

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 Kaszszzen

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.

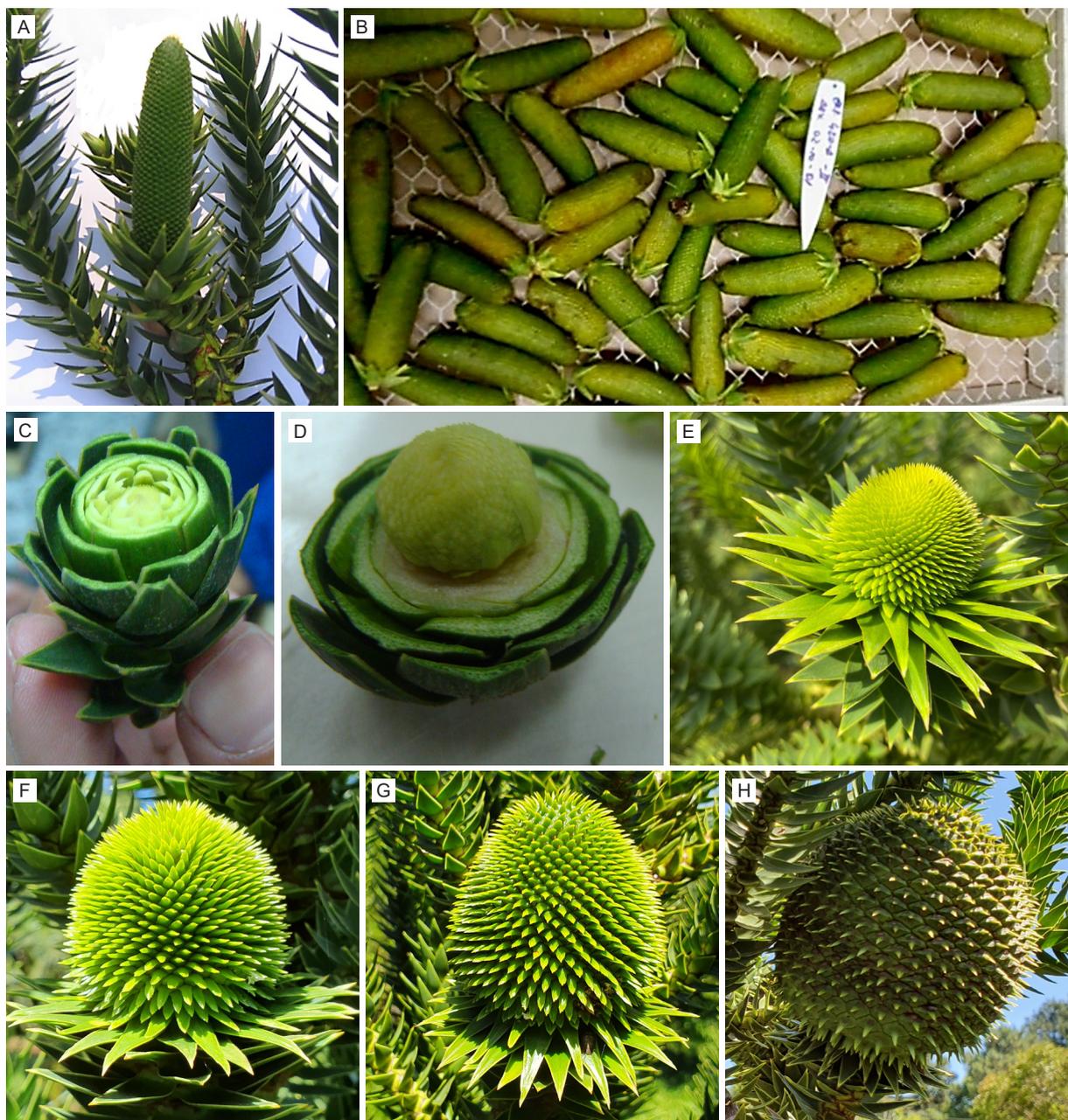
O objetivo deste capítulo é apresentar, detalhadamente, as principais etapas, técnicas e procedimentos para a coleta, manuseio, beneficiamento e armazenamento do pólen de araucária, adotados em programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

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 estágio 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: Valderés 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.

