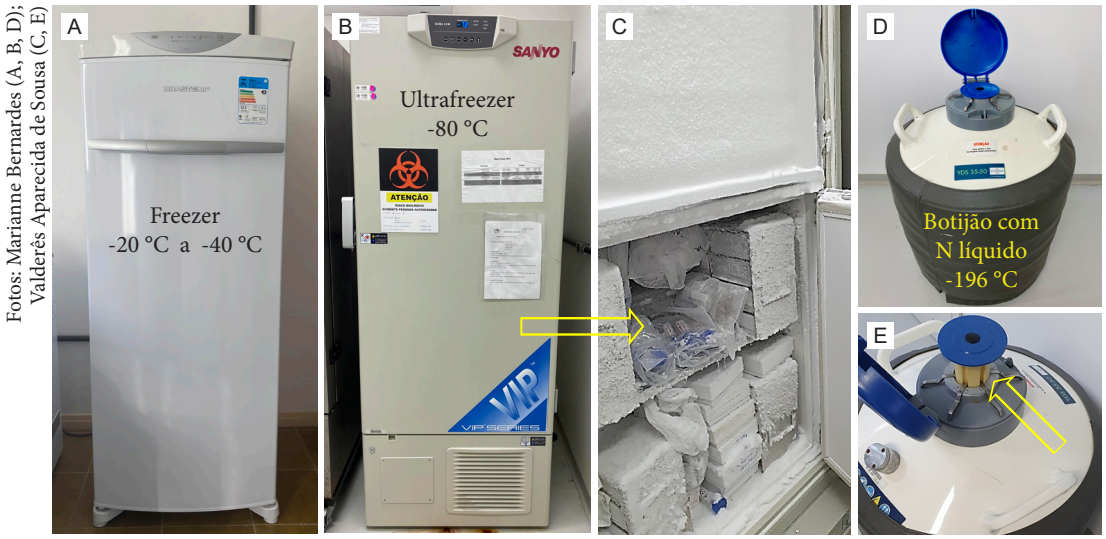


Figura 7. Equipamentos utilizados para o congelamento e/ou criopreservação de pólen de *Araucaria angustifolia* na Embrapa Florestas: freezer (A), ultrafreezer (B, C) e botijão com nitrogênio (N) líquido (D, E).

Métodos para avaliar a viabilidade germinativa de grãos de pólen

O pólen perde progressivamente a sua capacidade germinativa ao longo do tempo, cuja intensidade depende de: i) características genéticas de cada espécie e indivíduo; ii) manejo durante a coleta, transporte e beneficiamento; iii) intensidade de secagem; e iv) condições de armazenamento. Em termos práticos, são utilizados métodos laboratoriais para estimar a taxa de germinação do pólen in vitro, em meio de cultura com ágar, variando-se as concentrações de açúcares e micronutrientes, assim como o período de germinação e a temperatura (Figura 8) (Sousa et al., 2021).

No entanto, à medida que se aumenta o tempo de incubação (acima de 72 horas), corre-se o risco de perda do ensaio de germinação devido às características genéticas da espécie e ao incremento da contaminação do meio de cultura por fungos e bactérias. Para a araucária, ainda não se dispõe de um protocolo consistente para avaliar a viabilidade de pólen, uma vez que o ciclo reprodutivo da espécie é muito longo e isso se reflete na germinação dos grãos de pólen. O período máximo de incubação estudado para essa espécie foi 96 horas, em que a contaminação inviabilizou o teste. Neste contexto, ensaios com diversos corantes específicos deverão abrir novos horizontes para avaliar a viabilidade germinativa de grãos de pólen da araucária. Até o momento, os melhores resultados têm sido obtidos pelo seguinte procedimento:

- **Composição do meio de cultura (Figura 8A)**: 0,8% de ágar, 10% de sacarose, e solução de nutrientes (Brewbaker; Kwack, 1963) contendo 100 mg L^{-1} de H_3BO_3, 300 mg L^{-1} de $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 200 mg L^{-1} de $MgSO_4.7H_2O$ e 100 mg L^{-1} de KNO_3.
- **Preparo do meio cultura e das lâminas microscópicas**: o meio de cultura, ainda líquido, é distribuído com pipeta sobre lâminas microscópicas e, após a solidificação, receberão o pólen (Figura 8B). Recomenda-se utilizar um delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, para aumentar a acurácia da avaliação (Figura 8C).
- **Adição dos grãos de pólen no meio de cultura**: o pólen pode ser espalhado manualmente, em pequenas quantidades, o mais disperso possível, evitando a formação de "pólens agregados", de modo a proporcionar condições adequadas para o contato direto de todos os grãos com o meio de cultura, e também para facilitar, posteriormente, a contagem. Pode-se, ainda, usar pincéis com pelos finos para esta finalidade, mas, deve-se espalhar levemente a massa de pólen para não afundar os grãos no meio de cultura, de modo que permaneçam em um ambiente aeróbico.
- **Incubação**: as lâminas com os grãos de pólen são acondicionadas por 72 horas em uma câmara de germinação do tipo BOD (b*iochemical oxygen demand*), regulada com temperatura de 25 °C e umidade relativa do ar de 100% (Figura 8D).

Fotos: Valderês Aparecida de Sousa

Figura 8. Meios de cultura com ágar (A) para teste de germinação in vitro de grãos de pólen de *Araucaria angustifolia* (B, C), por meio de incubação em câmara do tipo BOD (D).

- **Coloração dos grãos de pólen e dos tubos polínicos**: após o período de incubação, adiciona-se safranina com concentração de 1%, pH 7, sobre as lâminas (Figura 9A), para ocasionar a interrupção do processo de germinação do pólen e melhorar a visualização de cada grão e do tubo polínico formado.
- **Avaliação da germinação dos grãos de pólen**: após o procedimento de coloração, a lâmina é avaliada em microscópico óptico com aumento de 400× (ocular = 10×; objetiva = 40×; Figuras 9B–9E), quando é realizada a contagem de 300 grãos de pólen, em campos escolhidos ao acaso, obedecendo a um deslocamento e espaçamento predefinidos na lâmina. Os grãos de pólen são classificados em "germinados" e "não germinados". Como critério de classificação, considera-se como "germinado" o grão de pólen contendo tubo polínico com comprimento superior ao diâmetro do grão.

Fotos: Marianne Bernardes

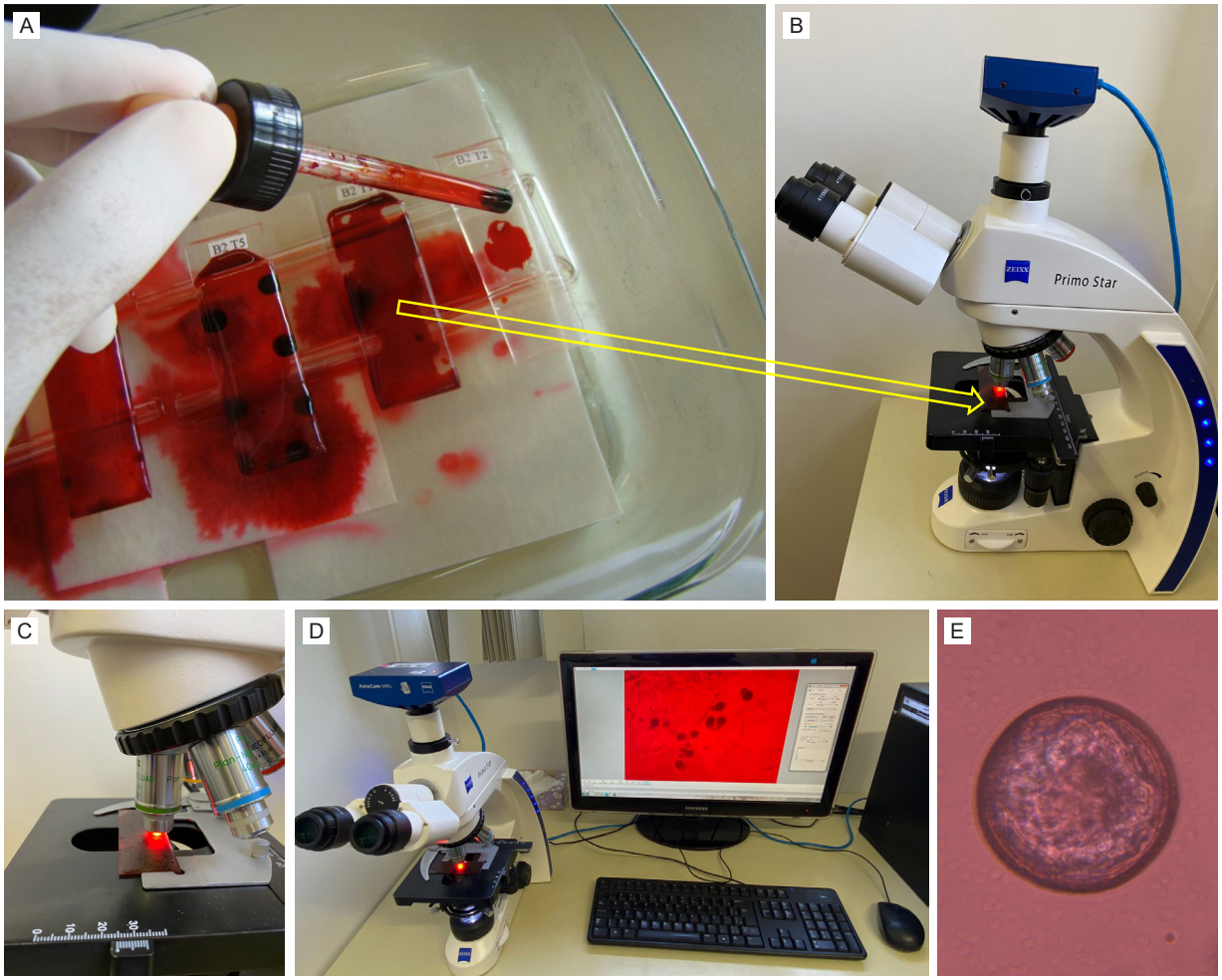


Figura 9. Processo de coloração de grãos de pólen de *Araucaria angustifolia* com safranina (A) e posterior visualização em microscópio óptico com aumento de 400× (B, C, D, E).

Considerando as dificuldades operacionais para promover a germinação de pólen in vitro, métodos utilizando corantes específicos têm sido desenvolvidos para avaliar a viabilidade de grãos de pólen de araucária, como exemplificado a seguir.

O método do tetrazólio, amplamente utilizado para avaliar a viabilidade germinativa de sementes (Brasil, 2009), tem sido adaptado para análise de viabilidade dos grãos de pólen, devido à rapidez da análise laboratorial e

facilidade de sua implementação, cujos resultados são baseados na coloração, como detalhado no capítulo 1. Outros corantes específicos (e.g., carmin acético, azul de anilina de lactofenol, azul de algodão, iodeto de potássio etc.) também têm sido testados para esta finalidade, porém, os estudos ainda estão em fase de desenvolvimento e validação (Sousa et al., 2021).

Recomenda-se que a avaliação da viabilidade do pólen seja realizada em duas etapas: i) imediatamente antes de seu armazenamento refrigerado; ii) por ocasião de seu uso nas polinizações controladas.

Análises genéticas de DNA de amostras de pólen

Em termos de conservação da araucária, é importante que haja uma participação equitativa de ambos os sexos (i.e., diversidade de gametas masculinos e femininos) na formação da geração subsequente, ou seja, a variabilidade genética dos grãos de pólen é fundamental na polinização e formação de sementes de alto valor biológico (Sousa et al., 2021). Assim, estudos genéticos, por meio do sequenciamento de nucleotídeos de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), constituem uma importante ferramenta biotecnológica para estimar a diversidade genética, o fluxo gênico, o grau de endogamia, a estrutura genética espacial e a dispersão de pólen de populações de araucária (Stefenon et al., 2008; Medina-Macedo et al., 2015).

No caso da araucária, a análise de DNA tem sido realizada para a massa de pólen proveniente de cada árvore masculina, não sendo necessária a genotipagem individual por grão de pólen, como realizado para outras espécies (Mase et al., 2014). Dentre as técnicas mais utilizadas para esta análise de DNA destacam-se os marcadores microssatélites [*simple sequence repeats* (SSRs)] e aqueles baseados no polimorfismo de um único nucleotídeo [*single nucleotide polymorphism* (SNP)], como descrito no capítulo 3.

No entanto, em termos práticos, a contribuição genética do progenitor masculino (grão de pólen) na semente pode ser obtida por meio da diferença do DNA do genótipo materno (i.e., endosperma da semente, que é haploide) e o DNA do embrião resultante (que é diploide). Portanto, a análise de DNA de pólen é desnecessária para as finalidades mencionadas anteriormente.

Considerações finais

Técnicas e procedimentos adequados para a coleta, manuseio, beneficiamento e armazenamento do pólen de populações naturais ou plantadas de araucária são importantes fatores para o sucesso da conservação genética e continuidade da espécie. A conservação do *pool* gênico (i.e., conjunto de pólens) das árvores masculinas poderá contribuir para a formação de coleções ativas de germoplasma e, também, para a realização de polinizações controladas para atender objetivos específicos de programas de conservação e melhoramento genético, como a obtenção de materiais mais produtivos e resistentes a pragas, doenças e mudanças climáticas. As mudas seminais advindas dessas polinizações poderão ser destinadas aos programas de restauração florestal, enriquecimento de fragmentos da FOM, além de usos diversos para fins comerciais.

Os métodos utilizados para coleta, beneficiamento, armazenamento e avaliação da viabilidade do pólen de araucária avançaram muito nos últimos anos, resultando em procedimentos com significativo grau de assertividade. Algumas melhorias estão sendo implementadas com o objetivo de aumentar a precisão e o rendimento operacional de cada etapa, de modo que as técnicas possam ser amplamente utilizadas por interessados na conservação e/ou no melhoramento genético da espécie.

Estudos sobre a fenologia reprodutiva da araucária necessitam ser ampliados para diferentes formações fitogeográficas em florestas naturais da FOM no território brasileiro, de modo a gerar informações sobre as épocas de produção e maturação de pólen, o que será um facilitador para orientar as expedições de campo destinadas à coleta de pólen em diferentes ambientes e condições climáticas.

Referências

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Polinização controlada em *Araucaria angustifolia*. **Cerne**, v. 18, n. 2, p. 247-255, 2012. DOI: https://doi.org/10.1590/S0104-77602012000200009.

ATLAS dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período 2013-2014: relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2015. 60 p.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. **Cultivo da *Araucaria angustifolia***: análise de viabilidade econômico-financeira e alternativas de incentivo. Florianópolis: BRDE; Gerência de Planejamento, 2005. 53 p. Disponível em: http://www.brde.com.br/media/brde.com.br/doc/estudos_e_pub/IS%202005-01Cultivo%20da%20araucaria%20SC.pdf. Acesso em: 22 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009. 399 p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014. Reconhecer como espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da "Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção". **Diário Oficial da União:** s. 1, n. 245, p.110-121, 18 dez. 2014. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/MMA/PT0443-171214.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963. DOI: https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1963.tb06564.x.

CARMO, A. A. O. do; GODOY, R. C. B. de; SOUZA, L. A. de. Morfologia dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze (Araucariaceae). In: SOUSA, V. A. de; FRITSONS, E.; PINTO JÚNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária**: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021. p. 35-45. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229152/1/EmbrapaFlorestas-2021-LV-AraucariaEmbrapa-cap2.pdf. Acesso em: 22 ago. 2023.

CHRISTIAN, T. ***Araucaria angustifolia* × *araucana***. Kington: International Dendrology Society, Trees and Shrubs Online, 2018. Disponível em: https://www.treesandshrubsonline.org/articles/araucaria/araucaria-angustifolia-x-araucana. Acesso em: 13 dez. 2023.

GOETEN, D.; ROGGE-RENNER, G. D.; SCHMIDT, É. C.; BOUZON, Z. L.; FARIAS-SOARES, F. L. Updating embryonic ontogenesis in *Araucaria angustifolia*: from Burlingame (1915) to the present. **Protoplasma**, v. 257, p. 931-948, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s00709-020-01481-5.

KUHN, S. A.; MARIATH, J. E. de A. Reproductive biology of the "Brazilian pine" (*Araucaria angustifolia* – Araucariaceae): Development of microspores and microgametophytes. **Flora**, v. 209, n. 5-6, p. 290-298, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.02.009.

MACHADO, S. do A.; SIQUEIRA, J. D. P. Distribuição natural da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus *Araucaria***. Curitiba: FUPEF, 1980. p. 4-9.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. dos. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 5, p. 466-472, 2006. DOI: https://doi.org/10.1093/jhered/esl031.

MASE, N.; SAWAMURA, Y.; YAMAMOTO, T.; TAKADA, N.; NISHIO, S.; SAITO, T.; IKETANI, H. Direct genotyping of single pollen grains of a self-compatible mutant of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) revealed inheritance of a duplicated chromosomal segment containing a second S-haplotype. **Euphytica**, v. 200, p. 297-304, 2014. DOI: https://doi.org/10.1007/s10681-014-1168-3.

MEDEIROS, J. de D.; GONÇALVES, M. A.; PROCHNOW, M. A.; SCHÄFFER, W. B. **Florestas com Araucárias**: um símbolo da Mata Atlântica a ser salvo da extinção. Rio do Sul: APREMAVI, 2004. 82 p. Disponível em: https://apremavi.org.br/wp-content/uploads/2019/10/Livro_Floresta-com-Araucaria.pdf. Acesso em: 13 dez. 2023.

MEDINA-MACEDO, L.; SEBBENN, A. M.; LACERDA, A. E. B.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M. High levels of genetic diversity through pollen flow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscape level study in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, artigo 814, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/s11295-014-0814-1.

NIKLAS, K. J. The aerodynamics of wind pollination. **The Botanical Review**, v. 51, p. 328-386, 1985. DOI: https://doi.org/10.1007/BF02861079.

NUNES, A. C. P.; RESENDE, M. D. V. de; SANTOS, G. A. dos; FREITAS, A. F. Conservação genética de espécies florestais nativas: número de progênies e indivíduos a conservar para garantir a perpetuação da espécie no ambiente. **Boletim Técnico SIF**, v. 1, n. 5, p. 1-6, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.53661/2763-686020210000005.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021.

SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. de. (org.). **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo**. Vitória: Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, 2007. 144 p.

SOUSA, V. A. de; AGUIAR, A. V. de; GRABIAS, J.; SPOLADORE, J.; DAROS, T. L.; STURION, J. A. **Manual de beneficiamento e teste de viabilidade do pólen da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2014. 22 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 262). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/121606/1/Doc.262.pdf. Acesso em: 22 ago. 2023.

SOUSA, V. A. de; AGUIAR, A. V. de; PINTO JÚNIOR, J. E.; SHIMIZU, J. Y.; STEINER, N. Melhoramento e conservação genética de *Araucaria angustifolia*. In: SOUSA, V. A. de; FRITSONS, E.; PINTO JÚNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária**: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021. p. 161-212. Disponível em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1137523. Acesso em: 22 ago. 2023.

SOUSA, V. A. de; AGUIAR, A. V. de. **Programa de melhoramento genético de araucária da Embrapa Florestas**: situação atual e perspectivas. Colombo: Embrapa Florestas, 2012. 17 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 237). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67269/1/Doc.-237.pdf. Acesso em: 13 dez. 2023.

SOUSA, V. A. de; HATTEMER, H. H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, v. 51, p. 309-317, 2003. DOI: https://doi.org/10.1071/BT02037.

STEFENON, V. M.; CAPRESTANO, C. A. Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 701-705, 2009. DOI: https://doi.org/10.1590/S0001-37652009000400009.

STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. The role of gene flow in shaping genetic structures of the subtropical conifer species *Araucaria angustifolia*. **Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 356-364, 2008. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00048.x.

TESDORFF, H. Experimentos de cruzamentos com *Araucaria araucana* (Molina) Koch e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Jornal de Genética Florestal e Melhoramento Florestal**, v. 5, p. 79-82, 1956.

WILSON, O. J.; WALTERS, R. J.; MAYLE, F. E.; LINGNER, D. V.; VIBRANS, A. C. Cold spot microrefugia hold the key to survival for Brazil's critically endangered araucaria tree. **Global Change Biology**, v. 25, n. 12, p. 4339-4351, 2019. DOI: https://doi.org/10.1111/gcb.14755.

WREGE, M. S.; FRITZSONS, E.; SOARES, M. T. S.; BOGNOLA, I. A.; SOUSA, V. A. de; SOUSA, L. P. de; GOMES, J. B. V.; AGUIAR, A. V. de; GOMES, G. C.; MATOS, M. de F. S.; SCARANTE, A. G.; FERRER, R. S. Distribuição natural e habitat da araucária frente às mudanças climáticas globais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 91, p. 331-346, 2017. DOI: https://doi.org/10.4336/2017.pfb.37.91.1413.

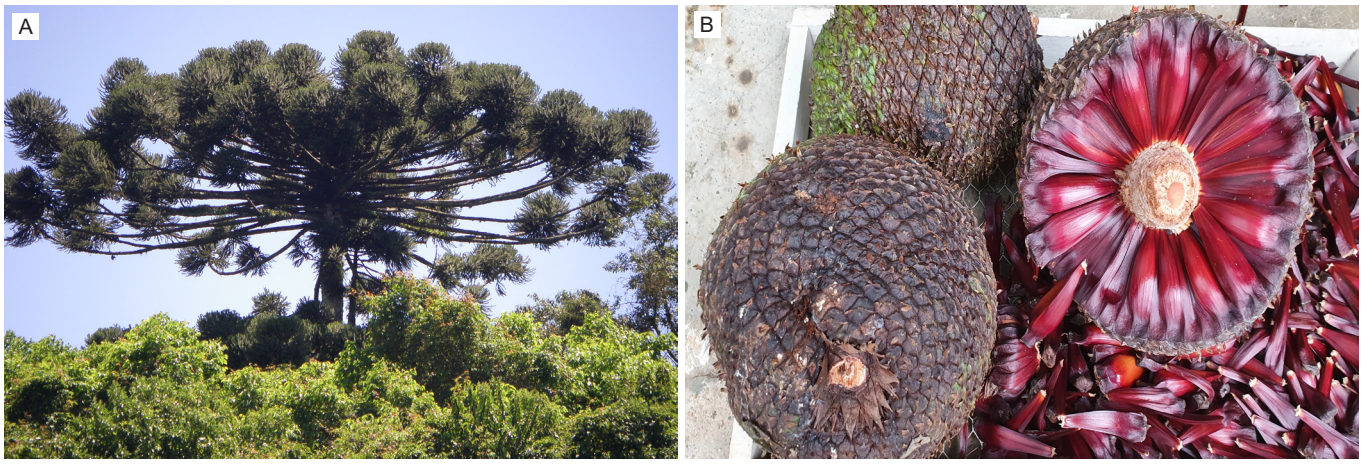
Capítulo 3

Método de amostragem de câmbio para extração de DNA e caracterização genética de populações naturais de *Araucaria angustifolia*

Valderês Aparecida de Sousa
Ananda Virginia de Aguiar
Tiago Luiz Daros
Sérgio Ricardo Silva

Introdução

O pinheiro-do-paraná [*Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze] é a única espécie do gênero *Araucaria* que ocorre naturalmente no Brasil, pertencendo à ordem *Pinales*, classe *Pinopsida*, família *Araucariaceae* e ao grupo das gimnospermas, sendo reconhecido como a árvore símbolo da região Sul brasileira (Figura 1A) (Aguiar et al., 2021; Silva; Silva, 2021). Sua madeira foi muito apreciada no passado, sendo utilizada na construção civil e na indústria, especialmente para fabricação de móveis, painéis, pisos, laminados, aglomerados, instrumentos musicais etc. (Reitz; Klein, 1966). Além disso, a árvore adulta feminina produz pinhas repletas de sementes (pinhões) (Figura 1B), de alto valor nutritivo e muito apreciadas na culinária regional, podendo gerar renda adicional ao proprietário rural (Godoy et al., 2021).



