

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 Kaszszén

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 8º e 9º).
- “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).

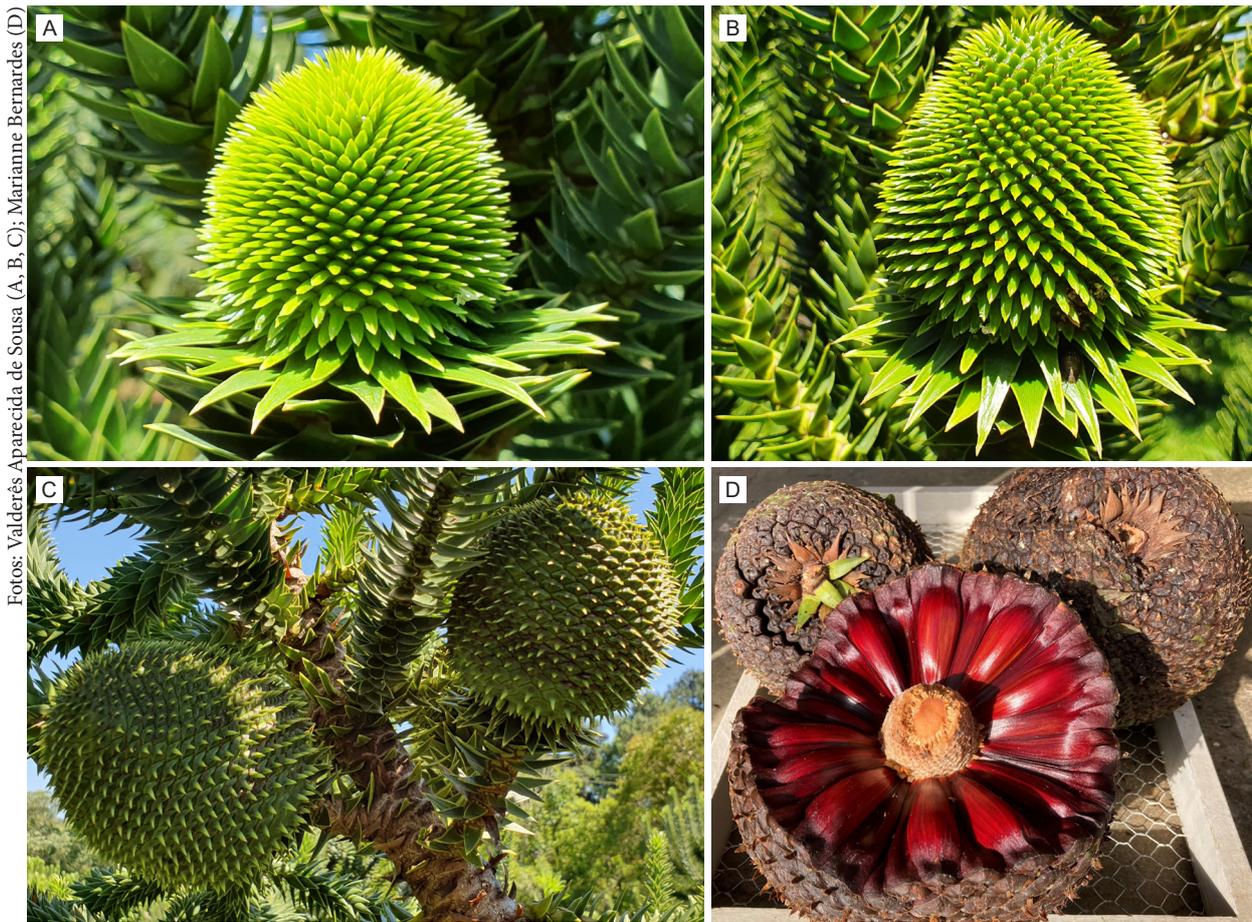


Figura 2. Pinhas de *Araucaria angustifolia* em diversos estádios fenológicos: recém-formada (A); intermediária com ± 12 meses (B); e maduras com ± 24 meses na árvore (C) e depois da queda natural ao chão (D).

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; $\pm 1,30$ 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 estágio (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.