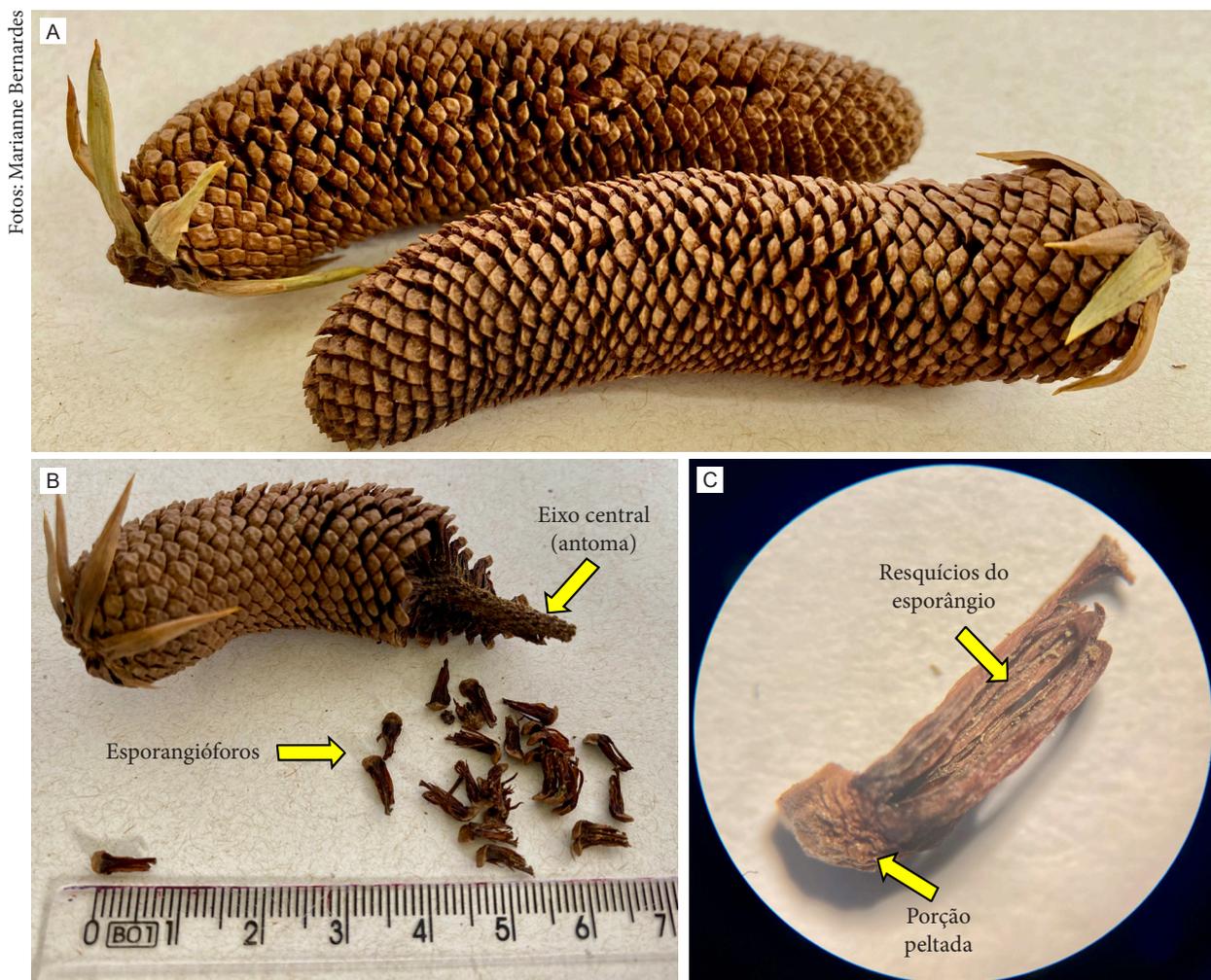


Figura 3. Estróbilos masculinos de *Araucaria angustifolia* (A) e seus componentes: eixo central (antoma ou caule automático) e esporangióforos (B). Ampliação de um esporangióforo, mostrando a sua porção peltada e resquílios do esporângio (C).