Fotos: Valderês Aparecida de Sousa

Figura 1. Árvore de *Araucaria angustifolia* com formato de cálice, no topo da Floresta Ombrófila Mista (A), e pinhas maduras da espécie, com detalhes dos pinhões (B).

Araucaria angustifolia ocorre, particularmente, na Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou "Floresta com Araucária" (IBGE, 2012), ecossistema pertencente ao bioma Mata Atlântica, onde se destaca por seu alto porte e formato de cálice, facilmente identificado no estrato superior da floresta (Figura 1A) (Campanili; Schaffer, 2010).

A FOM é a vegetação predominante do Planalto Meridional sul brasileiro, apresentando algumas disjunções florísticas em refúgios localizados nas Serras do Mar e Mantiqueira, cuja composição é dominada por gêneros primitivos como *Drymis* e *Araucaria* (australásicos) e *Podocarpus* (afro-asiático) (IBGE, 2012). Esse tipo de vegetação representa uma das principais unidades fitogeográficas no estado do Paraná (Figura 2). Ela possui quatro formações distintas: aluvial, submontana, montana e alto-montana (Instituto de Terras, Cartografia e Geociências, 2009), com a presença de *A. angustifolia* em todas elas.

Devido à ampla distribuição geográfica, em ambientes com diferentes características de solo, relevo, altitude e clima, espera-se grande diversidade genética da *A. angustifolia*, que tem sido verificada por meio de estudos sobre caracterização genética e ambiental de populações naturais da espécie (Stefenon et al., 2007, 2009; Sousa et al., 2020; Wrege et al., 2021).

Dentre as técnicas biotecnológicas empregadas para caracterização genética de *A. angustifolia*, visando nortear sua conservação, destacam-se as de genotipagem com marcadores moleculares codominantes, tais como: i) microssatélites [*simple sequence repeats* (SSRs)]; ii) polimorfismo de um único nucleotídeo [*single nucleotide polymorphism* (SNP)].

Os marcadores SSRs são sequências repetidas de bases nitrogenadas ou nucleotídeos [adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C)] no ácido desoxirribonucleico (DNA), abundantes e altamente polimórficas nos genomas

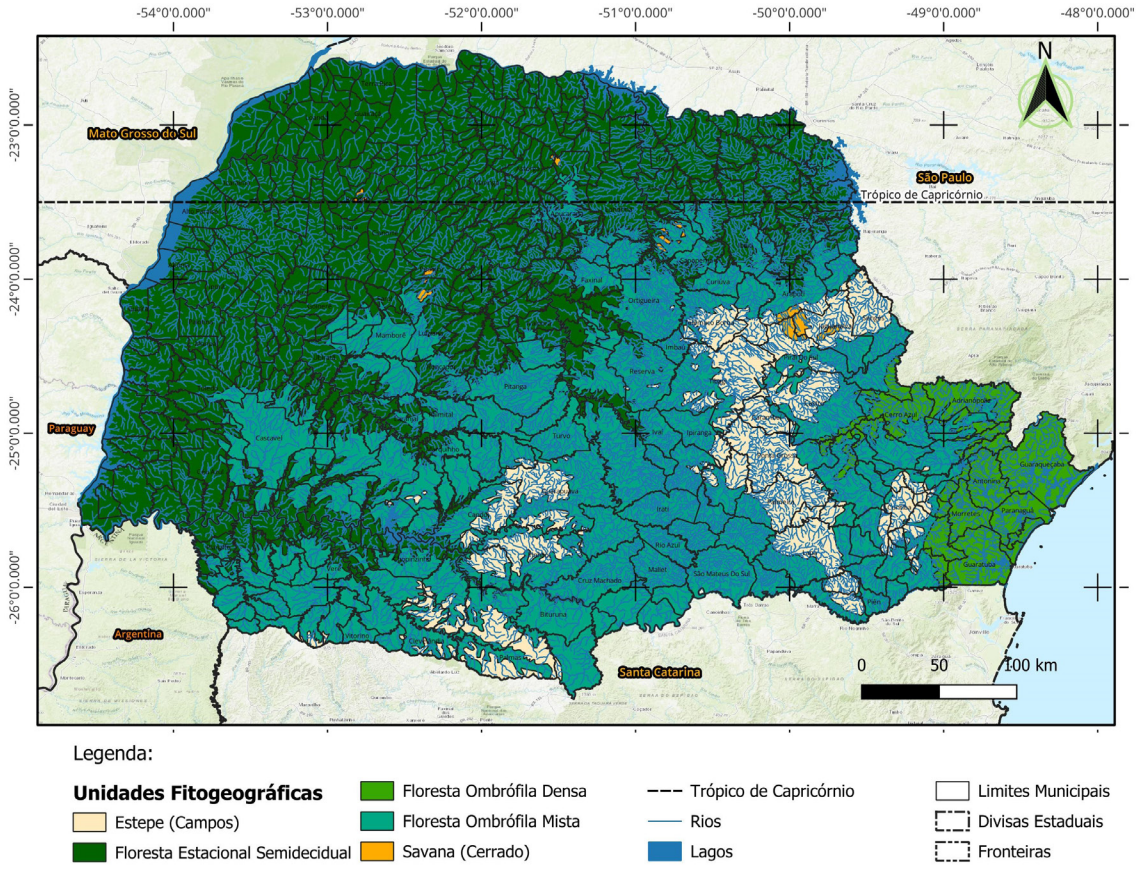


Figura 2. Unidades fitogeográficas no estado do Paraná.

Mapa: Wilson Anderson Holler

Fonte: Instituto Água e Terra (2023).

(Li et al., 2017). Esses marcadores apresentam herança mendeliana e fácil detecção por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase [*polymerase chain reaction* (PCR)], necessitando de pequena quantidade de DNA para a sua análise.

Por sua vez, um marcador SNP corresponde à variação de único nucleotídeo (A, T, G ou C) em vários locais do genoma ou código genético, sendo geralmente bialélico. Além disso, essa variação deve ocorrer em, no mínimo, 1% da população para ser classificada como SNP para estudos de variabilidade genética (Wang et al., 1998; Vallejos-Vidal et al., 2020). Os SNPs são a forma mais comum de variação no genoma e ocorrem aos milhares, portanto, vêm sendo extensivamente utilizados para estimar diferenças genéticas existentes entre indivíduos e populações.

Os marcadores genéticos têm sido aplicados para diferentes estudos em espécies florestais. Porém, uma das etapas que requer maior esforço é a coleta de material vegetativo, geralmente folhas e ramos, para extração de DNA, particularmente para as espécies florestais nativas que apresentam grandes proporções. Para viabilizar a coleta nessas condições, é necessária mão de obra especializada para escalar as árvores. Considerando que equipes capacitadas para essa finalidade nem sempre estão disponíveis, e que a contratação deste tipo de serviço especializado onera o custo de projetos de pesquisa, além do risco operacional inerente desta atividade, outras alternativas precisam ser investigadas para amostragem de tecidos vegetais que possam ser utilizados para obtenção de quantidade suficiente de DNA para pesquisas científicas. Destaca-se que essas alternativas devem também facilitar a amostragem de um maior número de árvores por população, com menor demanda laboral e/ou dispêndio financeiro, para que as técnicas sejam adotadas em escala operacional.

As equipes de pesquisa na área de conservação genética têm enfrentado outra dificuldade operacional após esta coleta de material biológico vegetal: a forma adequada de transportar e conservar o material recém amostrado

- desde a retirada da árvore até o armazenamento final no laboratório - de modo que o DNA não seja degradado. Em campo, utilizam-se várias alternativas para essa conservação, como o armazenamento das amostras em solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), em álcool, gelo etc. Porém, quando a coleta é realizada em locais distantes, particularmente em regiões de difícil acesso dentro de florestas nativas, o transporte é dificultado devido à grande quantidade de equipamentos, reagentes etc. Além disso, os procedimentos para a coleta do material vegetal e sua conservação são afetados em termos de rendimento operacional, somado ao comprometimento da qualidade do DNA. Por exemplo, a solução de CTAB pode proporcionar certo grau de degradação do DNA, prejudicando o procedimento de sequenciamento genético em laboratório. Há outras situações ainda mais complexas para a conservação do material vegetal amostrado, como a necessidade de envio do material para instituições de pesquisa ou laboratórios localizados em locais distantes ou em países estrangeiros, cuja remessa é realizada por meio dos correios ou empresas de transporte, demandando maior intervalo de tempo até a entrega ao destinatário.

Diante deste contexto, foram desenvolvidos novos métodos para a coleta de material vegetativo de *A. angustifolia*, seu armazenamento e conservação, utilizando amostra de câmbio, tecido com alto conteúdo de DNA, extraído do tronco da árvore e acondicionado em tubo Falcon com sílica gel, capaz de absorver a umidade da amostra, evitando a proliferação de fungos e bactérias. Assim, após a secagem adequada do câmbio, o material pode permanecer sob condições de ambiente para uso no curto prazo ou conservado em freezer para estudos de médio e longo prazos. A aplicação correta destes métodos de amostragem e conservação de câmbio facilitam os trabalhos de campo e permitem a obtenção de DNA adequado para análises genéticas utilizadas em pesquisas científicas.

Descrição dos métodos

Locais de amostragem de câmbio em árvores de araucária

Neste trabalho, as amostras de câmbio foram coletadas em 514 árvores de *A. angustifolia*, sendo 400 pertencentes a uma área de produção de sementes (APS) localizada em Colombo, PR (Figuras 3A e 3B), e 114 de populações naturais de araucária localizadas em fragmentos florestais em seis municípios paranaenses: Bocaiúva do Sul, Campina Grande do Sul, Campo Largo, General Carneiro, Ipiranga e Castro (Figuras 3C e 3D). A APS originou-se de um teste de procedência e progênie implantado em 1980 nas dependências da Embrapa Florestas (Sousa et al., 2021), proveniente de 12 diferentes populações naturais, procedentes de uma ampla área de ocorrência natural da espécie nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Por sua vez, os fragmentos de florestas naturais estão localizados em propriedades particulares, em áreas protegidas com alto grau de conservação. As coletas de câmbio foram realizadas em Colombo em 2011, em árvores com 31 anos de idade, e nas demais localidades em 2021, em árvores adultas no estádio de reprodução, cujas idades eram desconhecidas. De acordo com um mapa do Instituto de Terras, Cartografia e Geociências (Instituto de Terras, Cartografia e Geociências, 2009), estas áreas encontram-se nas seguintes formações fitogeográficas da FOM: i) Montana: Bocaiúva do Sul, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Colombo e Ipiranga; ii) Alto-montana: Castro e General Carneiro.

Fotos: Jacir Faber (A, B); André Kasczeszen (C, D)

Figura 3. Área de produção de sementes em Colombo, PR (A, B), e fragmentos de florestas naturais em Castro, PR (C, D), onde árvores de *Araucaria angustifolia* foram selecionadas para a amostragem de câmbio.

Escolha e marcação de árvores de araucária em populações naturais

A escolha de árvores matrizes em populações naturais, para a caracterização genética da *A. angustifolia*, é uma etapa fundamental para o sucesso de um projeto de pesquisa com a finalidade de conservação da espécie. Assim, as árvores são escolhidas adotando-se o critério da casualização, com caminhamento de aproximadamente 100 m entre árvores. Por outro lado, quando o objetivo da seleção é o uso em um programa de melhoramento genético, deve-se escolher os indivíduos com base em caracteres fenotípicos de interesse do programa, como altura total, diâmetro à altura do peito (DAP), forma do fuste, qualidade da madeira, espessura de casca, tamanho da copa, ângulo de inserção dos galhos, número de pinhas e produção de pinhões por árvore, dentre outros. No presente trabalho, a amostragem foi conduzida para estimar a variabilidade genética das populações naturais, entre e dentro delas.

As árvores escolhidas foram marcadas com etiquetas metálicas específicas para esta finalidade, além de serem numeradas com tinta amarela ou vermelha (Figura 4), que são cores que se destacam no interior da floresta para facilitar a localização, caso seja necessária uma nova coleta ou caracterização mais detalhada da árvore. Além disso, as árvores foram georreferenciadas com equipamentos de precisão, para facilitar a localização dos indivíduos no campo durante as várias etapas de investigação, ao longo do tempo. Vale destacar que, em projetos de pesquisa com objetivo de "amostragem única", essa marcação das árvores é desnecessária.

Fotos: Carlos Roberto Urio (A); Ananda Virginia de Aguiar (B)

Figura 4. Marcação e numeração de árvores de *Araucaria angustifolia* com tintas vermelha (A) e amarela (B), cores de fácil visualização em meio à vegetação.

Método de coleta de amostras de tecido lenhoso com câmbio

O câmbio em uma árvore de araucária está localizado na parte mais interna da casca. Portanto, para uma correta amostragem deste tecido vegetal para fins de análises genéticas é necessário que a camada externa da casca, ou seja, a porção suberosa, seja previamente eliminada. Nesse método, esta porção de casca é removida com auxílio de uma marreta e formão reto chanfrado (Figura 5A), retirando finas camadas de casca (cuja espessura varia muito entre os indivíduos), até perceber um aumento de resistência do tecido vegetal, indicando a proximidade do tecido lenhoso onde fica o câmbio. Na etapa seguinte, com auxílio de um formão cilíndrico do tipo "vazador de couro", de 2,7 cm de diâmetro, e marreta, é retirado um pedaço de tronco (de forma circular), com aproximadamente 2,5 cm de espessura, contendo um pouco de casca, o câmbio e uma maior quantidade de alburno (madeira) (Figuras 5B e 5C). A seguir, retira-se o excesso de alburno com um canivete, até a amostra atingir aproximadamente 1 cm de espessura, mas ainda contendo casca, câmbio e alburno. Sugere-se que o orifício aberto no tronco da árvore seja pulverizado com uma solução de sulfato de cobre (concentração de 1%) e, na sequência, seja vedado com auxílio de massa de vidraceiro (Figura 5D). Este procedimento é indicado para evitar a proliferação de fungos, bactérias e pragas que possam causar danos à árvore. Ressalta-se que podem ser retiradas de cada árvore matriz mais de uma amostra de tecido lenhoso com câmbio, de acordo com a quantidade de DNA necessária para cada objetivo de pesquisa.

Fotos: Gustavo Crizel Gomes (A, B, D); Marcos Silveira Wrege (C)

Figura 5. Etapas da amostragem de tecido lenhoso com câmbio em tronco de *Araucaria angustifolia*: retirada da camada externa da casca (porção suberosa) com auxílio de um formão reto chanfrado (A); extração da amostra de câmbio, contendo um pouco de casca e alburno, utilizando um formão cilíndrico do tipo "vazador de couro" (B, C); e obstrução do orifício com massa de vidraceiro (D).

Método de armazenamento das amostras de tecido lenhoso com câmbio

Após a obtenção das amostras de tecido lenhoso com câmbio, essas são acondicionadas em tubos cilíndricos com tampa, tipo Falcon (comumente usados para centrifugação), com 50 mL de capacidade, contendo aproximadamente 3 g ou 7,5 mL de sílica gel seca (Figura 6) para promover a desidratação do material vegetal, cujo processo é complementado em laboratório.

Fotos: Marianne Bernardes (A); Valderês Aparecida de Sousa (B)

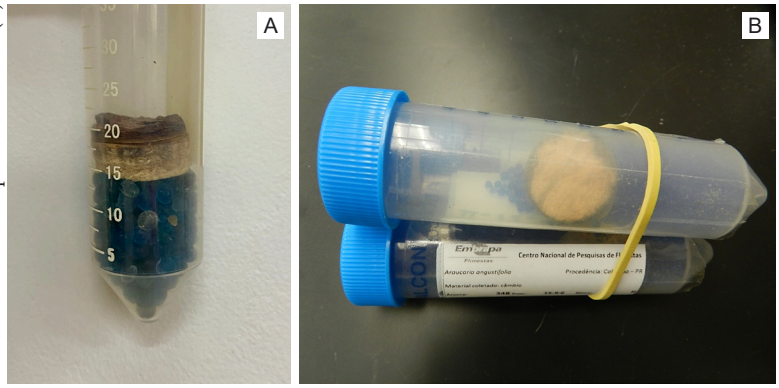
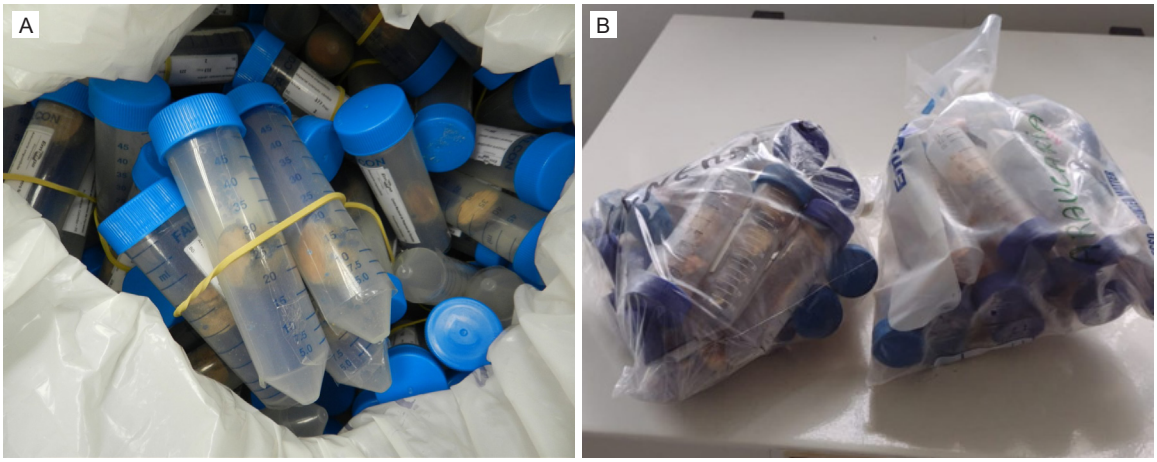


Figura 6. Tecido lenhoso amostrado em tronco de *Araucaria angustifolia*, com aproximadamente 1 cm de espessura, contendo o câmbio e um pouco de casca e alburno, depositado sobre sílica gel em tubo Falcon (A), para promover a desidratação do material após vedação hermética do tubo com tampa rosqueável (B).

A sílica gel é uma substância higroscópica comumente adicionada, na forma de sachês, no interior de frascos de medicamentos, peças eletrônicas, material fotográfico etc., visando impedir a proliferação de fungos ("mofos") e ferrugem. Ela é também utilizada em dessecadores de laboratório, geralmente com granulometria entre 1 e 4 mm, sendo composta por cloreto de cobalto ($CoCl_2$) e sílica amorfa (SiO_2) ou silicato de sódio (Na_2SiO_3), mudando da cor azul para rosa à medida que absorve umidade. Deste modo, esta mudança de cor indica o momento ideal para substituição da sílica saturada com água por outra desidratada, permitindo a continuidade do processo de secagem da amostra de tecido lenhoso com câmbio. É importante ressaltar que a sílica umedecida pode ser seca em estufa com circulação forçada de ar, aquecido sob temperatura entre 60 e 80 °C, por 24 horas, recuperando sua capacidade de absorção de água.

Ao chegar no laboratório, recomenda-se que os tubos contendo as amostras de tecido lenhoso com câmbio sejam abertos e colocados em dessecador contendo sílica gel seca, durante 24 horas, quando substitui-se a sílica umedecida por outra seca. Esse processo deve ser repetido até que a sílica gel se estabilize na coloração azul. A seguir, as amostras com câmbio, completamente secas, podem permanecer sob condição de ambiente para uso no curto prazo; ou em câmara fria ou freezer sob temperatura de -16 °C ou -80 °C, para uso em médio e longo prazos, respectivamente. Se houver a necessidade de transporte por longas distâncias após este armazenamento, especialmente para análises laboratoriais, não será necessário que o material esteja sob condições refrigeradas ou outro processo de conservação, bastando colocar os tubos em embalagem adequada para serem transportados (Figura 7).



Fotos: Valderês Aparecida de Sousa (A); Carlos Roberto Urio (B)

Figura 7. Tubos Falcon contendo sílica gel e amostras secas de tecido lenhoso com câmbio de *Araucaria angustifolia* (A) retirados de câmara fria, identificados e acondicionados em embalagem plástica (B) para transporte a longa distância.

Recomenda-se que os câmbios sejam extraídos das amostras de tecido lenhoso (como descrito no item seguinte), depositados em pequenos tubos com capacidade de 1,5 a 2,0 mL e, posteriormente, acondicionados em freezer sob temperatura de -16 °C ou -80 °C para armazenamento de médio ou longo prazos, respectivamente. Este procedimento otimiza o uso de espaços nos freezers e possibilita que quantidades maiores de amostras sejam armazenadas por mais tempo. Isto é particularmente importante para estudos genéticos que envolvem amostras de centenas de árvores matrizes.

Método de extração de câmbio de amostra de tecido lenhoso

Uma etapa fundamental para o sucesso das análises genéticas é o processo de identificação visual do câmbio para sua retirada do tecido lenhoso amostrado da árvore, visando a posterior extração de DNA.