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 progênes. 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 Kaszeszen

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 bloqueante, descensor auto-blocante, polias de aço dupla, mosquetões de aço, corda estática e cordoite (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 bloqueante (G), descensor auto-blocante (H), polia de aço dupla (I), mosquetão de aço (J), corda estática (K), cordoite (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, bloqueante 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.



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).

Fotos: Sérgio Ricardo Silva

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 pólenes provenientes de várias árvores masculinas. Neste contexto, a direção dos ventos pode afetar essa diversidade de pólenes, 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.



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) Valderés 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, conseqüentemente, 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 sementeira:** 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.
- **Sementeira:** 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.

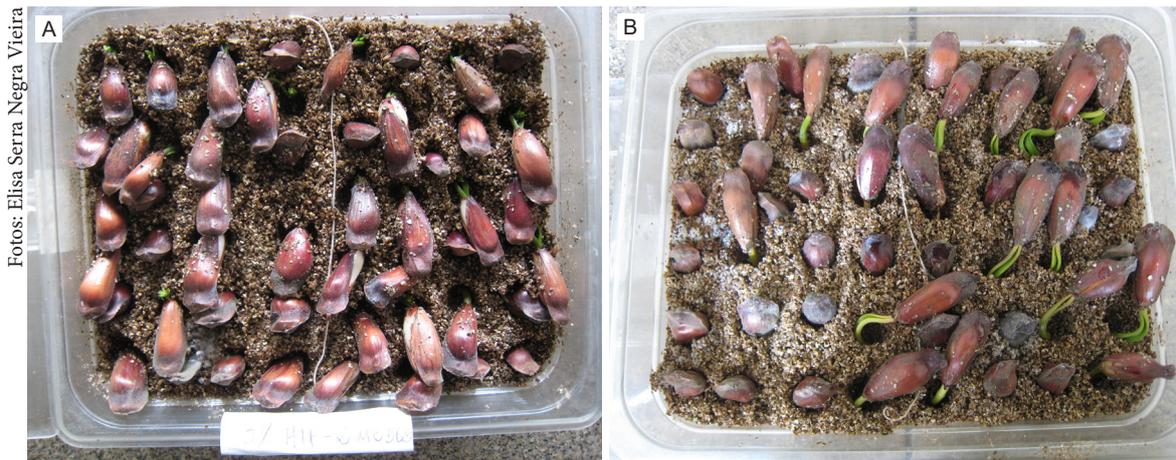


Figura 13. Sementes de *Araucaria angustifolia* inseridas inclinadamente no substrato de areia, com a porção mais fina voltada para baixo (A), para posterior processo de germinação (B) e avaliação da taxa germinativa.

- **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

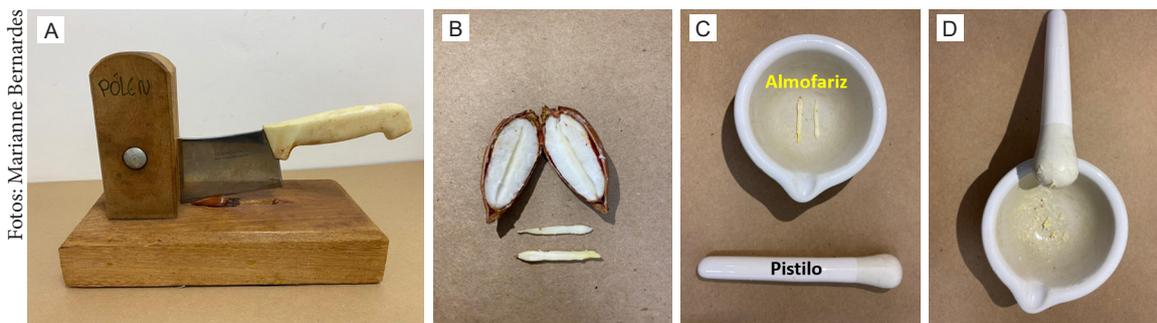
A genotipagem de sementes de araucária por meio de marcadores moleculares possibilita estimar parâmetros genéticos, principalmente aqueles relacionados ao sistema reprodutivo, além de outros atributos biológicos de interesse para estudos de populações naturais de araucária (Stefenon et al., 2008). Vários 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 microsatélites [*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 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 TissueLysar™ 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 angustifolia* 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.
- ÇAÇOLA, 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; MANTOVANI, 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.