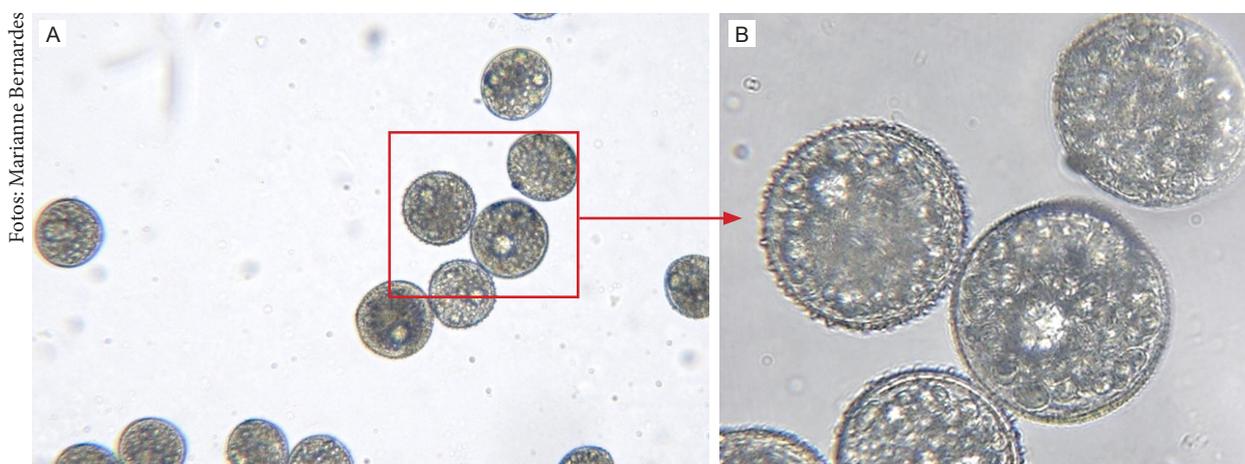


Figura 4. Imagens obtidas por microscopia, com aumentos de 100× (A) e 200× (B), mostrando a estrutura de grãos de pólen de *Araucaria angustifolia* com aproximadamente 60 μm de diâmetro.

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 provisó-

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 pólenes 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 pólenes. 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).