O câmbio é um tecido delgado e heterogêneo, por isso sua remoção com estilete ou outro instrumento cortante deve ser feita com critério e destreza para que não sejam incluídos tecidos lenhosos, com baixo conteúdo de DNA (Figura 8).

Fotos: Marianne Bernardes

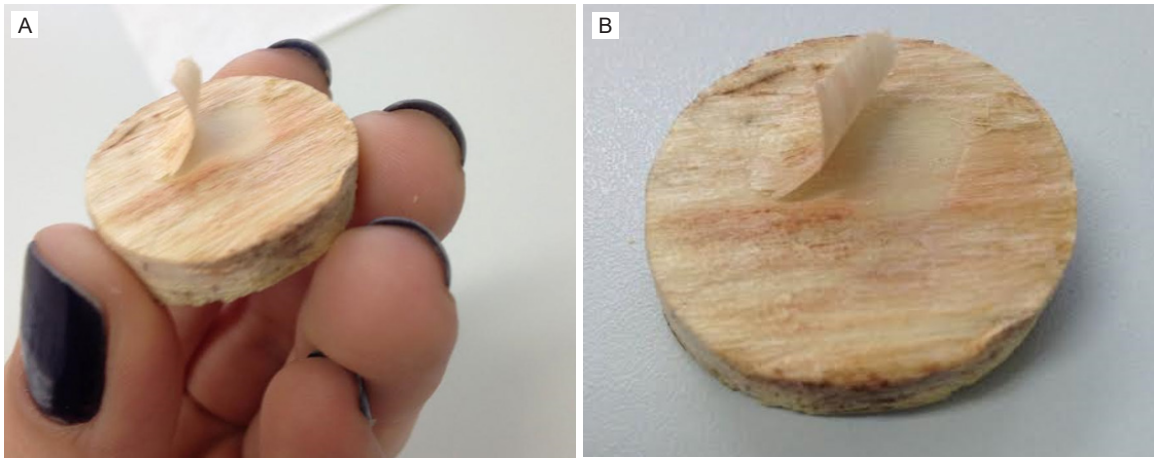


Figura 8. Separação cuidadosa do câmbio localizado sob o tecido suberoso de *Araucaria angustifolia* (A) e detalhe do câmbio na forma de uma fina película (B).

Método de desintegração de amostra de câmbio e posterior extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras de câmbio, é necessário que elas sejam previamente desintegradas (moídas ou maceradas) em finas partículas em equipamento TissueLyser (Figura 9). Durante esse processo, o tecido seco de câmbio é colocado em tubo Eppendorf, com volume de 5 mL, juntamente com três ou quatro *beads* (esferas magnéticas com 0,5 mm de diâmetro), sendo posteriormente acondicionado no TissueLyser e processado por 2 a 3 minutos, dependendo da textura do câmbio. Podem ser maceradas conjuntamente de 12 a 48 amostras, dependendo da capacidade do equipamento. Finalmente, as amostras moídas ou maceradas de câmbio são armazenadas (sem as *beads*) em tubos Eppendorf, que são acondicionados em câmara fria sob temperatura de -40 °C, até o momento da extração de DNA.

Fotos: Fernanda Neves Lima

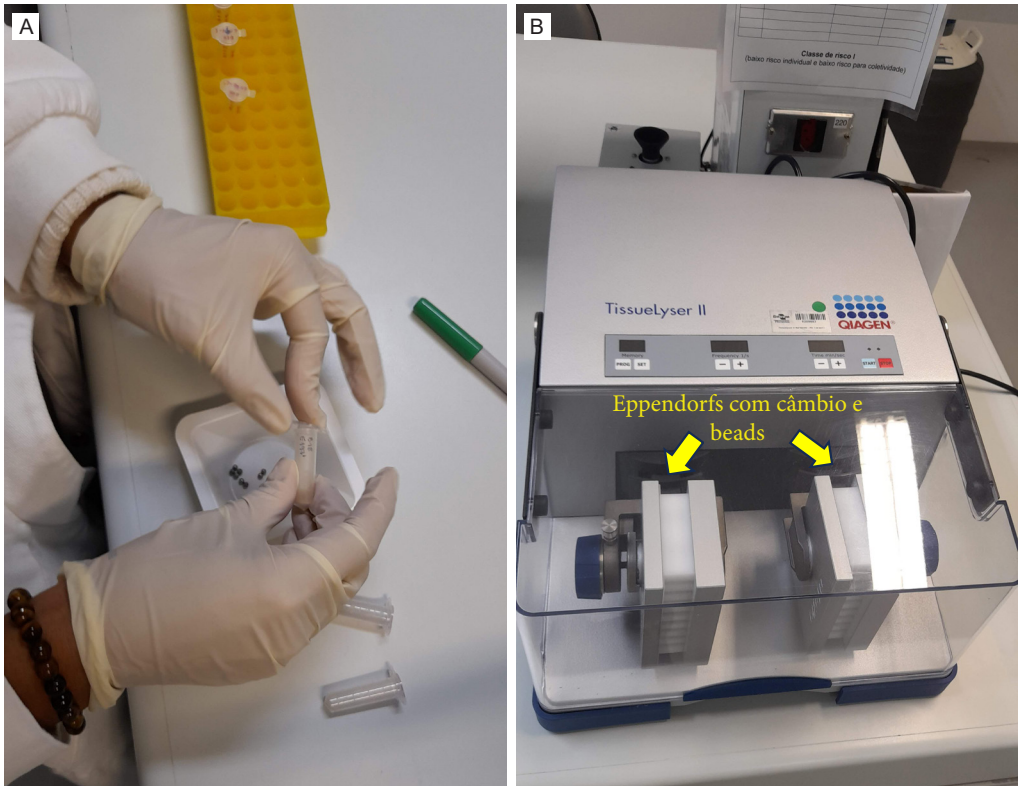
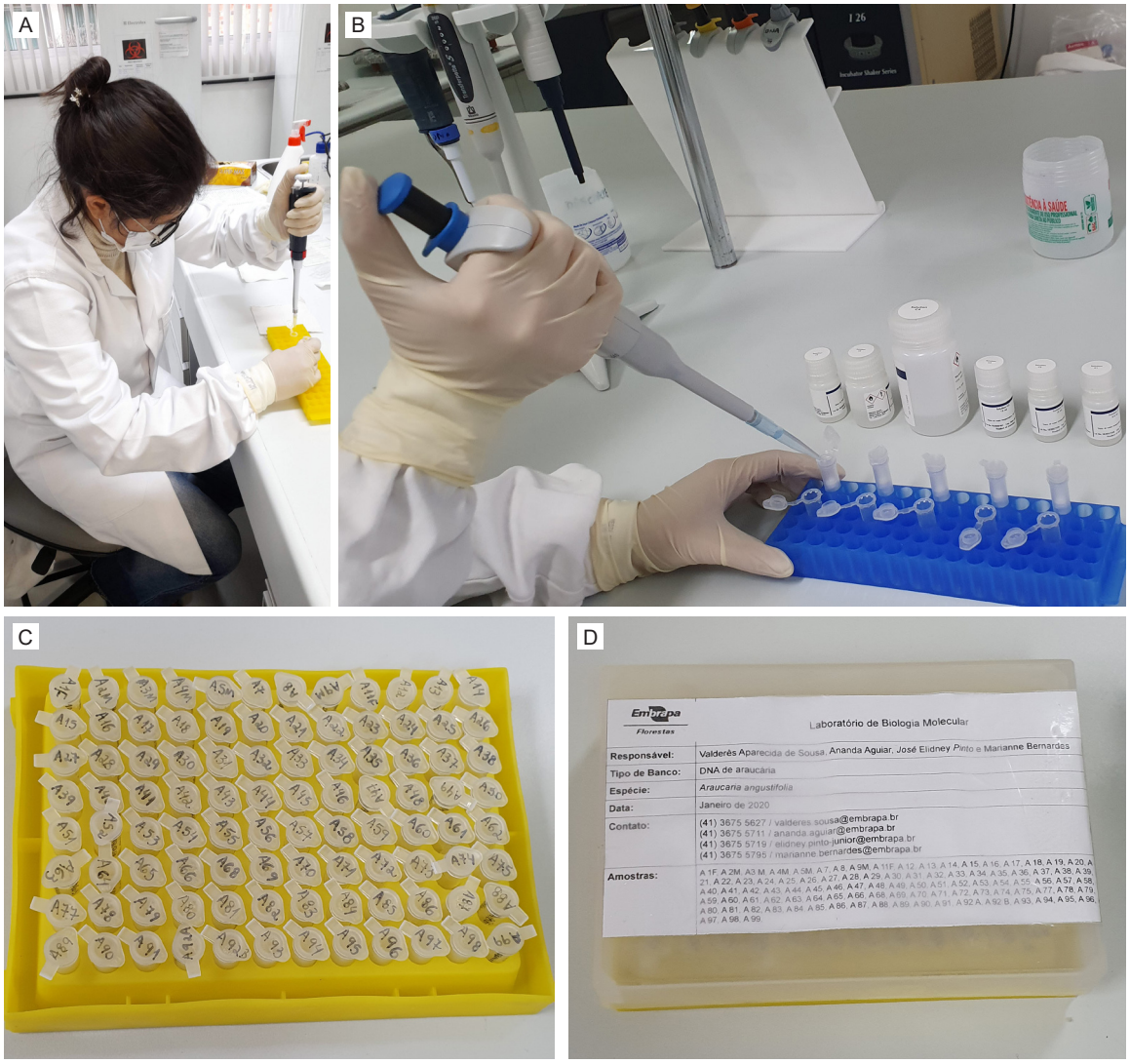


Figura 9. Amostra de câmbio de *Araucaria angustifolia,* sendo preparada juntamente com a inserção de *beads* em tubo Eppendorf (A) para posterior processo de desintegração no equipamento TissueLyser (B).

A etapa final que antecede as análises genéticas (SSR ou SNP) é a extração de DNA do câmbio desintegrado e armazenado. Nesse processo, o DNA genômico é extraído utilizando o Kit de Plantas DNasy 96 (Qiagen) (Figura 10A), conforme método descrito por Sousa et al. (2020) e, em seguida, é colocado em tubo Eppendorf (Figuras 10B e 10C) e armazenado em freezer com temperatura de -20 °C.

Alguns cuidados especiais devem ser tomados durante o processo de envio de amostras de DNA ao laboratório de análises genéticas (Figura 10D), utilizando os correios ou outra empresa transportadora: os tubos contendo DNA devem ser armazenados em pequenas caixas de isopor com gelo seco, cujo transporte deve ser realizado o mais breve possível; e, quando o tempo de transporte for longo, recomenda-se que as amostras de DNA sejam liofilizadas.



Fotos: Fernanda Neves Lima (A); Valderês Aparecida de Sousa (B, C, D)

Figura 10. Procedimento de extração de DNA de amostras de câmbio de *Araucaria angustifolia*, utilizando o Kit de Plantas DNasy 96 (Qiagen) (A), e seu armazenamento em tubos Eppendorf (B, C), seguido de embalagem para posterior envio ao laboratório de análises genéticas (D).

Considerações finais

Os métodos de extração e armazenamento de câmbio e DNA de *Araucaria angustifolia* adotados neste trabalho resultaram em 100% de sucesso nas análises genéticas pela técnica de sequenciamento do tipo SSR (marcadores microssatélites) das 514 árvores amostradas, demonstrando a viabilidade operacional em nível de campo e laboratório.

A maior dificuldade para a extração do câmbio de *Araucaria angustifolia* é a espessura da casca da árvore, que varia entre os indivíduos e, muitas vezes, é de difícil remoção para se atingir a camada desejada de tecido lenhoso.

Utilizando as técnicas apresentadas neste capítulo, o trabalho de campo para a amostragem de tecido lenhoso com câmbio é facilitado, devido à pequena quantidade de utensílios necessários para a obtenção das amostras. É possível amostrar, em apenas um dia, mais de 400 árvores matrizes em testes genéticos implantados em campo. Nas florestas naturais, essa quantidade depende da proximidade entre os indivíduos, da formação florestal, do tipo e altura do sub-bosque, relevo, dentre outros fatores. Por exemplo, em uma área com sub-bosque de taquara e bambus foi possível amostrar mais de 80 árvores por dia nas condições locais onde foi realizada a pesquisa.

Os métodos apresentados podem ser adotados em programas de pesquisa, em termos de viabilidade técnica, principalmente com relação ao transporte das amostras de câmbio para laboratórios de análises genéticas, seja no Brasil ou no exterior, visto que requerem poucos gastos com materiais e reagentes, além de menor demanda de mão de obra.

O armazenamento em sílica gel das amostras de tecido lenhoso com câmbio e a extração da umidade em dessecador têm garantido a conservação do câmbio durante muitos anos sob temperatura ambiente ou em câmara fria, além de preservar a integridade do DNA a ser extraído posteriormente para uso em análises genéticas.

Referências

AGUIAR, A. V. de; SOUSA, V. A. de; PINTO JUNIOR, J. E.; MIKICH, S. B.; LIEBSCH, D. A araucária e suas especificidades. In: SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária**: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 3, p. 47-68. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229160/1/EmbrapaFlorestas-2021-LV-AraucariaEmbrapa-cap3.pdf. Acesso em: 11 dez. 2023.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. (org.). **Mata Atlântica**: patrimônio dos brasileiros. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2010. 408 p.

GODOY, R. C. B. de; CARVALHO, C. W. P. de; GUIDOLIN, M. E. B. Z.; IKEDA, M.; NOGUEIRA, R. I.; HELM, C. V.; CORNEJO, F. E. P.; COSTA, F. J. O. G. da; BARRETO, A. G. Valor nutricional e processamento do pinhão. In: SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária**: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 16, p. 321-336. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229178/1/EmbrapaFlorestas-2021-LV-AraucariaEmbrapa-cap16.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

IBGE. **Manuais técnicos em geociências**: manual técnico da vegetação brasileira. 2 ed. Rio de Janeiro, 2012. 275 p. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv63011.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

INSTITUTO ÁGUA E TERRA (Paraná). **Unidades fitogeográficas no estado do Paraná**. Curitiba, 2023. Disponível em: https://geopr.iat.pr.gov.br/img/repositorio-de-dados/?id=c93c60705f16462380e0fe66b1f77245#. Acesso em: 21 set. 2024.

INSTITUTO DE TERRAS, CARTOGRAFIA E GEOCIÊNCIAS (Paraná). **Formações fitogeográficas**: estado do Paraná. Curitiba, 2009. 1 mapa color. Escala 1:2.000.000. Disponível em: https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/2020-07/mapa_fitogeografico_a3.pdf. Acesso em: 11 dez. 2023.

LI, Z.; CHEN, F.; HUANG, C.; ZHENG, W.; YU, C.; CHENG, H.; ZHOU, R. Genome-wide mapping and characterization of microsatellites in the swamp eel genome. **Scientific Reports**, v. 7, artigo 3157, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-03330-7.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Araucariáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1966. 62 p. (Flora ilustrada catarinense).

SILVA, S. R.; SILVA, D. R. de F. **Produção técnico-científica sobre *Araucaria angustifolia* publicada com a participação da Embrapa**: síntese quantitativa de 40 anos (1981-2020). Colombo: Embrapa Florestas, 2021. 59 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 365). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1143231/1/EmbrapaFlorestas-2021-Documentos365.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

SOUSA, V. A. de; AGUIAR, A. V. de; PINTO JUNIOR, J. E.; SHIMIZU, J. Y.; STEINER, N. Melhoramento e conservação genética de *Araucaria angustifolia*. In: SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária**: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 9, p. 161-212. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229168/1/EmbrapaFlorestas-2021-LV-AraucariaEmbrapa-cap9.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.

SOUSA, V. A. de; REEVES, P. A.; AGUIAR, A. V. de; STEFENON, V. M.; RICHARDS, C. M. Genetic diversity and biogeographic determinants of population structure in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Conservation Genetics**, v. 21, n. 2, p. 217-229, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s10592-019-01242-9.

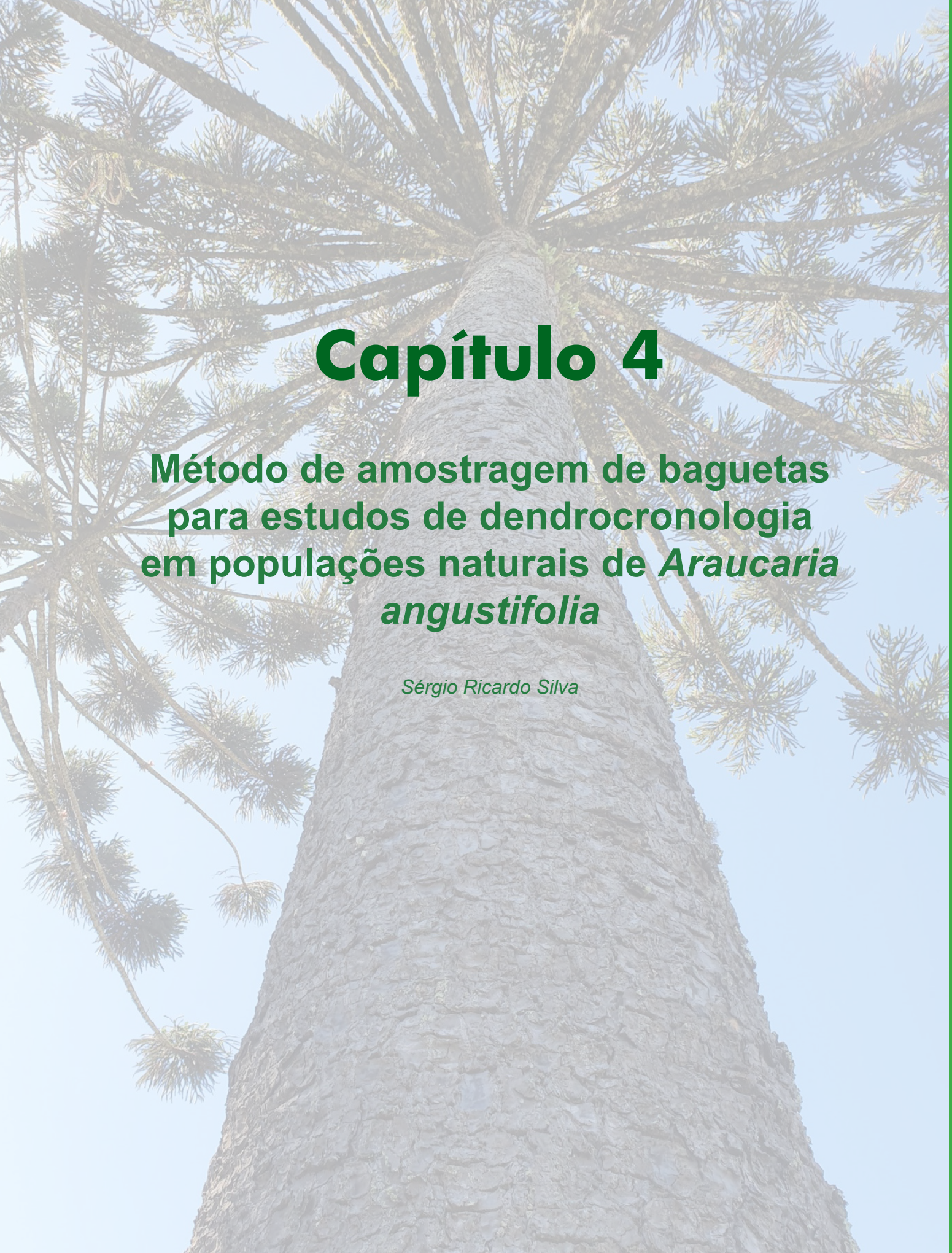
STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: Implications for the *in situ* conservation of genetic resources. **Plant Biology**, v. 9, p. 516-525, 2007. DOI: https://doi.org/10.1055/s-2007-964974.

STEFENON, V. M.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 2433-2448, 2009. DOI: https://doi.org/10.1007/s10531-009-9600-z.

VALLEJOS-VIDAL, E.; REYES-CERPA, S.; RIVAS-PARDO, J. A.; MAISEY, K.; YÁÑEZ, J. M.; VALENZUELA, H.; CEA, P. A.; CASTRO-FERNANDEZ, V.; TORT, L.; SANDINO, A. M.; IMARAI, M.; REYES-LÓPEZ, F. E. Single-nucleotide polymorphisms (SNP) mining and their effect on the tridimensional protein structure prediction in a set of immunity-related expressed sequence tags (EST) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Frontiers in Genetics**, v. 10, artigo 1406, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01406.

WANG, D. G.; FAN, J.; SIAO, C.; BERNO, A.; YOUNG, P.; SAPOLSKY, R.; GHANDOUR, G.; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J.; KRUGLYAK, L.; STEIN, L.; HSIE, L.; TOPALOGLOU, T.; HUBBELL, E.; ROBINSON, E.; MITTMANN, M.; MORRIS, M. S.; SHEN, N.; KILBURN, D.; RIOUX, J.; NUSBAUM, C.; ROZEN, S.; HUDSON, T. J.; LIPSHUTZ, R.; CHEE, M.; LANDER, E. R. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1077-1082, 1998. DOI: https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1077.

WREGE, M. S.; SOARES, M. T. S.; SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; AGUIAR, A. V. de; BOGNOLA, I. A.; GOMES, J. B. V.; MATTOS, P. P. de; HELM, C. V.; SOUSA, L. P. de; SCARANTE, A. G.; MATTOS, M. de F. da S. **Metodologia para a caracterização ambiental e genética de populações de araucária para sua conservação e uso sustentável**. Colombo: Embrapa Florestas, 2021. 23 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 356). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/227522/1/EmbrapaFlorestas-2021-Documentos356.pdf. Acesso em: 23 ago. 2023.



Capítulo 4

Método de amostragem de baguetas para estudos de dendrocronologia em populações naturais de *Araucaria angustifolia*

Sérgio Ricardo Silva

Introdução

A araucária [*Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze], conhecida como pinheiro-do-paraná, é uma espécie de conífera nativa do Brasil, que ocorre na Floresta Ombrófila Mista (FOM), ou Floresta com Araucária, formação fitogeográfica presente principalmente na região Sul. A madeira da espécie apresenta alta qualidade e valor econômico. As árvores femininas iniciam a produção de pinhas entre 12 e 15 anos de idade, cujas sementes (pinhões) são consumidas pela fauna silvestre e população, representando fonte de renda para os agricultores (Wendling, 2015). As árvores adultas possuem frequentemente de 10 a 35 m de altura e de 0,5 a 1,2 m de diâmetro à altura do peito (DAP), podendo atingir até 64 m de estatura e 2,5 m de DAP (Carvalho, 2003). A araucária possui longevidade extensa, sendo que árvores centenárias ainda são encontradas, como é o caso de um espécime localizado no Parque do Pinheiro Grosso em Canela, RS, com idade aproximada de 700 anos (Figura 1).