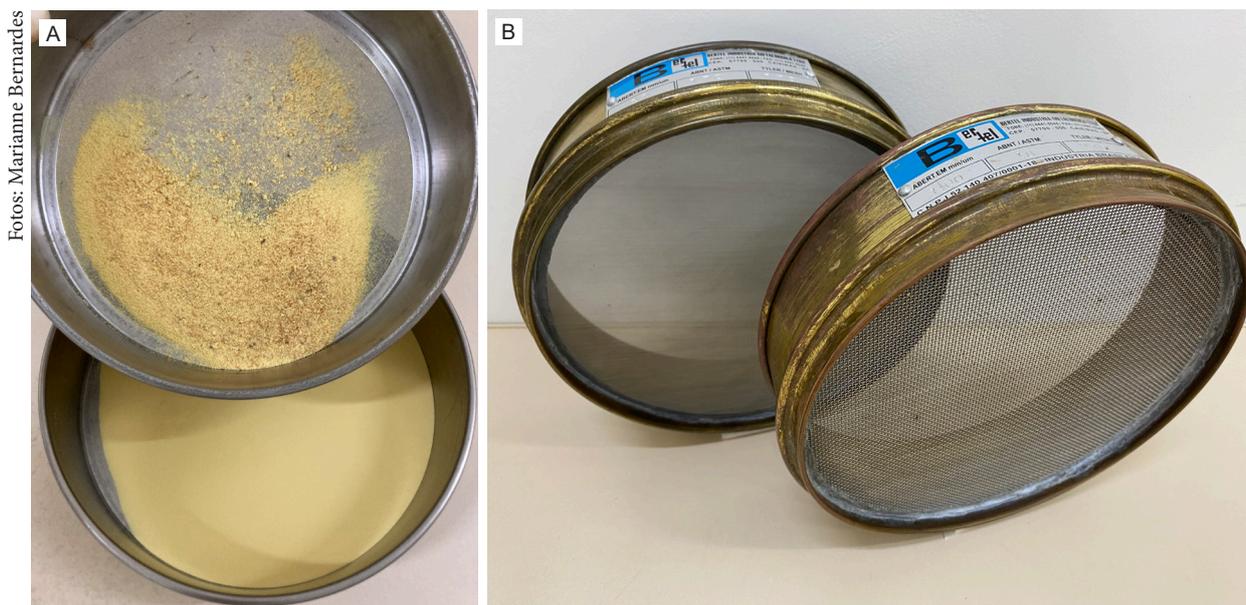


Figura 5. Peneiramento de pólen de *Araucaria angustifolia* (A), sucessivamente por duas peneiras com aberturas de malha de 16 e 170 mesh (B).

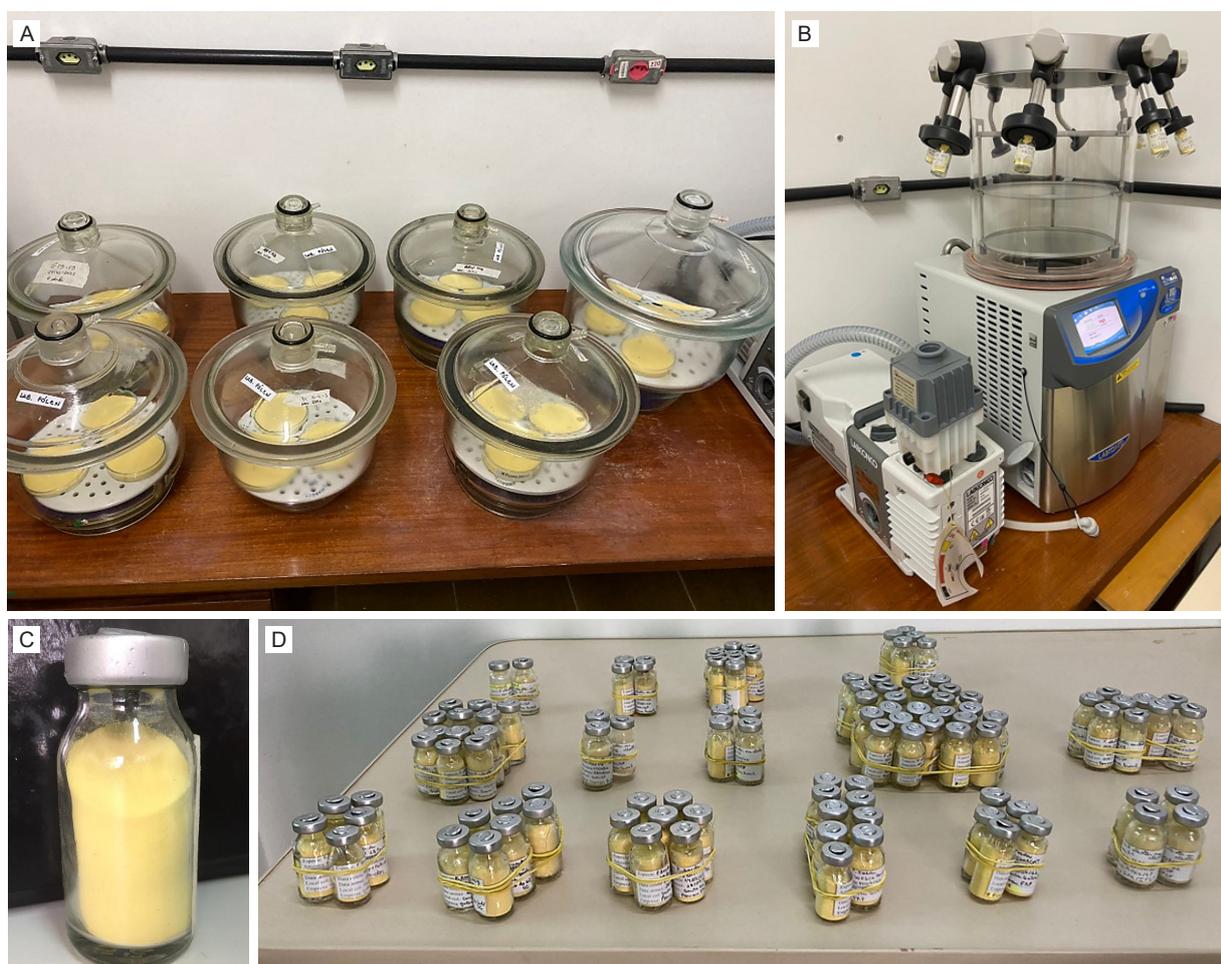
A seguir, o pólen peneirado deve ser seco. O adequado grau de desidratação do pólen é inversamente proporcional à temperatura na qual ele será posteriormente armazenado, ou seja, quanto mais frio, maior a desidratação necessária. A redução da umidade do pólen diminui sua taxa metabólica durante o armazenamento 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 frascos 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 $60\text{ e }80\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

- ii) Utilizando uma estufa de secagem, preferencialmente com circulação forçada de ar, com temperatura controlada de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 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 ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

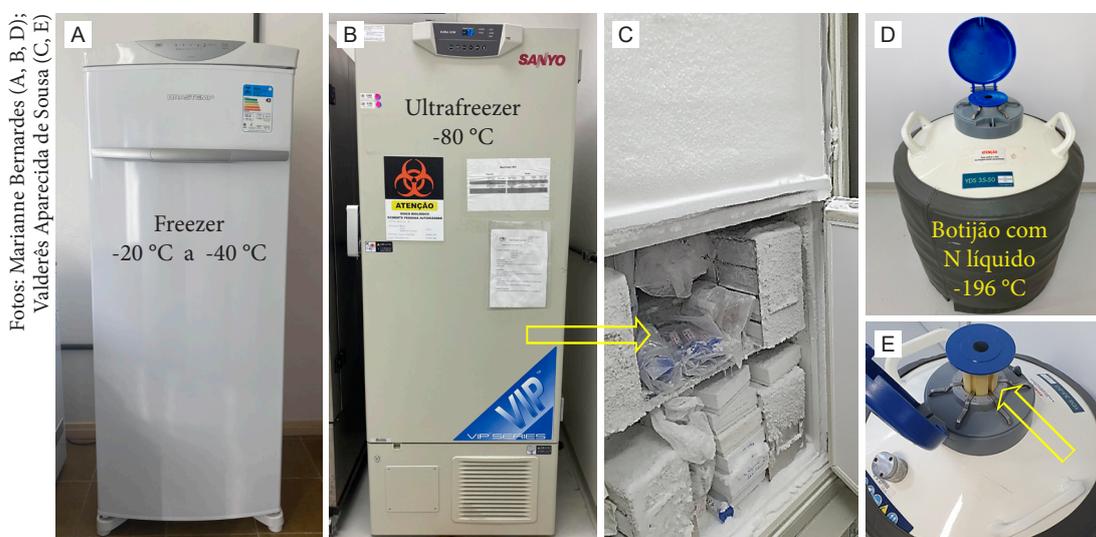


Fotos: Marianne Bernardes

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.



Fotos: Marianne Bernardes (A, B, D); Valderês Aparecida de Sousa (C, E)

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 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 200 mg L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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 (biochemical oxygen demand), regulada com temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 100% (Figura 8D).