Foto: Jair Prandi

Figura 1. Árvore de *Araucaria angustifolia* com aproximadamente 700 anos, localizada no Parque do Pinheiro Grosso em Canela, RS.

A idade de uma árvore de araucária pode ser estimada, com boa precisão, por meio da análise de seus anéis de crescimento, utilizando técnicas dendrocronológicas em disco de madeira cortado transversalmente no tronco (Figura 2A) ou por meio da extração com trado de incremento de uma bagueta (*increment core*), geralmente com 4,3 ou 5,15 mm de diâmetro, desde a casca até o cerne, ou através de toda a secção transversal (Figura 2B). A primeira técnica resulta no corte da árvore, enquanto a coleta de bagueta destina-se principalmente a árvores vivas, sendo um procedimento pouco invasivo. Para melhor estimativa da idade, as amostras devem ser provenientes da base do tronco, o mais próximo possível do nível do solo.

As análises de anéis de crescimento de árvores têm aplicação prática em projetos ambientais e científicos nas áreas de ecologia, silvicultura, conservação genética, dentre outras. No caso de araucária, alguns trabalhos foram realizados recentemente para avaliações diversas, tais como: a) dinâmica de crescimento de árvores em florestas com distintos estágios de conservação (Stepka et al., 2021); b) efeitos de bordadura da floresta sobre a dinâmica de crescimento das árvores e sua sensibilidade climática a variações de temperatura e pluviosidade (Albiero-Júnior

Figura 2. Técnicas dendrocronológicas para a estimativa da idade de árvore de *Araucaria angustifolia*: contagem do número de anéis de crescimento em disco de madeira extraído transversalmente do tronco (A) ou em bagueta amostrada com trado de incremento na secção transversal do tronco (B).

et al., 2020); c) crescimento e forma do tronco durante a vida da árvore (Mattos et al., 2022); d) competição e padrão de crescimento de árvores no interior da floresta (Curto et al., 2021); e) manejo sustentável da espécie em função de seu histórico de crescimento (Loiola et al., 2019); f) efeitos da temperatura e precipitação pluviométrica sobre o crescimento de árvores de diferentes idades (Oliveira et al., 2017; Brandes et al., 2021; Silva et al., 2021); g) influência da alteração antrópica do ambiente sobre variáveis climáticas, evidenciada pelo crescimento retrospectivo da araucária (Marcon et al., 2022).

As técnicas dendrocronológicas utilizadas nesses estudos científicos têm sido aplicadas quase exclusivamente por profissionais especializados no assunto. Além disso, existem algumas particularidades dos métodos empregados em função da espécie florestal. A carência de material didático sobre o assunto, particularmente em português, é um fator que restringe a aplicação desses métodos pelo público de áreas afins, que necessita utilizá-los como ferramenta complementar em estudos científicos, em nível acadêmico ou profissional.

O objetivo deste trabalho é apresentar os principais procedimentos operacionais para a amostragem de baguetas em árvores de araucária, descrevendo as técnicas e os equipamentos utilizados. Também serão abordados os principais cuidados necessários para preservar a integridade e sanidade das árvores vivas que serão amostradas. Assim, espera-se que o texto seja uma contribuição para profissionais e estudantes que se dedicam à ecologia, silvicultura, melhoramento e conservação genética desta espécie florestal tão estimada pelos brasileiros.

Conceitos e definições de alguns termos técnicos

O uso adequado de um trado de incremento demanda conhecimentos sobre a anatomia e as propriedades da madeira, que diferem significativamente entre gimnospermas (como araucária, pínus e demais coníferas) e angiospermas (como mogno, cedro, castanheira-do-brasil e eucalipto). Assim, considerando a especificidade de alguns termos técnicos utilizados neste trabalho, são apresentados a seguir alguns conceitos e definições, de modo a auxiliar o leitor no entendimento do conteúdo abordado:

- **Gimnospermas**: filo de plantas vasculares espermatófitas que possuem sementes nuas (do grego: "gymnos" = nu e "sperma" = semente), ou seja, não envolvidas por frutos. As principais representantes deste grupo de plantas são as coníferas, como a araucária, que produzem estróbilos masculinos (androestróbilos ou microestróbilos) e femininos (ginoestróbilos ou megaestróbilos).
- **Angiospermas**: filo de plantas vasculares espermatófitas, popularmente chamadas de folhosas, com sementes protegidas por frutos (do grego "angeios" = bolsa). É o único grupo de plantas com flores e frutos, sendo o mais diversificado, com mais de 250 mil espécies.
- **Crescimento da árvore**: em termos botânicos, pode-se distinguir dois tipos de crescimento: a) "primário", em altura ou comprimento, realizado pelo meristema apical localizado na extremidade do caule, galhos e raízes; b) "secundário", em espessura ou circunferência, promovido pelo meristema cambial no interior dos tecidos. As células meristemáticas conservam características embrionárias (i.e., são pequenas, com estrutura simples, parede celular fina, abundância de vacúolos etc.) e estão em constante divisão durante toda a vida da planta, promovendo seu crescimento e originando, por diferenciação, outros tecidos vegetais mais especializados, como aqueles responsáveis pela fotossíntese, sustentação, armazenamento e transporte de água, nutrientes e fotoassimilados.
- **Xilema**: tecido vascular presente nas gimnospermas, angiospermas e pteridófitas, que realiza o transporte por capilaridade de água e sais minerais desde as raízes até as folhas, além de fornecer sustentação mecânica ao vegetal. É um tecido complexo composto por diferentes tipos celulares: elementos condutores, fibras xilemáticas e células parenquimáticas. Há dois tipos de elementos condutores (Pedrazzi et al., 2019): a) traqueídeos, que são células imperfuradas, estreitas e alongadas, com comprimento entre 2 e 5 mm, mais abundantes em gimnospermas; b) elementos de vaso, com células perfuradas nas extremidades, largas e curtas, com comprimento entre 0,2 e 1,0 mm, predominantes em angiospermas. Nas plantas lenhosas, o xilema se divide em cerne (*heartwood*) e alburno (*sapwood*).
- **Floema**: é constituído por uma camada bem fina localizada na porção interna da casca, sendo fisiologicamente ativa e responsável pelo transporte da seiva orgânica elaborada, desde as folhas até as raízes. Ele é formado por diferentes tipos celulares: elementos crivados, células companheiras ou albuminosas, fibras floemáticas e células de parênquima. Os elementos crivados podem ser de dois tipos: células crivadas em gimnospermas; e elementos do tubo crivado em angiospermas.
- **Cerne**: é a parte mais interna e velha de uma secção transversal do tronco, geralmente com coloração mais escura (Figura 3A). Este tecido vegetal não possui células vivas e não participa ativamente na condução de água ou seiva, assumindo uma função básica de suporte mecânico da estrutura da árvore. A parte central do cerne é popularmente conhecida como medula.
- **Alburno**: é a parte periférica e mais jovem da madeira do tronco de uma árvore, apresentando células vivas (Figura 3A). Normalmente possui coloração mais clara do que o cerne. O alburno faz parte do xilema das coníferas, que participa da composição de uma madeira "não porosa", constituída de traqueídeos, fibras e células parenquimáticas. Esses traqueídeos conduzem líquidos e solutos dentro da planta, representando aproximadamente 90% da estrutura da madeira das coníferas (Pedrazzi et al., 2019).
- **Câmbio**: é um tecido fino localizado sob a casca, contendo células vivas (meristemáticas secundárias), capazes de se dividirem e se diferenciarem em novas células (floema, xilema e tecidos vasculares secundários), sendo responsáveis pelo crescimento secundário da árvore, ou seja, pela formação da casca e da madeira (cerne e alburno) no sentido radial (Figuras 3A e 3B).
- **Raios**: são faixas finas de células parenquimáticas que se originam do câmbio. Possuem altura, largura e comprimento variáveis, que se estendem radialmente no lenho, partindo do floema e passando pelo xilema em direção à medula do tronco. A função deste tecido é armazenar e conduzir transversalmente carboidratos, água e nutrientes. Em geral, a madeira de gimnospermas é composta predominantemente

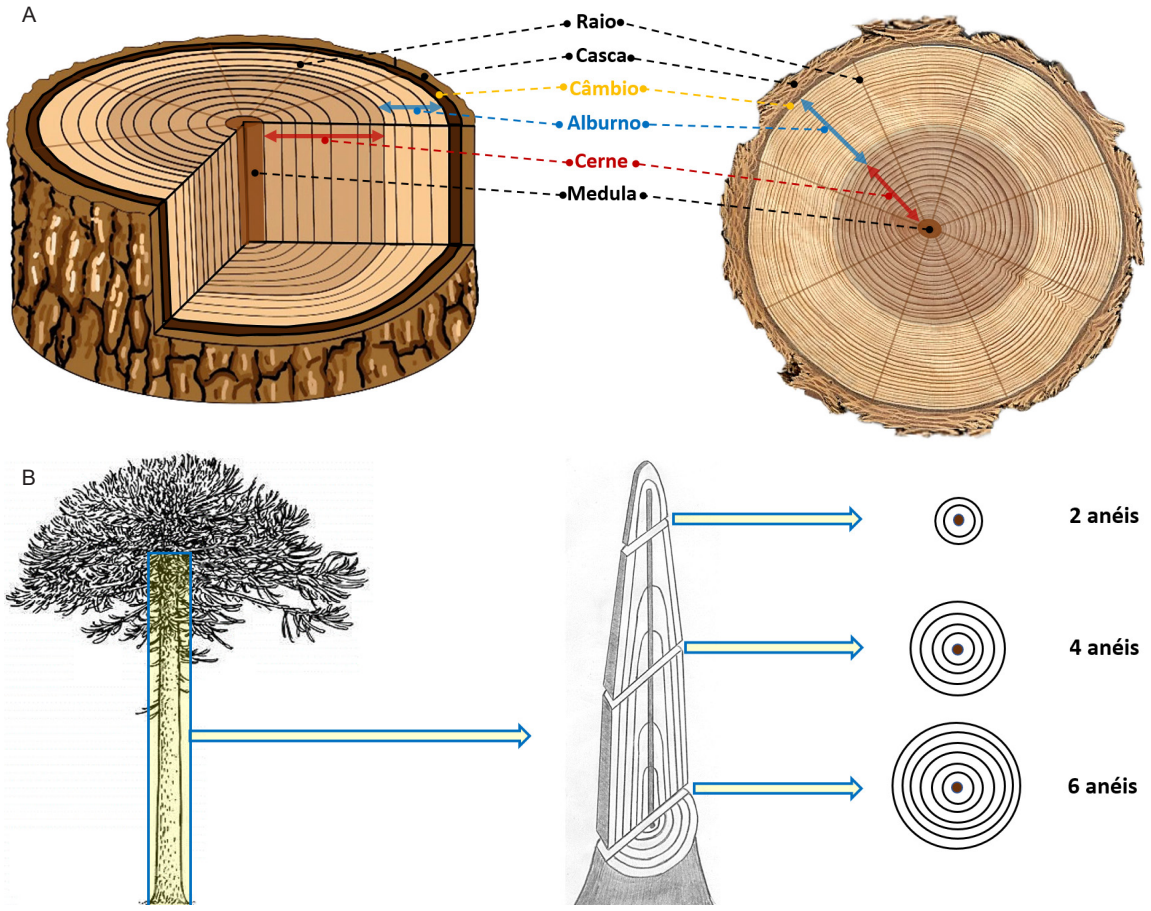


Figura 3. Representação do corte transversal do tronco de uma árvore, mostrando a medula, o cerne, o alburno, o câmbio vascular, os raios e a casca (A). Crescimento do tronco nos sentidos radial e longitudinal (B).

Ilustração: Sérgio Ricardo Silva

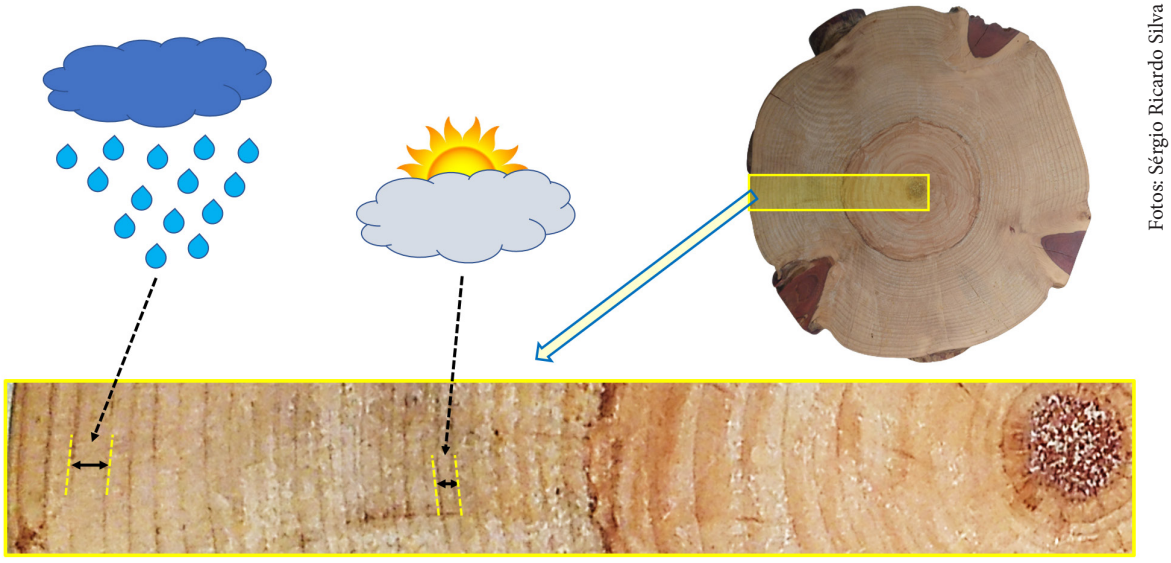
por agregados de traqueídeos (tubos lignificados), de pequeno tamanho, formando raios que podem incorporar canais de resina. Por outro lado, a madeira de angiospermas possui maior variedade de tipos celulares, apresentando amplos raios multiserrilhados, poucos traqueídeos e ausência de canais de resina.

– **Casca**: é o tecido mais externo do tronco (Figura 3A). A porção interna da casca corresponde ao floema. Por sua vez, a parte mais externa é conhecida como córtex ou ritidoma, sendo composto por um tecido morto, com função de proteger o tronco contra variações climáticas abruptas, danos mecânicos e ataque de insetos e microrganismos. A casca também pode armazenar nutrientes e substâncias energéticas de reserva.

– **Anel de crescimento anual**: é cada par de bandas concêntricas, uma clara e outra escura, geralmente com formato circular ou ovalado, observado na secção transversal do tronco de algumas espécies de árvores, representando um ano de crescimento secundário. Ambas bandas são constituídas por células do xilema, que são produzidas na região do câmbio vascular sob a casca. No início do verão (ou primavera), quando a estação do ano é quente e há abundância de água, o câmbio produz expressiva quantidade de células xilemáticas, grandes e claras, também conhecidas como "madeira precoce" (*early wood*) (Fay; Berker, 2018). À medida que o verão avança e as temperaturas decrescem (com a proximidade do outono), combinado com escassez de água, as novas células xilemáticas produzidas são pequenas e com maior concentração de lignina, resultando em cor escurecida, constituindo a "madeira tardia" (*late wood*). Em coníferas, essa cor escura é resultado da redução do tamanho dos traqueídeos e aumento da espessura de sua parede

celular. Dependendo do ambiente, a árvore paralisa seu crescimento no inverno, resultando em anéis de crescimento bem distintos e de fácil observação. Assim, as larguras dos anéis e as características anatômicas da madeira produzida variam de ano para ano com as mudanças nas condições ambientais. Deve-se notar que árvores de algumas regiões tropicais e subtropicais podem não produzir anéis de crescimento, particularmente quando as condições climáticas regionais permitem crescimento contínuo da planta. No entanto, também pode ocorrer a formação de dois ou mais anéis por ano (i.e., "falsos anéis"), determinada pela alternância de períodos de chuva e de seca nessas regiões climáticas (Botosso; Mattos, 2002). Árvores crescidas em condições extremamente áridas produzem falsos anéis ou a ausência de alguns deles.

– **Dendrocronologia***:* inicialmente desenvolvida pelo astrônomo Andrew Ellicott Douglass (1867-1962), considerado o "pai da dendrocronologia", é uma ciência que extrai informações cronológicas e não cronológicas de anéis de crescimento de troncos de árvores, principalmente por meio da contagem dos anéis e de suas mensurações (largura, comprimento etc.), para estimar a idade da árvore e sua taxa de crescimento anual, respectivamente (Douglass, 1921; Cook; Kairiukstis, 1989; Biondi, 2020). Essa técnica auxilia no entendimento das condições climáticas do passado, dentre outras aplicações. Quando há disponibilidade de séries temporais de dados meteorológicos de uma região, é possível deduzir como mudanças climáticas afetaram o crescimento da árvore. Por exemplo, em anos mais quentes e com abundante disponibilidade hídrica – possibilitando estações de crescimento mais longas – os anéis de crescimento serão mais largos (Figura 4). Por outro lado, em anos mais secos, o déficit hídrico limitará o crescimento da árvore e os anéis de crescimento serão mais estreitos. A dendrocronologia tem fornecido informações relevantes em diversas áreas científicas, incluindo ecologia, silvicultura, manejo florestal, climatologia, botânica, biogeografia, história, arqueologia, e até em programas de crédito de carbono (Grissino-Mayer, 2003; Carrer, 2011; Tsen et al., 2016; Pearl et al., 2020; Edvardsson et al., 2021).



Fotos: Sérgio Ricardo Silva

Figura 4. Anéis de crescimento de árvore de *Araucaria angustifolia* influenciados pelas condições climáticas: anéis mais largos e mais estreitos estão geralmente associados com maior e menor disponibilidade hídrica durante a estação de crescimento, respectivamente.

Ilustração: Sérgio Ricardo Silva

– **Bagueta (*increment core*)**: amostra indeformada de madeira extraída de uma árvore, desde a casca até o cerne, ou através de toda a secção transversal do tronco. Possui formato cilíndrico, geralmente com diâ-

metro entre 4,3 e 12 mm, em função das especificações do trado de incremento utilizado na extração da amostra. As baguetas são utilizadas para análises dendrocronológicas que possibilitam determinar a idade e a taxa de crescimento da árvore. Elas também são utilizadas para avaliar propriedades físicas e químicas da madeira em várias posições do tronco (longitudinal e radial). Além disso, empresas que realizam tratamento de madeira utilizam as baguetas para verificar a penetração de produtos químicos no tecido vegetal durante o processo de impregnação.

- **Madeiras macias (*soft woods*)**: são provenientes de árvores do grupo de gimnospermas, usualmente com cones e acículas, as quais se mantêm na árvore ao longo do ano, sendo conhecidas como "sempre verdes" (*evergreen*). O transporte de água e seiva através da madeira é realizado por meio de traqueídeos e indistintos raios medulares. Quando observadas ao microscópio, as madeiras macias não apresentam poros visíveis devido aos traqueídeos. Essas madeiras geralmente produzem resinas, apresentam coloração clara e anéis de crescimento bem distintos.
- **Madeiras duras (*hard woods*)**: têm como origem básica as árvores angiospermas com folhas geralmente largas que caem durante o outono e inverno e, por isso, são chamadas de árvores caducifólias (ou decíduas). Suas estruturas vasculares aparecem como poros quando vistas no microscópio. São madeiras geralmente de coloração escura, que não produzem resinas e não possuem anéis de crescimento distintos na maioria das espécies. Em geral, as madeiras duras possuem densidade aparente maior que as madeiras macias, mas essa não é uma regra.
- **Madeira de reação**: é uma madeira anormal presente em galhos e em troncos de árvores inclinadas e tortas, sendo formada por estímulos mecânicos e pela ação da gravidade, além de ser influenciada por características genotípicas (Vidaurre et al., 2013). Essa madeira apresenta anéis de crescimento assimétricos, considerando a comparação diametralmente oposta de cada anel, sendo um recurso utilizado pela árvore para neutralizar sua inclinação, como uma tentativa de se endireitar. As gimnospermas formam "madeira de compressão" na face inferior do tronco inclinado, onde o crescimento radial incrementa (Figura 5). Por outro lado, nas angiospermas o maior crescimento radial ocorre na face superior do tronco inclinado, formando uma "madeira de tensão".

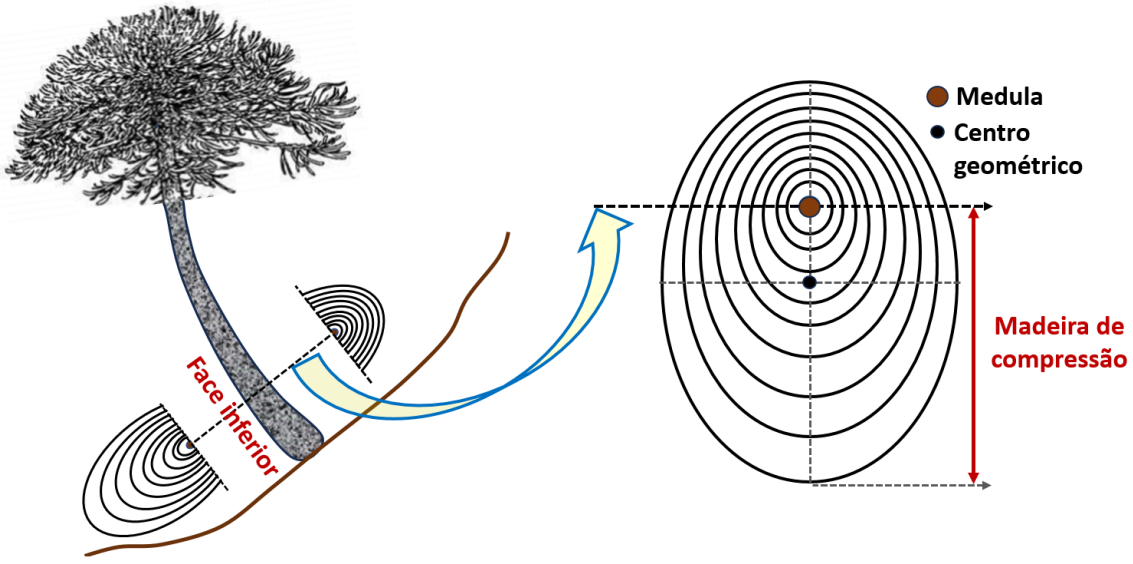


Figura 5. Madeira de compressão em tronco inclinado de *Araucaria angustifolia* em um terreno declivoso.