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

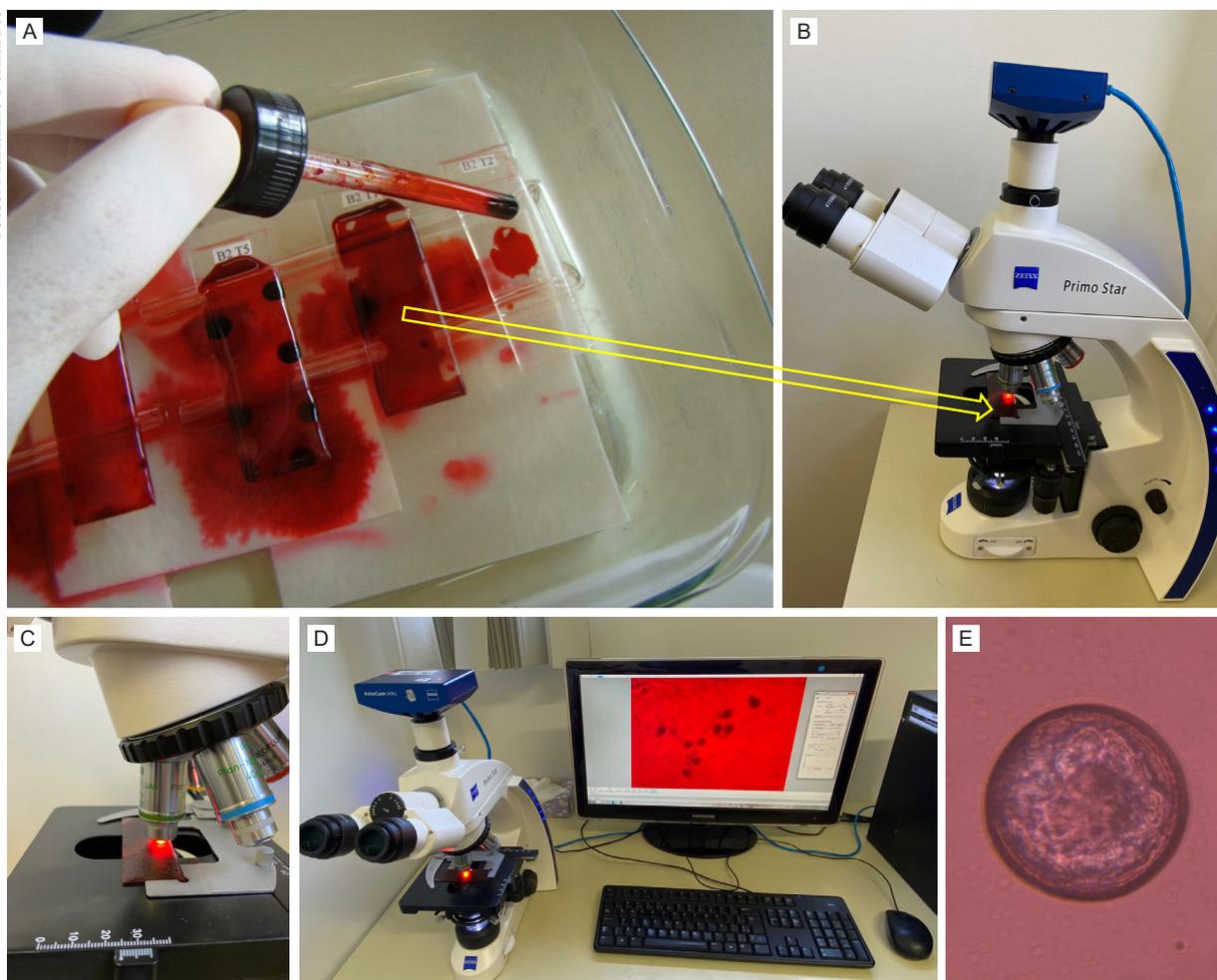


Figura 9. Processo de coloração de grãos de pólen de *Araucaria angustifolia* com safranina (A) e posterior visualização em microscópico óptico com aumento de 400× (B, C, D, E).

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 pólenes) 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: FUPER, 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; FRITZONS, 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>.
- TESDORFE, 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.; FRITZONS, 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>.