Ilustração: Sérgio Ricardo Silva

- **Madeira de compressão em gimnospermas**: é uma madeira de reação formada nas faces inferiores de galhos e troncos inclinados, caracterizada por cor mais escura, aparência vítrea, elementos vasculares mais curtos e anéis de crescimento relativamente mais largos e excêntricos (Figura 5). Esta madeira "empurra" o tronco inclinado para cima, permitindo-o recuperar sua orientação vertical. Ela apresenta propriedades mecânicas e composição química de menor qualidade industrial em comparação à madeira de uma árvore normal.
- **Madeira de tensão em angiospermas**: é uma madeira de reação formada nas faces superiores de galhos e troncos inclinados, apresentando elementos de fibra com paredes mais estreitas e finas, encolhimento longitudinal excessivo e tendência ao colapso, ao secar. Em termos práticos, a madeira de tensão "puxa" o tronco inclinado para cima para manter seu crescimento vertical.
- **Calo**: é um tecido vegetal que se desenvolve ao redor de uma lesão superficial gerada por algum elemento cortante ou praga. Este tecido caloso é composto por um grupo desorganizado de células parenquimáticas com função de cobrir a lesão rápida e eficientemente.
- **Compartimentalização**: é um processo de defesa da árvore para isolar tecidos lesados e, assim, evitar a propagação de patógenos (Shigo, 1984). Tem duas etapas: a) alterações químicas, como a produção e acumulação de substâncias antimicrobianas, para retardar a propagação de organismos fitopatogênicos que se desenvolvem após o ferimento; b) o câmbio forma um tecido protetor (i.e., uma barreira) entre os tecidos lesionados e os novos tecidos formados após o ferimento. Esse processo permite que a árvore continue a crescer apesar da presença de feridas e agentes patogênicos. Deve-se notar que a compartimentalização é diferente da formação de calos; embora o tecido caloso possa crescer sobre uma ferida, ele não cria a barreira capaz de proteger os novos tecidos contra patógenos.

Trado de incremento

O trado de incremento, também conhecido como sonda de Pressler, é a principal ferramenta para coleta de amostras em troncos de árvores para análises dendrocronológicas, sendo também utilizado, com outras finalidades, para a extração de baguetas de toras, postes e outras peças de madeira (Grissino-Mayer, 2003). Esse instrumento de precisão foi desenvolvido na Alemanha por volta de 1855 (Pressler, 1866) e, desde então, sua estrutura e projeto mudaram muito pouco (Schweingruber, 2001). O manuseio adequado e a boa manutenção do trado garantem sua funcionalidade por décadas. Além disso, conhecimentos detalhados de sua estrutura, manutenção e uso são fundamentais para o êxito dos trabalhos do usuário durante a extração de baguetas em árvores, como descrito a seguir.

Componentes do trado de incremento

O trado de incremento possui três componentes principais: cabo (alavanca ou manípulo), sonda (haste oca com ponta roscada com função de broca) e extrator (bandeja para extrair a bagueta do interior da sonda) (Figura 6A). Quando o equipamento não está em uso, o extrator é armazenado no interior da sonda que, por sua vez, é guardada dentro do cabo (Figura 6B), formando uma unidade compacta (Figura 6C).

Fotos: Sérgio Ricardo Silva

Figura 6. Componentes de um trado de incremento: sonda, extrator e cabo (A). Processo de armazenamento da sonda e do extrator no interior do cabo (B), formando uma unidade compacta (C).

Alguns acessórios facilitam o uso, a conservação e a manutenção do trado de incremento, tais como: apoio de trado para iniciação de furo, adaptador de trado para furadeira, estojo porta-sonda e kit para amolar e afiar a broca (Figura 7).

Fotos: Sérgio Ricardo Silva (A); André Wedderhoff (B, C, D)

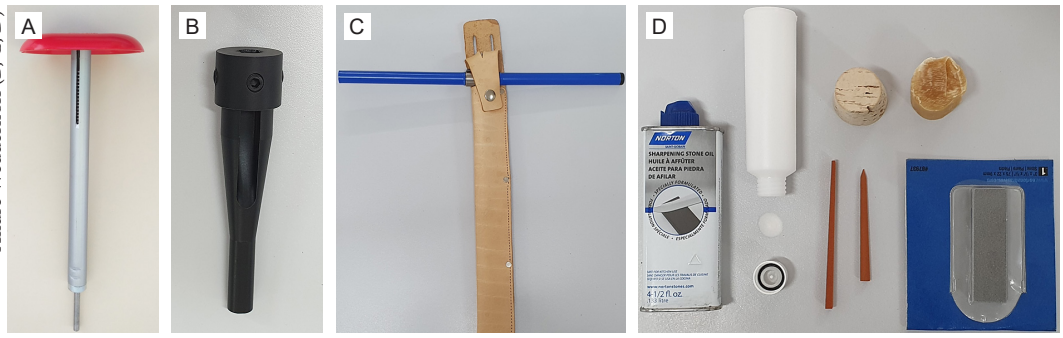


Figura 7. Acessórios de trado de incremento: apoio para iniciação de furo (A), adaptador de trado para furadeira (B), estojo de couro porta-trado (C) e kit para amolar e afiar a broca (D).

Seleção do modelo de trado de incremento

A escolha do modelo de trado de incremento leva em consideração o comprimento, o diâmetro e o tipo de broca da sonda, que devem ser adequados para as condições de uso local:

– **Comprimento da sonda**: está diretamente relacionado ao tamanho da árvore a ser amostrada. Portanto, quanto maior o diâmetro do tronco, maior deverá ser o comprimento da sonda. Em árvores menores, é usual que a amostra de bagueta contemple toda a secção transversal do tronco, passando pela medula. Por outro lado, em árvores maiores, uma opção é extrair duas baguetas nos sentidos diametralmente opostos do tronco, que juntas representarão toda a secção do tronco. Vale destacar que o preço do trado de incremento aumenta muito à medida que se amplia o comprimento da sonda, que varia de 10 a 100 cm, sendo mais comuns no meio científico sondas variando de 30 a 60 cm. Considera-se como "comprimento efetivo" da sonda a porção que pode ser inserida no tronco, ou seja, desde a ponta da broca até o início da expansão circular na outra extremidade (Figura 8).

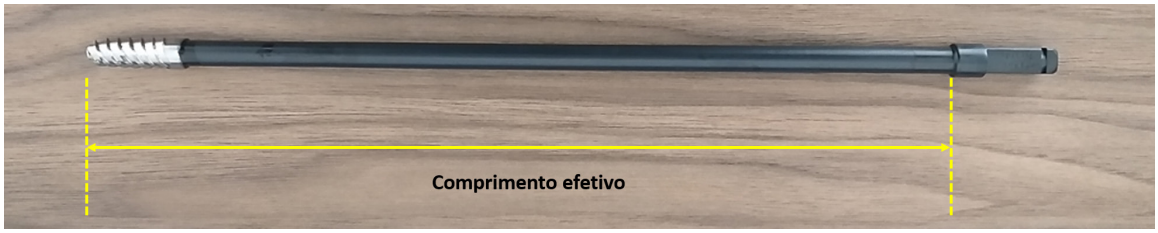


Figura 8. Comprimento efetivo da sonda de um trado de incremento.

– **Diâmetro interno da sonda**: corresponde ao diâmetro efetivo da amostra de madeira que será extraída do tronco. Este diâmetro é medido na abertura localizada na ponta da sonda, ou seja, na região de corte que entrará em contato com a árvore. Vale destacar que o diâmetro aumenta gradualmente dentro da sonda, em direção ao cabo, para que a bagueta não fique atolada (i.e., congestionada) em seu interior (Figura 9A). Os diâmetros de 4,3 e 5,15 mm são utilizados com mais frequência para a maioria das finalidades florestais (Figura 9B). Por sua vez, 5,15 mm é o diâmetro preferido para a sonda utilizada em avaliação de tratamento químico para preservação da madeira. Finalmente, sondas com 8, 10 e 12 mm de diâmetro são mais apropriadas para obtenção de amostras maiores utilizadas para análises de qualidade de madeira (e.g., densidade aparente), estudos químicos e análises das dimensões celulares (Jozsa, 1988). Ressalta-se que, quanto maior o diâmetro da sonda maior será o esforço físico necessário para girar o trado durante a amostragem. Por outro lado, amostras de bagueta com maior diâmetro permitem melhor visualização dos anéis de crescimento e facilitam o estudo anatômico da madeira.

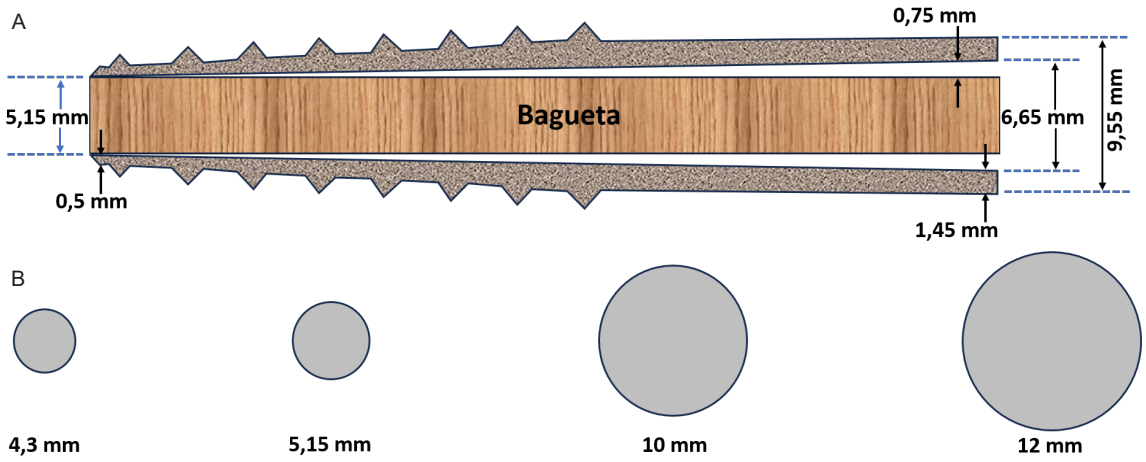


Figura 9. Aumento do diâmetro interno da sonda a partir da ponta de corte (A) e diâmetros internos mais comuns das sondas (B).

Ilustração: Sérgio Ricardo Silva

– **Tipo de broca da sonda**: há brocas com dois ou três fios helicoidais de corte (Figura 10). A escolha é feita considerando a dureza da madeira e a preferência de cada usuário. Brocas com dois fios helicoidais (distanciados em 180º na borda frontal de corte) são ideais para madeiras duras, pois facilitam o início do furo e o processo de girar a sonda no interior do tronco, uma vez que são mais lentas, penetrando o tronco na taxa de 8 mm por rotação. Por outro lado, brocas com três fios helicoidais (com 120° entre si) são mais apropriadas para madeiras macias, cujas amostras de bagueta são retiradas com menor fricção e mais rapidamente (12 mm por rotação), porém, o início do furo na madeira é mais difícil. Ressalta-se que, além da dureza e de propriedades de fricção da madeira, a facilidade de extração da bagueta do tronco da árvore também depende da habilidade e força de cada operador.

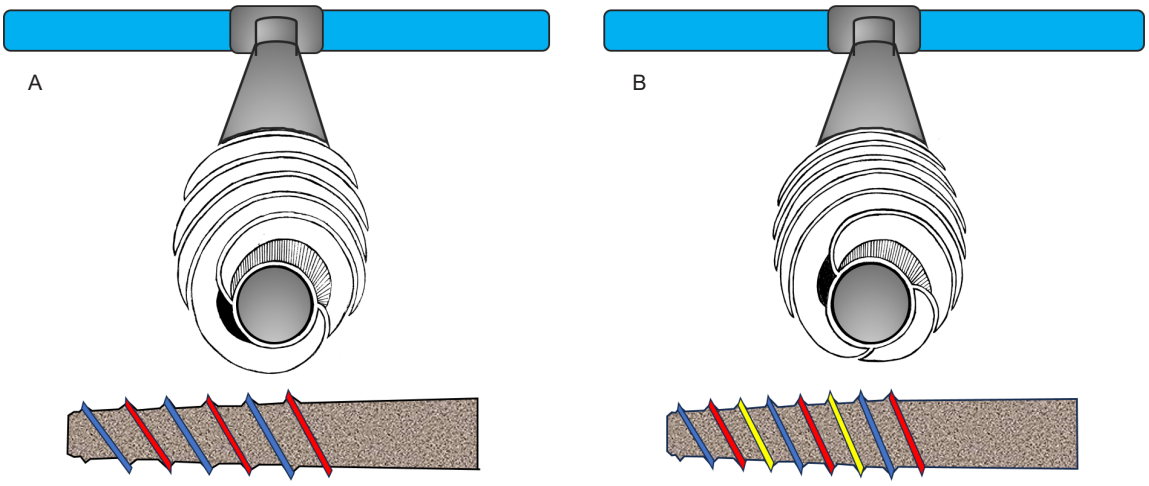


Figura 10. Visualização frontal e lateral de brocas de sondas de trado de incremento com dois (A) e três fios helicoidais (B).
Ilustração: Sérgio Ricardo Silva

Os trados de incremento vendidos no Brasil são importados, sendo que os principais fabricantes estão localizados na Suécia (Haglof), Finlândia (Suunto), Reino Unido (Mattson) e China (Timberline). Deste modo, muitas vezes a escolha por um tipo específico de trado é condicionada por sua disponibilidade no estabelecimento comercial do revendedor autorizado, que geralmente aceita encomendas de outros tipos de trados para importação do fabricante. O usuário também pode realizar a compra direta de revendedores internacionais, mas precisa estar atento às questões alfandegárias, como restrições, tarifas e impostos.

Manutenção e cuidados para conservação do trado de incremento

Os trados de incremento, de diferentes marcas e modelos, são fabricados com materiais de alta resistência. Além disso, a sonda é geralmente revestida com Teflon (politetrafluoretileno) que favorece o uso em condições de alta fricção, inerentes ao processo de extração de baguetas de árvores. Este revestimento reduz o atrito com a madeira, protege a sonda contra oxidação (i.e., ferrugem) e a mantém limpa. No entanto, para manter a eficiência e ampliar a vida útil do trado, o usuário precisa adotar alguns cuidados, tais como:

– **Lubrificação e limpeza**: a cera de abelha é geralmente utilizada, antes de cada perfuração, para revestir os fios de corte helicoidais da broca. Isto facilita a inserção e a retirada da sonda do tronco da árvore, pois reduz a fricção e aumenta a capacidade de deslizamento dos componentes metálicos em contato com a madeira. Por sua vez, o lubrificante WD-40 é excelente para a limpeza do trado, pois previne a oxidação

dos elementos metálicos, reduz o atolamento de madeira no interior da sonda e diminui o som incômodo de rangido durante a tradagem (Jozsa, 1988). Além disso, este produto remove a seiva que entrou em contato com a sonda, evitando a sua oxidação ácida. Recomenda-se que, ao final de um dia de trabalho, ou várias vezes ao dia em caso de amostragens em árvores resinosas, o WD-40 seja pulverizado dentro e fora da sonda, além de cobrir toda a superfície do extrator. A seguir, utilizar uma estopa limpa ou outro tecido absorvente para concluir a limpeza e retirar o excesso do produto. Em algumas situações, se ainda permanecerem resíduos aderidos no trado, esfregar suavemente uma lã de aço muito fina (código: #000) juntamente com WD-40 para remover estes resíduos do extrator e das superfícies externa e interna da sonda. Neste caso, deve-se ter cuidado para não esfregar a lã de aço nos fios de corte da broca, pois, o contato de qualquer metal sobre estes fios pode torná-los "cegos" ou com menor capacidade de corte. Finalmente, realizar uma nova limpeza do trado com um tecido limpo e absorvente. Outro cuidado importante é evitar a lubrificação do exterior do cabo do trado de incremento com WD-40, porque é necessário segurá-lo firmemente durante o processo de perfuração do tronco.

- **Remoção da sonda da árvore**: para reduzir a possibilidade de atolamento da sonda no interior do tronco, é fundamental retirá-la o mais rápido possível após a extração da amostra de bagueta. O orifício aberto no tronco reduz gradualmente de diâmetro, relativamente em curto espaço de tempo, por ação da própria árvore. Assim, atenção especial deve ser despendida nesta atividade, de modo a evitar trabalho adicional ou mesmo a perda da sonda.
- **Afiação e amolamento das estruturas de corte da broca**: os trados de incremento mais recentes são produzidos com materiais cortantes de alta resistência, sendo eficientes no processo de perfuração de centenas de troncos, por décadas. No entanto, se mal manejados ou em contato com pedras e objetos de alta dureza, podem ocorrer danos diversos que tornam os fios helicoidais e a ponta da broca com baixa capacidade de corte, pois ficam "cegos" ou chanfrados. Uma broca está "cega" quando ela não é capaz de iniciar com facilidade o corte da madeira. Nestas situações é necessário amolar e/ou afiar estas estruturas de corte. São vendidos kits de afiação (i.e., para desgastar a parte arredondada que perdeu o corte) e amolamento (i.e., tornar o fio de corte reto novamente) especialmente desenvolvidos para brocas de trados de incremento (Figura 7D); mas também é possível utilizar outras ferramentas e produtos convencionais encontrados no mercado. De forma sumária, as principais etapas deste processo são: a) amolar a ponta da broca com uma pedra de amolamento plana, para eliminar as irregularidades; b) afiar internamente o fio de corte da ponta da broca, com auxílio de uma pedra cônica que é inserida dentro da ponta oca da broca; c) afiar externamente o fio de corte da ponta da broca, com uma pedra afunilada; e d) afiar individualmente os fios de corte helicoidais com auxílio de uma pedra do tipo "indiana". É fundamental o uso de óleo lubrificante nestas pedras, durante as etapas de afiação e amolamento. Por ser um processo meticuloso, que requer alta precisão, pode ser conveniente contratar um profissional habilitado capaz de realizar esta prestação de serviço. Outra recomendação é sempre levar para o campo vários trados de incremento, pois, se houver danos nos elementos de corte em algum deles, haverá equipamentos sobressalentes. Maiores detalhes sobre o processo de afiação e amolamento da broca de um trado de incremento podem ser consultados no trabalho de Grissino-Mayer (2003).
- **Armazenamento da sonda dentro do cabo**: ao retirar e guardar a sonda dentro do cabo, cuidado especial deve ser despendido para evitar que os fios de corte da broca toquem a borda do orifício do cabo ou qualquer parte dele, pois, sendo metálico, pode danificar os elementos cortantes da broca, tornando-os cegos. Inicialmente, proteja a broca com a palma da mão e deposite-a cuidadosamente no interior do orifício do cabo e, a seguir, deslize o restante da sonda, sem soltá-la, até que ela atinja o fundo do compartimento (Figura 6B). Deve-se cuidar para não pressionar a palma da mão contra os fios de corte da broca, de modo a evitar ferimentos na pele.
- **Armazenamento do trado**: quando não estiver sendo utilizado, todos os componentes do trado devem estar limpos, secos e lubrificados antes de seu armazenamento em local adequado.

- **Desentupimento da sonda**: quando ocorrer o atolamento de uma amostra de madeira dentro da sonda, nunca tente inserir um material metálico (e.g., bandeja extratora, prego, vergalhão etc.) na ponta da broca da sonda para empurrar a amostra congestionada, pois isto certamente danificará a borda cortante. Às vezes, basta inserir uma cavilha ou lápis de madeira de menor diâmetro e pressioná-los contra o material obstruído. Se isto não funcionar, tentar retirar a amostra atolada a partir da parte de trás da sonda, utilizando um kit com brocas finas e longas especialmente desenvolvido para esta finalidade, que é facilmente encontrado em lojas de ferramentas para construção. Em alguns casos, é melhor levar a sonda para uma oficina com torno mecânico, para fixar a sonda e facilitar o processo de desobstrução.
- É importante tratar o trado de incremento como uma ferramenta de precisão, de alto valor, protegendo-o de qualquer objeto que possa danificá-lo, principalmente seus elementos cortantes. Por isso, mesmo durante o caminhamento entre as árvores, guardar a sonda e o extrator dentro do cabo. Manter o interior do cabo sempre limpo e livre de areia, pequenas pedras ou outros objetos que podem criar entalhes na ponta da broca ou nos fios helicoidais, o que geralmente acontece quando a sonda é deslizada para dentro ou para fora do cabo. Outro cuidado importante a tomar é não amostrar árvores com suspeita de conterem pregos ou outros elementos metálicos inseridos no tronco. Finalmente, nunca martelar o cabo durante o processo de tradagem no tronco. Até mesmo uma pressão exagerada do trado sobre o tronco pode danificar os fios de corte da broca.
- Cuidado adicional deve ser atribuído à bandeja extratora durante o processo de amostragem. Evite colocá-la sobre o solo ou vegetação ao redor da árvore que está sendo amostrada, pois é muito fácil perdê-la de vista e pisoteá-la, causando seu dobramento e, consequentemente, sua inutilização. Sempre guarde a bandeja dentro de uma bolsa resistente ou a insira no bolso de trás da calça. Além disso, sugere-se amarrar uma fita brilhante e colorida (preferencialmente de cor amarelo ou vermelho) no orifício posterior da bandeja para melhorar sua visualização, em caso de deixá-la cair acidentalmente em algum lugar, principalmente em meio à vegetação (Figura 11).

Fotos: Sérgio Ricardo Silva

Figura 11. Bandeja extratora identificada com fita brilhante e colorida (A) para melhorar sua visualização em meio à vegetação (B, C).

Quando o trado de incremento é utilizado em larga escala, para amostragens em grande número de árvores, o processo de tradagem pode demandar grande esforço muscular, especialmente para a retirada de baguetas com maior diâmetro e comprimento em madeira que apresenta alta densidade. Neste caso, é interessante utilizar alguns acessórios a serem adaptados à sonda para facilitar o trabalho de tradagem, como furadeiras elétricas equipadas com baterias portáteis, que podem aumentar o rendimento operacional em até três vezes, quando comparado com a amostragem manual convencional (Krottenthaler et al., 2015; Kagawa; Fujiwara, 2018; Caetano-Andrade et al., 2021). No entanto, o uso destas furadeiras exige cuidado e perícia do usuário, de modo a não danificar os anéis de crescimento mais externos do tronco.

Método de amostragem de baguetas

A seguir serão descritas as principais etapas do método utilizado para a amostragem de baguetas em árvores nativas de araucária, particularmente daquelas localizadas em áreas de preservação ambiental. Este método contempla procedimentos operacionais utilizados pela comunidade científica internacional para diversas espécies florestais, com alguns ajustes para a araucária, validados pela equipe de pesquisa da Embrapa Florestas. Vale destacar que baguetas extraídas adequadamente das árvores resultam em amostras de melhor qualidade, o que é fundamental para a acurácia e precisão das determinações dendrocronológicas; além de poupar tempo, esforços humanos e recursos financeiros.

Critérios para escolha da árvore e do local no tronco para extração da bagueta

Evitar retirar baguetas em árvores que possuem madeira de reação. Por exemplo, uma árvore de araucária inclinada na direção norte apresentará madeira de compressão neste lado (Figura 5). Caso se realize a amostragem de bagueta nesta madeira de compressão, a sonda pode ficar congestionada dentro do tronco devido à pressão emitida pela madeira comprimida. Por outro lado, caso se opte por retirar a bagueta no lado sul, a perfuração será realizada em madeira cuja largura dos anéis de crescimento pode não representar adequadamente a árvore. Neste caso exemplificado, se não houver a possibilidade de substituir a árvore a ser amostrada, recomenda-se perfurar o tronco no sentido leste-oeste.

Em áreas de encosta, a bagueta deve ser extraída em ângulo reto (90°) em relação ao sentido da declividade do relevo, ou seja, seguindo a direção das curvas de nível. Árvores crescendo nestas condições, mesmo estando eretas, geralmente apresentam madeira de reação na direção da declividade, o que é causado pela ação de ventos fortes, irregularidades do terreno, dentre outros fatores. Essas árvores exibem crescimento excêntrico, onde a maioria dos anéis de crescimento estarão concentrados na porção do tronco voltada para o lado de cima da declividade, no caso de espécies do grupo de gimnospermas (Figura 5). Assim, quando for amostrar uma araucária, é importante considerar que o centro da medula da árvore estará deslocado para cima, em relação à direção da inclinação do terreno.

Quando a finalidade da amostragem é estimar a idade da árvore, extrair a amostra de bagueta na altura do DAP (1,3–1,4 m) é raramente justificável. O correto é extrair a bagueta o mais próximo possível do nível do solo, pois é onde a secção transversal do tronco apresenta o maior número de anéis de crescimento, que decresce em direção ao ápice da árvore (Figura 3B) (Grissino-Mayer, 2003). Para este propósito, alguns pesquisadores têm utilizado a adaptação de uma catraca entre o centro do cabo e o fim da sonda, o que permite movimentos de meia volta durante a perfuração do tronco. Também há cabos modificados que facilitam o movimento giratório do trado mais próximo ao solo, como o Quad-B *(Brown's bent boomerang borer handle*), desenvolvido pelo pesquisador Peter Brown, que possui forma de bumerangue (Brown, 2007).

Sempre inserir a sonda no tronco na região com tecido saudável e sem nós, pois o objetivo é amostrar todos os anéis de crescimento que refletem o crescimento radial do tronco ao longo dos anos.

É fundamental incluir uma fina porção de casca na amostra de bagueta para preservar todos os anéis de crescimento, o que aumentará a acurácia do método de estimativa de idade da árvore. Esta casca também é importante para mostrar onde se inicia o primeiro anel de crescimento a partir da porção mais externa do tronco.

Uma dúvida recorrente é sobre quantas amostras retirar de cada árvore e em que locais. Isto depende do delineamento experimental e da necessidade de cada pesquisador. Em geral, apenas uma amostra desde a casca até a medula do tronco é o suficiente. No entanto, duas amostras retiradas em 180° proporcionam melhor acurácia nas avaliações dendrocronológicas, pois resultam na amostragem de todo o transecto do tronco, passando pela medula.

Fritts e Swetnam (1989) apresentam considerações adicionais sobre escolhas de árvores, espécies e locais para amostragens com fins dendrocronológicos.

Procedimentos para extração de bagueta com trado de incremento

A seguir é apresentado um passo a passo operacional para a extração de uma amostra de bagueta do tronco de uma árvore por meio de um trado de incremento:

- Retire a sonda e o extrator do interior do cabo. Coloque o extrator dentro do bolso de seu colete ou calça para protegê-lo contra danos e facilitar sua localização.
- Acoplamento da sonda no cabo: abra o trinco de bloqueio do cabo (Figuras 12A e 12B); insira a ponta quadrada da sonda dentro do cabo (Figuras 12C e 12D); e retorne o trinco de bloqueio para a posição de fechamento, envolvendo e travando o colar da ponta da sonda (Figura 12E).

Fotos: Sérgio Ricardo Silva

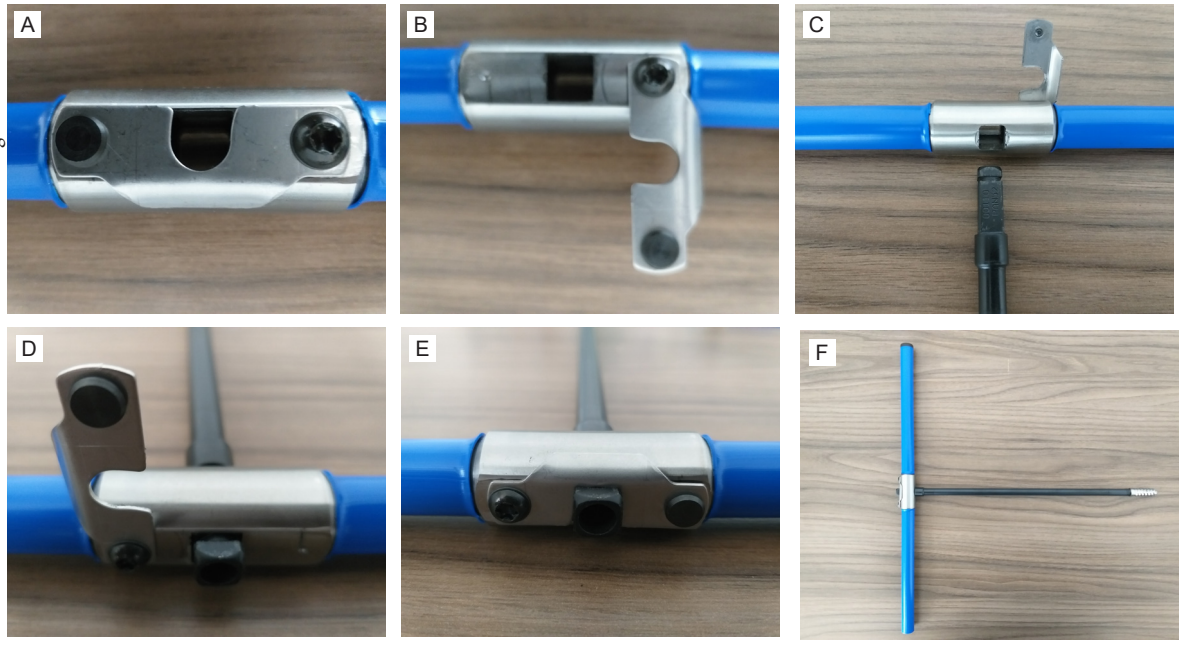


Figura 12. Etapas de acoplamento da sonda no cabo de um trado de incremento: abertura do trinco de bloqueio (A, B); inserção da ponta quadrada da sonda dentro do cabo (C, D); travamento do trinco de bloqueio em torno do colar da ponta da sonda (E, F).

- Após o acoplamento da sonda no cabo, o trado de incremento estará pronto para uso (Figura 12F). Para facilitar o processo de perfuração do tronco, sugere-se aplicar uma fina camada de cera de abelha sobre os fios helicoidais da ponta da broca.
- Antes de iniciar o processo de perfuração, é importante alinhar adequadamente o trado no tronco da árvore. O primeiro alinhamento da sonda é em direção à medula da árvore, que nem sempre está no centro geométrico do tronco. Assim, uma maneira prática para melhorar este alinhamento é utilizar um galho da árvore como guia, pois os galhos geralmente apontam em direção ao centro da medula (Figura 13A). Há outra técnica para estimar a direção em relação ao centro da medula, mas ela demanda a retirada prévia de outra amostra de bagueta na mesma árvore, como descrito por Phipps (1985).
- Também é fundamental que a sonda do trado esteja alinhada em ângulo reto (90°) em relação ao eixo longitudinal do tronco (Figuras 13B e 13D). Se houver qualquer desalinhamento da sonda (Figuras 13C e 13E), haverá uma distorção na interpretação dos anéis de crescimento visualizados na bagueta, gerando resultados equivocados na estimativa da taxa de crescimento da árvore. Por exemplo, se o alinhamento apresentar um desvio de 5° (i.e., ângulos de 85° ou 95°), os anéis de crescimento na bagueta se tornarão um pouco mais largos.

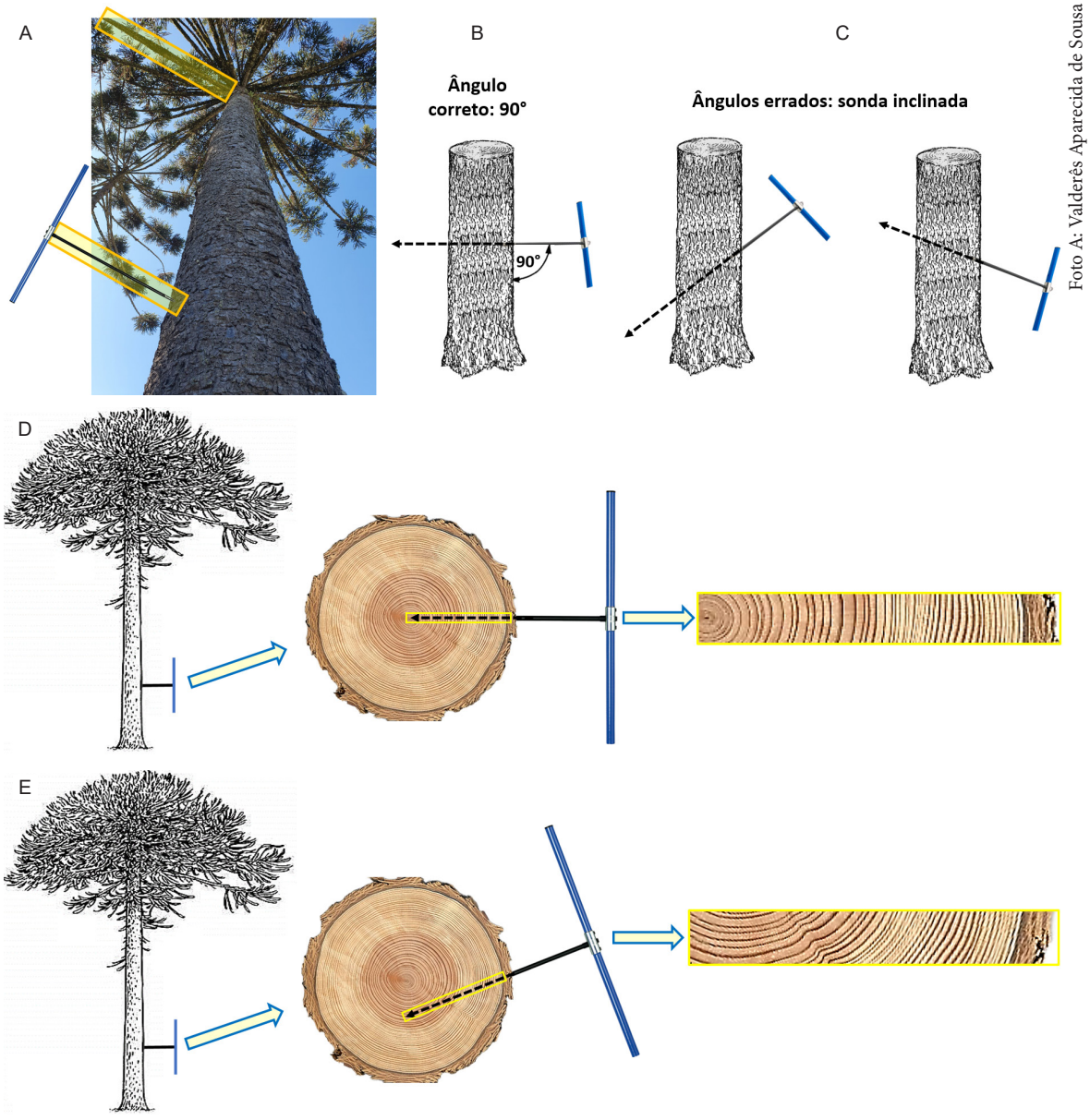


Figura 13. Utilização de um galho de *Araucaria angustifolia* como guia de alinhamento da sonda de um trado de incremento em direção à medula, previamente à perfuração para extração de bagueta (A). Exemplos de alinhamentos em ângulo reto de uma sonda em relação ao tronco da árvore (B, D) e de desalinhamentos (C, E).

Ilustração: Sérgio Ricardo Silva

– Para iniciar a perfuração, a ponta da broca deve ser posicionada contra o tronco da árvore, em algum local onde a casca seja bem fina ou, de preferência, dentro de alguma fenda natural na casca, ou dentro de um orifício superficial aberto com um formão reto chanfrado, porém, deixando uma película de casca para também ser amostrada. A seguir, com uma das mãos sobre a sonda, manter a broca sobre o local exato onde será iniciado o furo e, com a outra mão sobre a parte mediana do cabo, girá-lo suavemente em sentido horário ao mesmo tempo em que se aplica uma pressão moderada (Figura 14A), até que os fios helicoidais da broca penetrem a madeira em quantidade suficiente (± 3 cm) para que a sonda se mantenha firme no tronco da árvore, sem o auxílio das mãos (Figura 14D). Destaca-se que a tentativa de incluir uma casca espessa, durante a tradagem do tronco, pode ocasionar o congestionamento e a torção da amostra dentro da sonda, cuja desobstrução é geralmente difícil, mas pode ser realizada com o uso de algumas técnicas especiais, como aquelas propostas por Tyminski (2011).

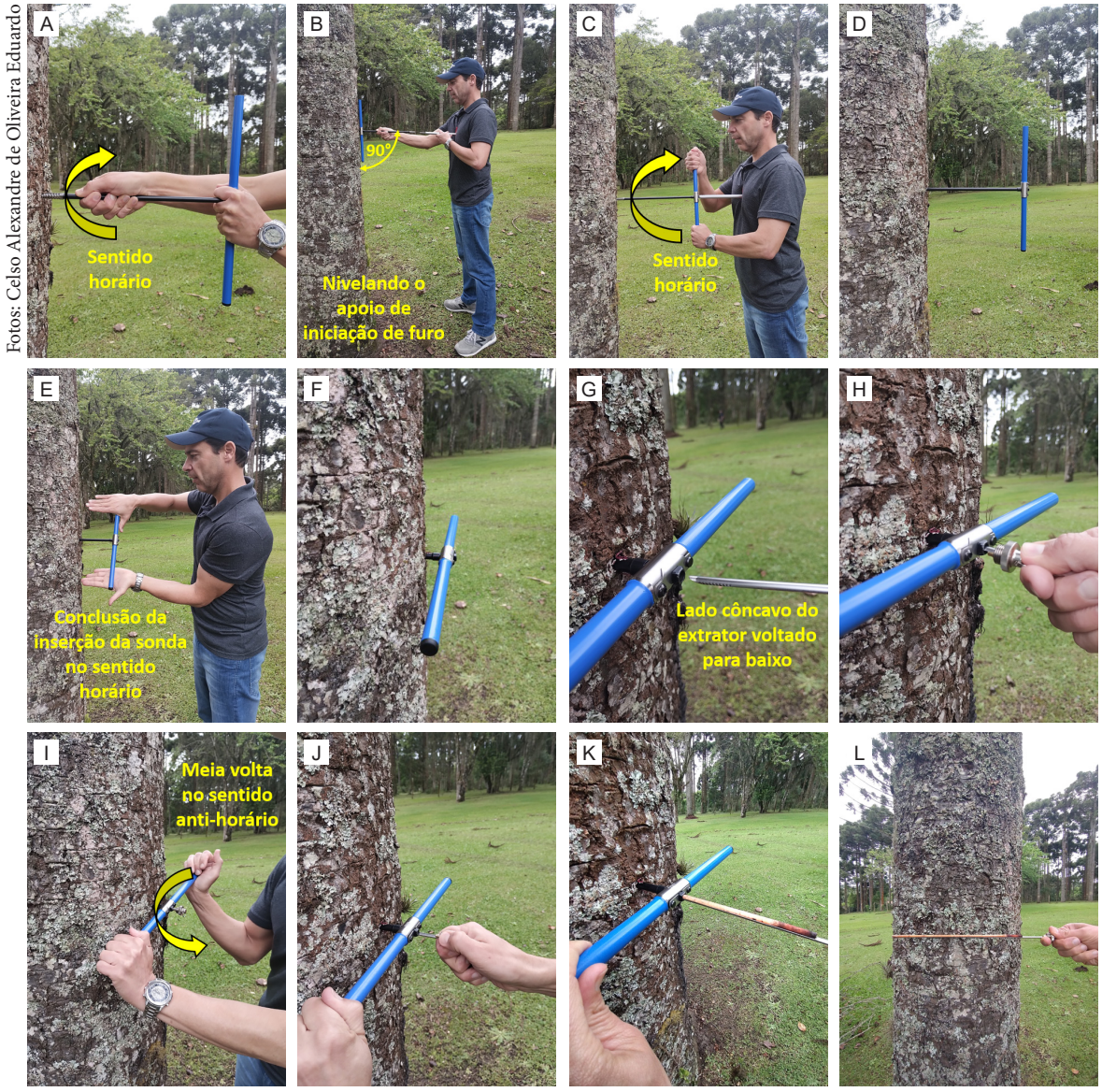


Figura 14. Estágios de perfuração do tronco de uma árvore com o trado de incremento para retirada de bagueta: início do furo no sentido horário, com uma mão sobre a sonda e a outra mão sobre a parte central do cabo (A) ou, alternativamente, com ambas as mãos sobre o cabo, com auxílio do "apoio para iniciação de furo" (B, C), até estabilização da sonda na árvore (D); rotação do cabo com ambas as mãos até conclusão do processo (E, F); inserção do extrator dentro da sonda com o lado côncavo voltado para baixo (G, H); giro do cabo por meia volta no sentido anti-horário (I); retirada da bagueta do interior da sonda (J, K, L).

– O restante da perfuração, até a profundidade desejada (geralmente até o centro da medula), é realizado com ambas as mãos nas extremidades do cabo, mantendo as palmas preferencialmente abertas durante o movimento no sentido horário, sendo recomendado não aplicar pressão da sonda sobre o tronco (Figuras 14E e 14F). Durante todo o processo, manter a sonda bem alinhada em relação ao tronco (em ângulos retos), de modo a evitar o corte de uma amostra torta, o que pode ocorrer devido a movimentos "para cima e para baixo" ou "de um lado para o outro". Para estimar a profundidade já perfurada em direção ao centro da árvore, basta subtrair do comprimento total da sonda a porção que estiver externa ao tronco. No entanto, isto só é válido se não houver congestionamento da amostra dentro da sonda, como será discutido mais adiante. Deve-se notar que, em árvores com menor diâmetro do tronco, a perfuração

pode ser realizada ao longo de toda a secção transversal, caso o comprimento da sonda seja suficiente para amostrar completamente esse diâmetro (Figura 14L).

– Uma alternativa às duas etapas anteriores é iniciar a perfuração do tronco com ambas as mãos nas extremidades do cabo, quando se dispõe do acessório "apoio para trado para iniciação de furo" (Figuras 7A e 14B). Neste caso, a pressão inicial da sonda sobre o tronco é proporcionada pela região peitoral da pessoa, enquanto as mãos ficam livres para girar o cabo (Figura 14C). Esta pressão é realizada desde o início do furo até a broca da sonda penetrar aproximadamente 3 cm na madeira, quando o "apoio para trado" se torna desnecessário. Deve-se notar que a utilização deste acessório ajuda a evitar a torção ou destruição dos primeiros anéis de crescimento localizados de 1 a 2 cm sob a casca, pois estabiliza a sonda, mantendo-a devidamente alinhada, sem oscilações de direção que poderiam ser causadas por uma mão trêmula segurando diretamente a sonda.

– Concluída a perfuração da árvore, deslizar o extrator no interior da sonda, com o lado côncavo voltado para baixo e sobre a bagueta (Figuras 14G e 14H), até atingir o final da amostra, o que é percebido pela resistência que impede a continuidade do deslocamento do extrator. A seguir, girar o cabo em 180° (meia volta) no sentido anti-horário (Figura 14I), o que promoverá a ruptura da extremidade da amostra, no ponto de sua ligação com a árvore. Então, puxar cuidadosamente o extrator até sua completa retirada do interior da sonda (Figuras 14J, 14K e 14L). A amostra de bagueta estará voltada para cima, posicionada sobre a calha da bandeja, sendo retida neste local por meio de pequenas garras serrilhadas ("dentes") localizadas na ponta do extrator (Figura 6A). Algumas vezes esta amostra pode estar quebrada em pedaços que, geralmente, estarão unidos em sequência sobre a calha da bandeja. Neste contexto, uma amostragem bem conduzida, com uma sonda limpa e uma broca bem afiada e amolada, via de regra resulta em uma amostra reta, sólida e em peça única. Recomenda-se retirar a bagueta de dentro da sonda na brevidade possível, pois a amostra de madeira tende a inchar com o passar do tempo, podendo ficar congestionada dentro da cavidade da sonda. Não tentar inserir toda a extensão da bandeja extratora dentro da sonda, respeitando o limite indicado pela resistência ao atingir o final da amostra. Caso se exceda este limite, a bandeja pode dobrar e, sendo bastante frágil, ela pode ser danificada.

– Imediatamente após a retirada do extrator com a bagueta, deixe-os protegidos em um lugar próximo, com a bagueta voltada para cima. Priorize a remoção da sonda do tronco da árvore, girando o cabo no sentido anti-horário, com ambas as mãos. Se perceber que o cabo está girando livremente sem recuo para o exterior, é sinal que os fios helicoidais da broca não estão engajados na madeira. Neste caso, puxar o cabo com força moderada enquanto estiver girando-o, até que os fios da broca penetrem na madeira e, a partir de então, o cabo poderá ser apenas girado, sem puxá-lo, até a completa remoção da sonda. Cuidado para não tocar a broca com as mãos imediatamente após a retirada da sonda da árvore, pois ela pode estar muito quente devido à sua fricção com a madeira. A rápida remoção da sonda é importante para evitar seu congestionamento no tronco, pois a árvore tende, com o passar do tempo, a exercer cada vez mais pressão na região perfurada, devido a um processo de dilatação da madeira na tentativa de fechar o orifício aberto em sua estrutura. Caso a sonda fique presa na árvore, é preciso utilizar um mini guincho manual com catraca, comumente utilizado para apertar os fios de uma cerca de arame. Este processo de remoção, que exige perícia do usuário, é descrito detalhadamente por Grissino-Mayer (2003).

– Na sequência, com auxílio de um estilete ou tinta, fazer uma pequena marca na parte mais externa da amostra (i.e., aquela mais próxima da casca), para que, no laboratório, as avaliações sejam realizadas na mesma posição em que a amostra estava na árvore. A seguir, retirar com cuidado a bagueta da calha da bandeja, transferindo-a para o interior de um canudo de papel ou plástico, para o transporte seguro da amostra. No entanto, recomenda-se evitar os canudos de plástico, pois a bagueta pode mofar em seu interior. Por outro lado, os canudos de papel permitem a secagem da bagueta, evitando o mofo. Esses canudos de papel geralmente possuem 42 cm de comprimento e 6 mm de diâmetro, permitindo o acondicionamento adequado de baguetas com 4,3 ou 5,15 mm de diâmetro. Lembrar de identificar o canudo da amostra

com uma etiqueta, escrevendo o nome da espécie, data, local (com coordenadas geográficas), número da parcela experimental etc. Os canudos podem ser transportados no interior de um tubo telescópico porta-mapas, ou tubo de PVC com tampas, para evitar danos às amostras. Recomenda-se abrir pequenos orifícios nas tampas desses tubos para permitir a passagem de ar, de modo a evitar a formação de câmara úmida e, consequentemente, o mofo nas amostras.

- Finalmente, realizar o desacoplamento da sonda no cabo do trado de incremento, ou seja: abrir o trinco de bloqueio; retirar a ponta quadrada da sonda de dentro do cabo; e travar novamente o trinco. Limpar cuidadosamente a sonda e o extrator, e acondicioná-los dentro do cabo.
- Observação: o atolamento (i.e., congestionamento) da sonda dentro do tronco pode ser ocasionado por amostra quebrada, casca ou nó do tronco, madeira apodrecida etc. Portanto, quando perceber uma mudança significativa em tensão enquanto estiver perfurando a madeira, deve-se parar imediatamente e retirar a sonda do tronco. Essa mudança de tensão pode ser exemplificada assim: quando a broca da sonda atinge uma porção apodrecida da madeira, ficará muito fácil girar o cabo no processo de tradagem. Por outro lado, se a broca entrar em contato com um nó, isto exigirá maior força para girar o cabo. Em ambos os casos, a amostra pode torcer no interior da sonda e ficar atolada, dificultando sua posterior retirada com a bandeja extratora. Portanto, suspender a amostragem antes de chegar a este ponto crítico. Para avaliar se a amostra está torcendo e/ou atolando dentro da sonda basta conferir o comprimento da amostra a cada 5–10 giros do cabo. Para isso, inserir a bandeja extratora no interior da sonda até que ela toque a ponta externa da amostra. Então, colocar o dedo polegar sobre o ponto da bandeja no final da sonda, remover a bandeja do interior do equipamento e, a seguir, sobrepor a bandeja com a parte externa da sonda (que está fora da árvore). Ambos os comprimentos devem ser iguais, ou seja: a parte da bandeja que foi inserida dentro da sonda = a parte da sonda que ainda está no exterior da árvore. No entanto, se a amostra estiver sendo comprimida (atolando) dentro da sonda, o primeiro comprimento será maior. Neste caso, parar imediatamente a tradagem, inserir a bandeja sobre a amostra até alcançar o final da sonda, girar o cabo em 180° no sentido anti-horário e retirar a bandeja com o pedaço da amostra que estiver atolada.

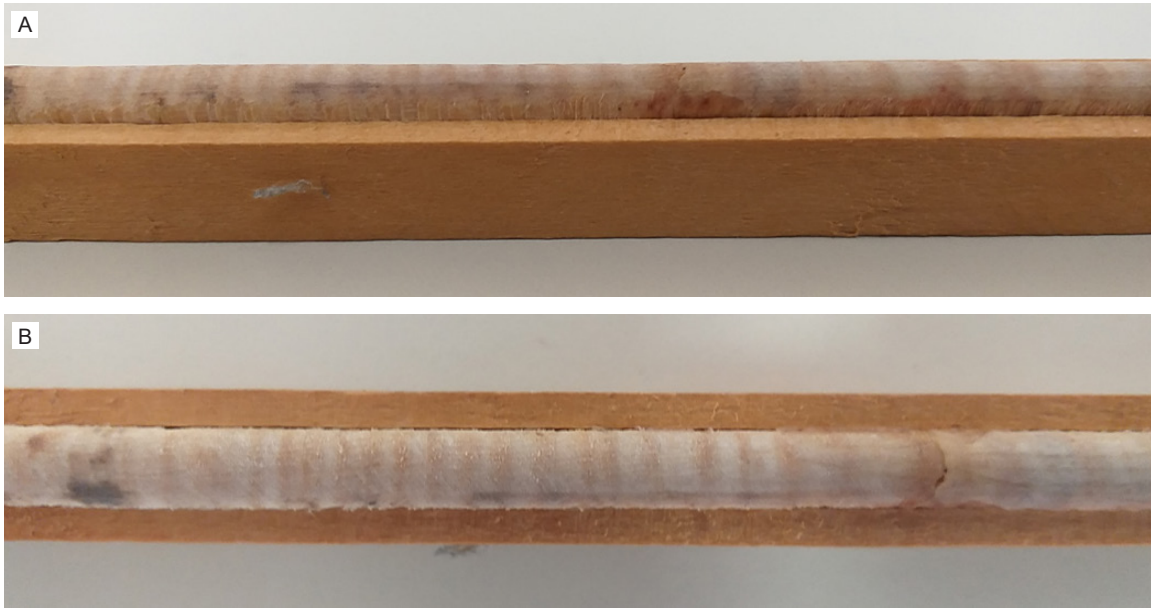
Preparo de amostra de bagueta para análise de anéis de crescimento

Ao retornar ao laboratório, deixar a bagueta recém-amostrada secar ao ar por vários dias, antes de montá-la sobre um suporte de madeira anatômico, especialmente desenvolvido para acondicioná-la (Figura 15). É importante que essa montagem não seja realizada com a amostra ainda úmida, pois ela encolhe depois de perder umidade e pode quebrar sobre a canaleta do suporte caso seja colada antes de secar adequadamente.

Há alguns detalhes a serem observados durante a montagem de uma bagueta sobre o suporte, para permitir boa visualização dos anéis de crescimento, inclusive em nível de estrutura celular, por meio de microscópio ou imagem digital. A qualidade desta visualização celular é particularmente importante para distinguir os "falsos anéis" de crescimento [i.e., bandas interanuais de madeira tardia (*late wood*)] (Figura 16).

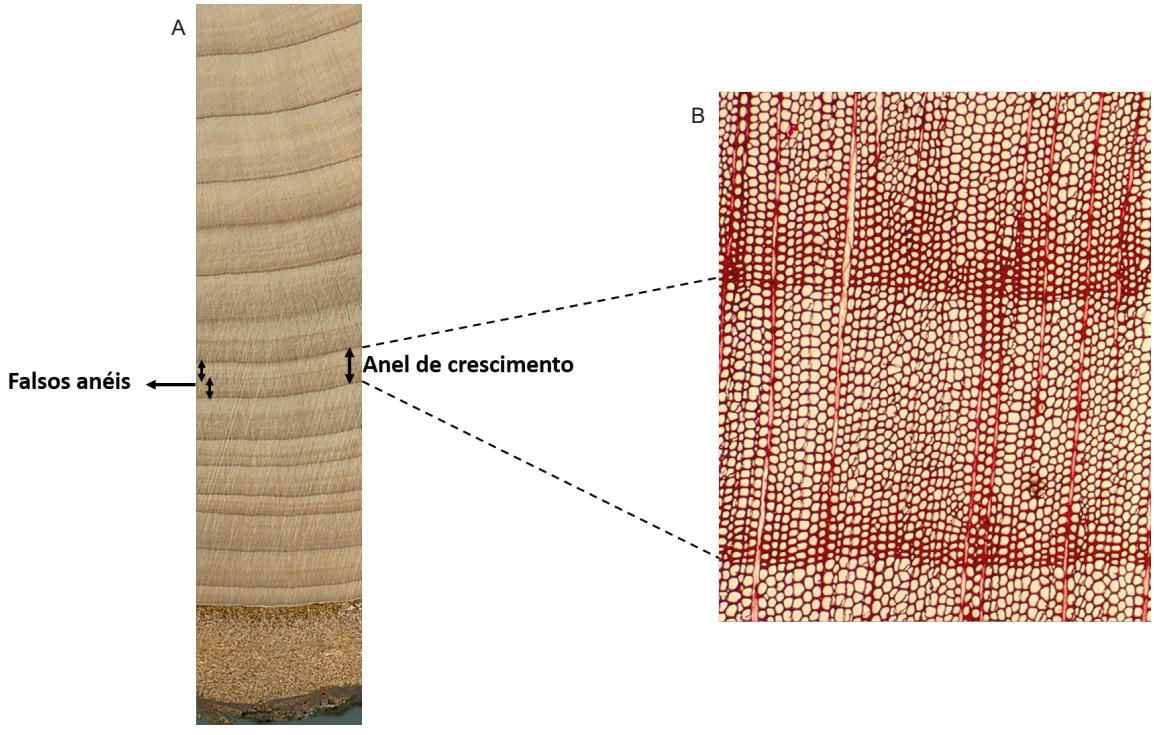
A seguir serão apresentadas algumas informações práticas para auxiliar uma boa montagem da bagueta no suporte e/ou a visualização celular dos anéis de crescimento.

- **Qualidade da amostra de bagueta**: uma amostragem bem-feita no tronco da árvore é fundamental para que os anéis de crescimento fiquem perpendiculares ao campo de visão após a colagem da bagueta no suporte (Figura 17A). Assim, amostras torcidas, quebradas, ou provenientes de perfurações desalinhadas (i.e., não realizadas em ângulo reto com o tronco), resultam em baixa qualidade de alinhamento dos anéis de crescimento (Figura 17B). Em caso de amostras torcidas, é possível endireitá-las direcionando um jato de vapor comprimido sobre toda a extensão da bagueta. Após alguns minutos de exposição ao vapor, com auxílio dos dedos, destorcer delicadamente a amostra em todo o seu comprimento.



Fotos: Sérgio Ricardo Silva

Figura 15. Bagueta de *Araucaria angustifolia* acondicionada em suporte de madeira, no formato de calha, com detalhes da vista lateral (A) e superior (B).



Fotos: Paulo Cesar Botosso

Figura 16. Anéis de crescimento e "falsos anéis" de *Araucaria angustifolia*, vistos por meio de macrofotografia (A) e microfotografia (B).

Fonte: Botosso (2011)

Fotos: Sérgio R. Silva

Figura 17. Anéis de crescimento alinhados entre si em ângulo reto (A) e desalinhados (B), provenientes de baguetas extraídas de tronco de *Araucaria angustifolia*.

– **Suporte de madeira para bagueta**: o suporte pode ser feito cortando uma tira de madeira geralmente com comprimento entre 40 e 50 cm (de acordo com o padrão de amostras de bagueta do laboratório e diâmetro do tronco), 2 cm de altura e com largura ±6 mm superior ao diâmetro da bagueta (e.g., para uma amostra de 4,3 mm de diâmetro, cortar uma tira de madeira com ±10,3 mm de largura). A seguir, utilizando uma túbia equipada com fresa em formato em "U", fazer um sulco arredondado do tipo "meia cana" (com largura um pouco superior ao diâmetro da bagueta) ao longo da extensão da tira de madeira (Figura 18). É um trabalho relativamente simples para um marceneiro. Recomenda-se construir um suporte individual para cada bagueta (e não um suporte coletivo para várias amostras), pois, às vezes é necessário comparar duas amostras pareadas lado a lado, dentre aquelas coletadas.

Fotos: Sérgio Ricardo Silva

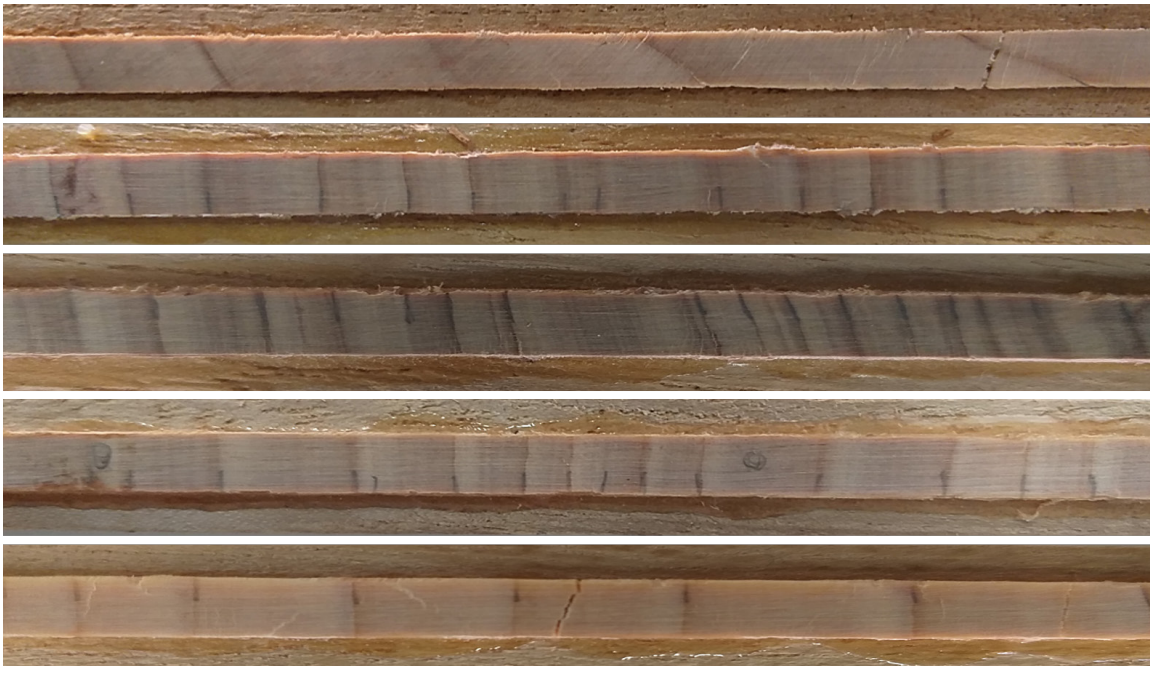
Figura 18. Suportes de madeira simples (A) e duplo (B) contendo sulco arredondado do tipo "meia cana", para acondicionamento de baguetas. Vista lateral (C) e superior (D) do suporte simples.

– **Posicionamento e identificação da bagueta no suporte**: a bagueta deve ser montada sobre o suporte exatamente como ela foi retirada da árvore, ou seja, identificar no suporte as duas extremidades da amostra: aquela mais próxima da casca (i.e., mais externa) e a outra mais próxima da medula do tronco (i.e., mais interna). Este critério é imprescindível, considerando que, durante a análise em microscópio, a pessoa geralmente inicia a observação dos anéis mais externos em direção àqueles mais internos, com a amostra orientada verticalmente em relação ao campo de visão. Adicionalmente, registrar no suporte o nome da espécie, a data e o local de amostragem (com coordenadas geográficas), dentre outras informações que identifiquem a amostra.

– **Colagem da bagueta sobre o suporte de madeira**: recomenda-se que se utilize cola branca solúvel em água para colar a bagueta no suporte. Isto é importante, pois, se for necessário refazer a montagem, basta imergir o conjunto em água durante algumas horas até dissolver a cola. Vale lembrar que, neste caso, a amostra de bagueta deve ser novamente seca ao ar durante alguns dias antes de uma nova colagem.

Nos casos de amostras fragmentadas, é preciso utilizar fita adesiva para prender cada fragmento no suporte antes da imersão em água, para evitar que os fragmentos de bagueta boiem na água e sejam misturados, dificultando a remontagem.

- **Aplainamento e lixamento da superfície da bagueta**: esta etapa é fundamental para melhorar a visualização dos anéis de crescimento e sua estrutura celular. O primeiro passo é aplainar a superfície da bagueta com uma plaina manual ou elétrica, até ficar bem alinhada paralelamente com a face superior do suporte, porém sem atingi-la, reservando aproximadamente 1 mm de espessura da bagueta para o processo de lixamento. A seguir, com auxílio de uma lixadeira de cinta ou lixas manuais, fazer o acabamento final da superfície da amostra. É recomendado o uso de uma série de lixas, começando com uma de grão 220, depois grão 320 e, finalmente, grão 400, ou seja, da granulometria mais grossa para a mais fina. Alguns pesquisadores realizam um enceramento da superfície lixada com cera de carnaúba ou similar. Ao final do processo, a amostra estará pronta para análise com auxílio de uma lupa ou microscópio (Figura 19).
- **Contagem e mensuração dos anéis de crescimento**: geralmente é realizada uma marcação manual de cada anel de crescimento, com base na observação visual auxiliada por uma lupa. A seguir é mensurada a largura de cada anel por meio de equipamentos e softwares especialmente desenvolvidos para esta finalidade, como o LinTab™ (Figura 20) e o TSAP-Win™, respectivamente, que resultam em precisão de 0,01 mm (Rinn, 1996; Canetti et al., 2016). Finalmente, a acurácia da datação cruzada (*cross-date*) pode ser verificada com o software Cofecha (Holmes, 1983), que compara, ano a ano, as larguras dos anéis de crescimento do conjunto de árvores amostradas.
- **Observação dos anéis de crescimento no microscópio**: para uma melhor visualização dos anéis de crescimento e de sua estrutura celular, recomenda-se utilizar uma lente ocular de 10× (e não de 15 ou 20×) e um zoom entre 0,7 e 4×, atingindo uma faixa de aumento entre 7 e 40×, suficiente para este tipo de observação.



Fotos: Sérgio Ricardo Silva

Figura 19. Baguetas de *Araucaria angustifolia* acondicionadas em suportes de madeira e devidamente aplainadas, lixadas e enceradas, para posterior análise dos anéis de crescimento.

Foto: Sérgio Ricardo Silva

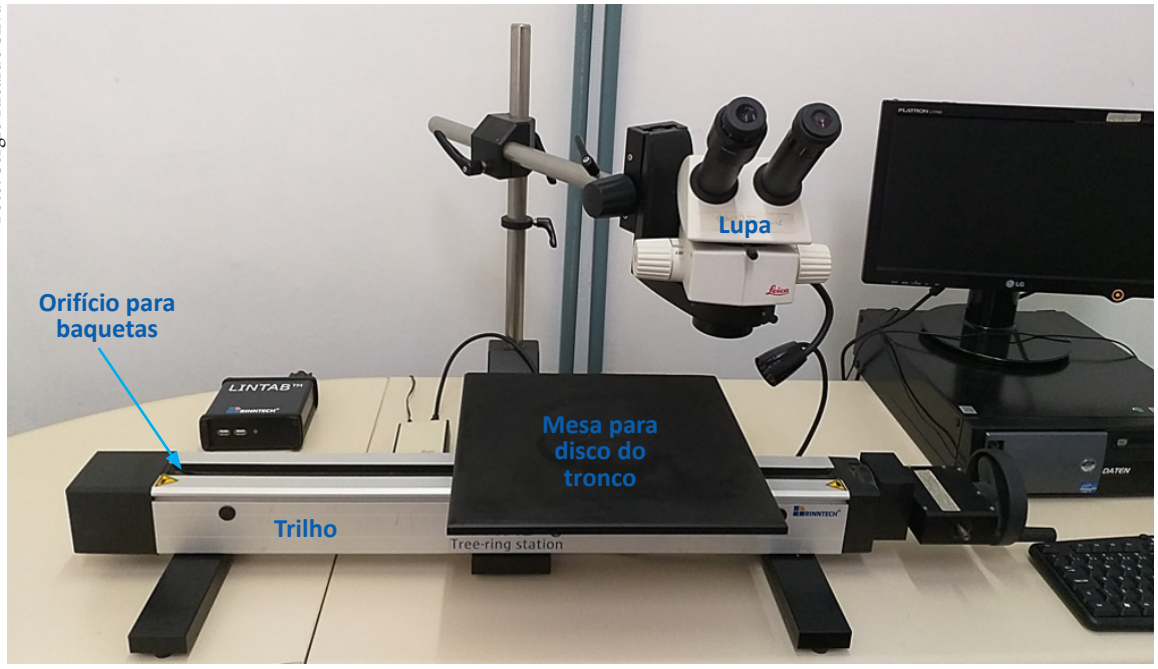


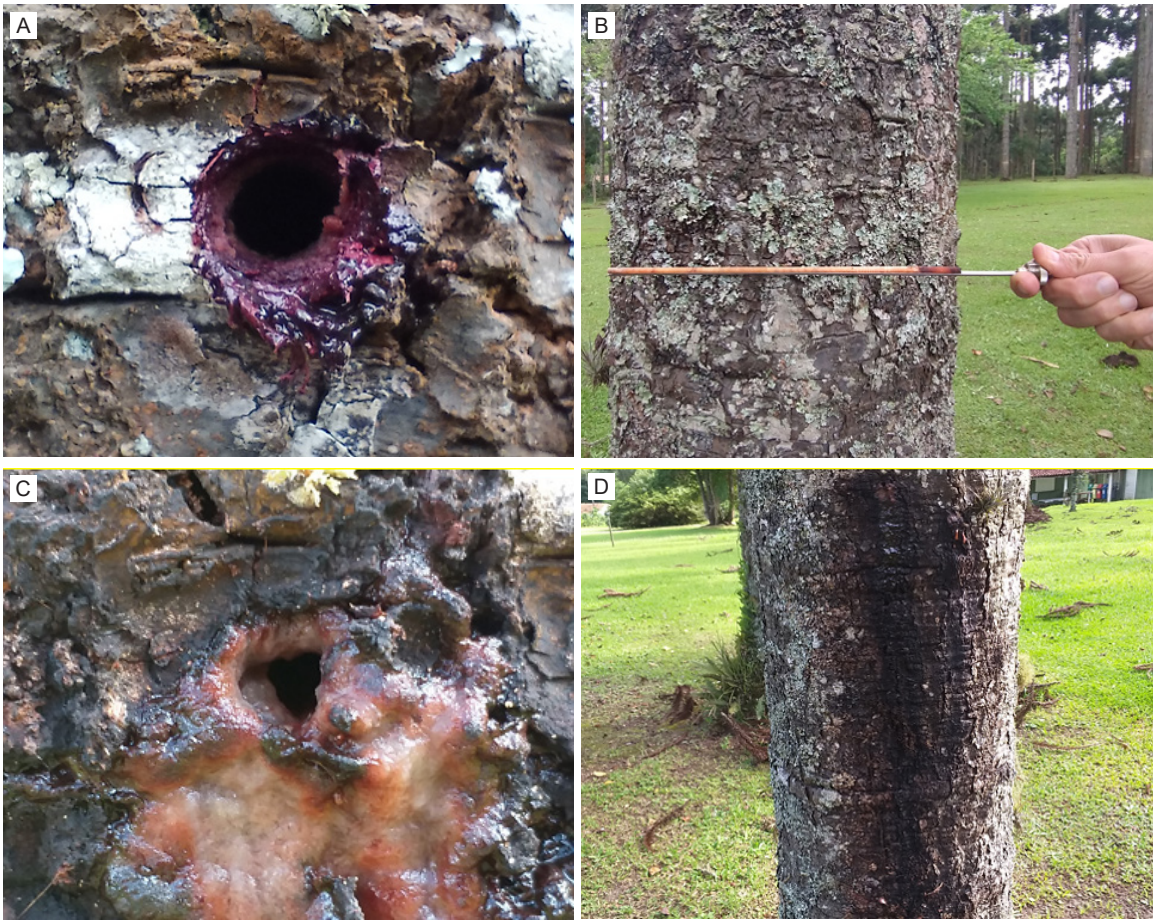
Figura 20. Sistema LinTab™ utilizado para mensuração da largura de anéis de crescimento em amostras de bagueta ou disco do tronco de *Araucaria angustifolia*.

Cuidados com a integridade e sanidade das árvores amostradas

Uma dúvida comum ao se extrair uma bagueta: será que a perfuração do tronco com o trado de incremento causa alguma injúria na árvore? Ainda não há consenso entre os cientistas sobre este tema, especialmente considerando efeitos de longo prazo (Fay; Berker, 2018). Na maioria das vezes, a árvore se curará rapidamente, com o fechamento do pequeno orifício aberto em seu tronco (Figura 21), de modo similar ao que acontece quando se realiza uma desrama ou poda, cujo local cortado "cicatriza" em poucos dias. No entanto, se esta preocupação for grande para um grupo especial de árvores, como as ancestrais ou raras, deve-se repensar se é realmente necessário realizar esta amostragem de bagueta ou se há outras alternativas para atingir o objetivo da pesquisa.

A maioria dos estudos relatam que a perfuração do tronco com trado de incremento não produziu impactos negativos sobre a taxa de crescimento, capacidade reprodutiva da árvore, resistência do tronco e risco de morte, particularmente para coníferas, que apresentam melhor habilidade para compartimentalizar o tecido afetado e rapidamente preencher com resina o orifício aberto no tronco (e.g., Campbell, 1939; Hepting et al., 1949; Shigo, 1984; Chave et al., 2006). Entretanto, há determinados trabalhos que reportam significativas injúrias nas árvores, algumas vezes fatais, diretamente associadas a esta técnica de amostragem (e.g., Lorenz, 1944; Hepting et al., 1949; Clark, 1966; Florens, 2013, 2014; Fay; Berker, 2018). Infelizmente, a quantidade de informação disponível sobre este assunto é muito escassa e restrita a um pequeno conjunto de estudos, desenvolvidos principalmente para espécies de clima temperado. Esta incerteza sobre os impactos da amostragem de baguetas sobre a sanidade de árvores foi discutida por Tsen et al. (2016), que alertaram sobre a importância de considerar caso-a-caso a decisão sobre realizar ou não a amostragem.

Uma forte limitação dos trabalhos científicos sobre este assunto se refere ao curto prazo das avaliações após a extração das baguetas, usualmente menores que 1 a 2 anos. Considerando que algumas espécies podem viver centenas de anos, os danos ocasionados pela tradagem na madeira precisam ser melhor investigados por maior período de tempo. Fay e Berker (2018) reportaram que a formação de um calo obstruindo o orifício criado pela retirada da amostra não pode ser igualado à "cicatrização" ou cura do tecido lesado, pois injúrias causadas pela ação da broca da sonda podem ser de longo prazo. Por exemplo, a passagem da sonda através de um tecido doente, compartimentalizado em uma região do tronco, pode espalhar os patógenos para toda a extensão do



Fotos: Celso Alexandre de Oliveira Eduardo (A, B); Sérgio Ricardo Silva (C, D)

Figura 21. Orifício aberto em tronco de *Araucaria angustifolia* (A) durante a extração de uma bagueta com 5,15 mm de diâmetro (B) com uso de trado de incremento. Mesmo orifício cinco meses após a amostragem (C) e aspecto do tronco escurecido devido ao escorrimento de resina durante este período (D).

orifício aberto na madeira, amplificando os danos. Além disso, à medida que a broca perfura a madeira, surgem microfissuras em várias direções e extensões no tecido vegetal que circunda a estrutura metálica da broca, o que pode causar danos à árvore.

Assim, é importante que se utilize a técnica de amostragem de baguetas considerando os riscos inerentes ao processo, particularmente para um espécimen raro e de alto valor. Variações observadas na capacidade de recuperação de uma árvore amostrada também estão associadas à combinação entre genética (i.e., características inatas) e variáveis ambientais (Tsen et al., 2016). Por exemplo, a combinação de fortes estresses ambientais, como uma seca prolongada, agindo sobre uma árvore debilitada (i.e., que esteja com baixa capacidade de defesa natural contra injúrias naturais) pode dificultar sua recuperação após perfurada com um trado de incremento. Por outro lado, árvores saudáveis em ambientes que permitem expressivo crescimento das plantas, usualmente curam suas feridas mais rapidamente, isolando o orifício aberto no tronco contra a deterioração.

Estudos fitopatológicos requerem cuidado especial, pois os microrganismos (bactérias e fungos) podem ser transportados entre árvores por meio do trado de incremento (Grissino-Mayer, 2003).

Dentre os cuidados com a integridade e sanidade das árvores submetidas à extração de baguetas, pode-se destacar:

– Os fios helicoidais e a ponta da broca devem estar bem afiados e amolados, de modo que o orifício aberto no tronco seja reto e sem fissuras ou lascamentos, o que facilitará o processo de recuperação da árvore, com o fechamento natural do orifício.

- Para reduzir a propagação de doenças entre árvores é recomendado, a cada amostragem, imergir o trado de incremento dentro de solução de álcool etílico 70% (70° INPM), ou mesmo o uso de fungicidas e bactericidas. No entanto, a eficiência desta técnica apresenta limitações, pois é temporária e não contempla toda a diversidade de patógenos (Lorenz, 1944). Assim, em locais com suspeita de presença de agentes fitopatogênicos danosos, a amostragem de baguetas deve ser estritamente controlada, de modo a evitar a disseminação de doenças entre as árvores.
- Retirar o mínimo possível de baguetas por árvore, de preferência restritas da casca até a medula, evitando amostrar toda a secção transversal do tronco. Quanto maior for a extensão dos orifícios abertos, maior será a probabilidade de ocorrerem infecções nos tecidos lesionados. Para a maioria dos trabalhos científicos, uma amostra por tronco é o suficiente, exceto para estudos dendroclimáticos que usualmente requerem um mínimo de duas amostras para cada árvore (Norton, 1998).
- Recomenda-se aguardar um período de 5 a 6 anos entre duas amostragens consecutivas em uma mesma árvore, de modo a evitar maiores danos no tronco.
- Após retirar a bagueta, não se recomenda preencher o orifício aberto no tronco com nenhum material (inclusive com a própria bagueta), pois, ao limitar as trocas gasosas, isto pode causar mais danos do que benefícios à árvore, além de dificultar o processo de compartimentalização contra agentes fitopatogênicos.

Considerações finais

Baguetas de alta qualidade são a base para análises dendrocronológicas precisas. Portanto, o conteúdo apresentado neste capítulo auxilia a evitar os principais problemas durante o processo de amostragem, quais sejam: a) amostras quebradas e com superfície áspera, devido ao uso de brocas com fios de corte cegos; b) torção ou destruição dos anéis de crescimento mais externos durante o início do processo de tradagem, nos primeiros 1 a 2 cm sob a casca, geralmente ocasionadas pela imperícia da pessoa ao manusear o trado, como mãos trêmulas, mudanças bruscas de direção da broca etc.; c) descoloração e/ou apodrecimento de amostras devido ao armazenamento inadequado das baguetas.

A preservação da integridade dos fios de corte da broca do trado de incremento, quanto ao amolamento e afiamento, é a principal medida para evitar amostras quebradas e/ou com a superfície áspera e esfarrapada, além do atolamento da bagueta no interior da sonda. Portanto, o bom treinamento do usuário é fundamental para que ele saiba manejar adequadamente este instrumento de precisão e realizar manutenções preventivas e reparadoras.

Vários problemas com o trado e com a bagueta podem ser evitados com a escolha adequada da árvore a ser amostrada. Portanto, se houver suspeitas de que o tronco contenha tecido deteriorado (apodrecido ou atacado por cupins ou brocas) ou qualquer objeto metálico (e.g., pregos, farpas, grampos etc.) inserido na madeira, é recomendado não usar o trado de incremento nessa árvore.

À medida que o usuário adquire experiência com o uso do trado de incremento, ele desenvolve uma maior percepção de problemas ocorrendo durante a amostragem de uma bagueta. Por exemplo, sons estranhos ao tradar o tronco podem indicar que a broca atingiu alguma madeira de compressão ou que está ocorrendo um atolamento no interior da sonda. Portanto, uma pessoa experiente é geralmente mais perspicaz e eficiente no processo de amostragem do que um novato.

Um princípio básico para melhorar a precisão das avaliações dendrocronológicas é realizar a datação cruzada, ou seja, a avaliação simultânea de anéis de crescimento de árvores vizinhas (Phipps, 1985; Sheppard et al., 1988). Esta técnica permite identificar anéis ausentes ou falsos que podem ter sido ocasionados por condições climáticas atípicas, como secas prolongadas, chuvas extremas e temperaturas excepcionalmente quentes ou frias.

Referências

ALBIERO-JÚNIOR, A.; VENEGAS-GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ-CATÓN, M.; OLIVEIRA, J. M.; LONGHI-SANTOS, T.; GALVÃO, F.; TEMPONI, L. G.; BOTOSSO, P. C. Edge effects modify the growth dynamics and climate sensitivity of *Araucaria angustifolia* trees. **Tree-Ring Research**, v. 76, n. 1, p. 11-26, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.3959/TRR2018-9.

BIONDI, F. From dendrochronology to allometry. **Forests**, v. 11, artigo 146, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/f11020146.

BOTOSSO, P. C. **Identificação macroscópica de madeiras**: guia prático e noções básicas para o seu reconhecimento. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 65 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 194). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/137126/1/Doc194Papel.pdf. Acesso em: 18 mar. 2024.

BOTOSSO, P. C.; MATTOS, P. P. de. **Conhecer a idade das árvores**: importância e aplicação. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. 25 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 75). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17085/1/doc75.pdf. Acesso em: 10 out. 2023.

BRANDES, A. F. das N.; ALBUQUERQUE, R. P.; LISI, C. S.; LEMOS, D. N. de; NICOLA, L. R. M.; MELO, A. L. F.; BARROS, C. F. The growth responses of *Araucaria angustifolia* to climate are adjusted both spatially and temporally at its northern distribution limit. **Forest Ecology and Management**, v. 487, artigo 119024, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119024.

BROWN, P. M. A modified increment borer handle for coring in locations with obstructions. **Tree-Ring Research**, v. 63, n. 1, p. 61-62, 2007. DOI: https://doi.org/10.3959/1536-1098-63.1.61.

CAETANO-ANDRADE, V. L.; SCHÖNGART, J.; AYALA, W. E.; MELINSKI, R. D.; SILVA, F.; DOBRINDT, R.; ROBERTS, P. Advances in increment coring systems for large tropical trees with high wood densities. **Dendrochronologia**, v. 68, artigo 125860, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.dendro.2021.125860.

CAMPBELL, W. A. **Damage from increment boring**. Washington, DC: Division of Forest Pathology, Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, 1939. 7 p.

CANETTI, A.; MATTOS, P. P. de; BRAZ, E. M.; RICKEN, P.; PELLICO NETTO, S. Retrospective analysis of competition in a forest remnant: a case study of *Podocarpus lambertii* in Araucaria Forest. **Dendrochronologia**, v. 40, p. 43-49, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.dendro.2016.05.003.

CARRER, M. Individualistic and time-varying tree-ring growth to climate sensitivity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, artigo e22813, 2011. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022813.

CARVALHO, P. E. R. Pinheiro-do-Paraná: *Araucaria angustifolia*. In: CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, p. 799-812. (Coleção espécies arbóreas brasileiras, v. 1). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/231760/1/Especies-Arboreas-Brasileiras-vol-1-Pinheiro-do-Parana.pdf. Acesso em: 09 out. 2023.

CHAVE, J.; MULLER-LANDAU, H. C.; BAKER, T. R.; EASDALE, T. A.; STEEGE, H. ter; WEBB, C. O. Regional and phylogenetic variation of wood density across 2456 neotropical tree species. **Ecological Applications**, v. 16, n. 6, p. 2356-2367, 2006. DOI: https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[2356:RAPVOW]2.0.CO;2.

CLARK, F. B. Notes and observations: increment borers cause serious degrade in black walnut. **Journal of Forestry**, v. 64, n. 2, p. 814, 1966. Disponível em: https://academic.oup.com/jof/article-abstract/64/12/814/4672712?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 12 out. 2023.

COOK, E. R.; KAIRIUKSTIS, L. A. **Methods of dendrochronology**: applications in the environmental sciences. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. 351 p.

CURTO, R. de A.; MATTOS, P. P. de; BRAZ, E. M.; PÉLLICO NETTO, S. Growth and retrospective analysis of competition in an overstocked stand of *Araucaria angustifolia*. **Forest Ecology and Management**, v. 483, artigo 118766, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118766.

DOUGLASS, A. E. Dating our prehistoric ruins: how growth rings in trees aid in the establishing the relative ages of the ruined pueblos of the southwest. **Natural History**, v. 21, n. 1, p. 27-30, 1921.

EDVARDSSON, J.; ALMEVIK, G.; LINDBLAD, L.; LINDERSON, H.; MELIN, K-M. How cultural heritage based on dendrochronology can be improved through two-way communication. **Forests**, v. 12, artigo 1047, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/f12081047.

FAY, N.; BERKER, N. **A review of the theory and practice of tree coring on live ancient and veteran trees**. Edinburgh: Scottish Natural Heritage, 2018. 58 p. (Research report, 789). Disponível em: https://www.nature.scot/snh-research-report-789-review-theory-and-practice-tree-coring-live-ancient-and-veteran-trees. Acesso em: 28 mar. 2023.

FLORENS, F. B. V. Research no matter the risks? A reply to Boura et al. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, n. 3, p. 134-135, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.01.006.

FLORENS, F. B. V. Research safeguards protected areas: the important role of governments. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 9, p. 504-505, 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.06.011.

FRITTS, H. C.; SWETNAM, T. W. Dendroecology: a tool for evaluating variations in past and present forest environments. **Advances in Ecological Research**, v. 19, p. 111-188, 1989. DOI: https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60158-0.

GRISSINO-MAYER, H. D. A manual and tutorial for the proper use of an increment borer. **Tree-Ring Research**, v. 59, n. 2, p. 63-79, 2003.

HEPTING, G. H.; ROTH, E. R.; SLEETH, B. Discolorations and decay from increment borings. **Journal of Forestry**, v. 47, n. 5, p. 366-370, 1949. Disponível em: https://academic.oup.com/jof/article-abstract/47/5/366/4708137?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 12 out. 2023.

HOLMES, R. L. Computer-assisted quality control in tree-ring dating and measurement. **Tree-Ring Bulletin**, v. 43, n. 1, p. 69-78, 1983. Disponível em: https://www.ltrr.arizona.edu/~ellisqm/outgoing/dendroecology2014/readings/Holmes_1983.pdf. Acesso em: 11 out. 2023.

JOZSA, L. A. **Increment core sampling techniques for high quality cores**. Vancouver: Forintek Canada Corporation, 1988. 26 p. (Special publication, 30). Disponível em: https://home.cyf-kr.edu.pl//~rlbednar/increment_core_sampling.pdf. Acesso em: 11 out. 2023.

KAGAWA, A.; FUJIWARA, T. Smart increment borer: a portable device for automated sampling of tree-ring cores. **Journal of Wood Science**, v. 64, p. 52-58, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/s10086-017-1668-6.

KROTTENTHALER, S.; PITSCH, P.; HELLE, G.; LOCOSSELLI, G. M.; CECCANTINI, G.; ALTMAN, J.; SVOBODA, M.; DOLEZAL, J.; SCHLESER, G.; ANHUF, D. A power-driven increment borer for sampling high-density tropical wood. **Dendrochronologia**, v. 36, p. 40-44, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.dendro.2015.08.005.

LOIOLA, T. M.; HESS, A. F.; KLEIN, D. R.; KREFTA, S. M.; DALLABRIDA, J. P.; DENEGA, A.; NASCIMENTO, B. Análise dendrocronológica do crescimento de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no planalto serrano de Santa Catarina. **Holos**, v. 35, n. 2, artigo e4927, 2019. DOI: https://doi.org/10.15628/holos.2019.4927.

LORENZ, R. C. Discolorations and decay resulting from increment borings in hardwoods. **Journal of Forestry**, v. 42, n. 1, p. 37-43, 1944. Disponível em: https://academic.oup.com/jof/article-abstract/42/1/37/4706966. Acesso em: 12 out. 2023.

MARCON, A. K.; MARTINS, K. G.; BOTOSSO, P. C.; LONGHI-SANTOS, T.; BLUM, C. T.; GALVÃO, F. Growth ring response of two Atlantic Forest tree species pre- and post-dam operation in Southern Brazil. **Dendrochronologia**, v. 71, artigo 125917, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.dendro.2021.125917.

MATTOS, P. P. de; CURTO, R. de A.; BRAZ, E. M.; PÉLLICO NETTO, S. How do *Araucaria angustifolia* trees grow in overstocked stands? **Dendrochronologia**, v. 74, artigo 125976, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.dendro.2022.125976.

NORTON, D. A. **Impacts of tree coring on indigenous trees**. Wellington: Department of Conservation, 1998. 6 p. (Conservation Advisory Science Notes, 186).

OLIVEIRA, J. R. de; ADENESKY-FILHO, E.; ESEMANN-QUADROS, K. Avaliação do crescimento do lenho de *Araucaria angustifolia* no planalto norte de Santa Catarina. **Floresta**, v. 47, n. 2, p. 155-164, 2017. DOI: https://dx.doi.org/10.5380/rf.v47i2.43134.

PEARL, J. K.; KECK, J. R.; TINTOR, W.; SIEKACZ, L.; HERRICK, H. M.; MEKO, M. D.; PEARSON, C. L. New frontiers in tree-ring research. **The Holocene**, v. 30, n. 6, p. 923-941, 2020. DOI: https://doi.org/10.1177/0959683620902230.

PEDRAZZI, C.; DICK, G.; COLDEBELLA, R.; GENTIL, M.; GIESBRECHT, B. M.; da ROSA, R. C. **Química da madeira**. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Ciências Florestais, 2019. 69 p. Disponível em: https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/370/2021/05/QUIMICA_DA_MADEIRA_19_08_19_final.pdf. Acesso em: 10 out. 2023.

PHIPPS, R. L. **Collecting, preparing, crossdating, and measuring cores**. Reston: United States Geological Survey, 1985. 48 p. (Water-Resources Investigations Report, 85). Disponível em: https://pubs.usgs.gov/wri/1985/4148/report.pdf. Acesso em: 09 out. 2023.

PRESSLER, M. R. Der forstliche zuwachsbohrer neuester construction. **Tharandter Forstliches Jahrbuch**, v. 17, p. 155-223, 1866.

RINN, F. **TSAP – time series analyses presentation**: reference manual (version 3.0). Heidelberg: RinnTech, 1996. 263 p.

SCHWEINGRUBER, F. H. **Dendroökologische holzanatomie**: anatomische grundlagen der dendrochronologie. Berne: Paul Haupt Verlag, 2001. 472 p.

SHEPPARD, P. R.; MEANS, J. E.; LASSOIE, J. P. Cross-dating cores as a nondestructive method for dating living, scarred trees. **Forest Science**, v. 34, n. 3, p. 781-789, 1988. DOI: https://doi.org/10.1093/forestscience/34.3.781.

SHIGO, A. L. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 189-214, 1984. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001201.

SILVA, D. O. da; PRESTES, A.; KLAUSNER, V.; SOUZA, T. G. G. de. Climate influence in dendrochronological series of *Araucaria angustifolia* from Campos do Jordão, Brazil. **Atmosphere**, v. 12, artigo 957, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/atmos12080957.

STEPKA, T. F.; MATTOS, P. P. de; FIGUEIREDO FILHO, A.; BRAZ, E. M.; MACHADO, S. do A. Growth of *Araucaria angustifolia*, *Cedrela fissilis* and *Ocotea porosa* in different locations within the Araucaria Forest in the southern Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 486, artigo 118941, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.118941.

TSEN, E. W. J.; SITZIA, T.; WEBBER, B. L. To core, or not to core: the impact of coring on tree health and a best-practice framework for collecting dendrochronological information from living trees. **Biological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 899-924, 2016. DOI: https://doi.org/10.1111/brv.12200.

TYMINSKI, W. P. Preventing bark-caused increment borer jams: a modified technique for core extraction. **Tree-Ring Research**, v. 67, n. 2, p. 123-126, 2011. DOI: https://doi.org/10.3959/2011-3.1.

VIDAURRE, G. B.; LOMBARDI, L. R.; NUTTO, L.; FRANÇA, F. J. N.; OLIVEIRA, J. T. da S.; ARANTES, M. D. C. Propriedades da madeira de reação. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 1, p. 26-37, 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.4322/floram.2012.041.

WENDLING, I. **Tecnologia de enxertia de *Araucaria angustifolia* para produção precoce de pinhões, com plantas de porte reduzido**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015. 7 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 351). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125311/1/CT-351-Ivar.pdf. Acesso em: 09 out. 2023.

Apoio

ENGIE

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO

CGPE 18853

9 786554 670722