

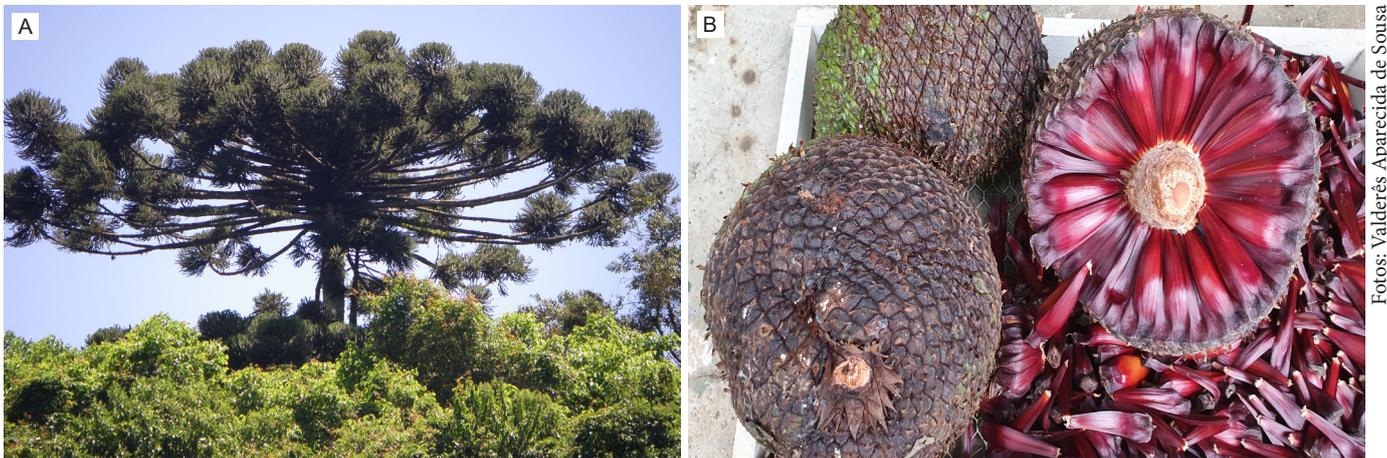
# Capítulo 3

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

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

## Introdução

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



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

Fotos: Valderés Aparecida de Sousa

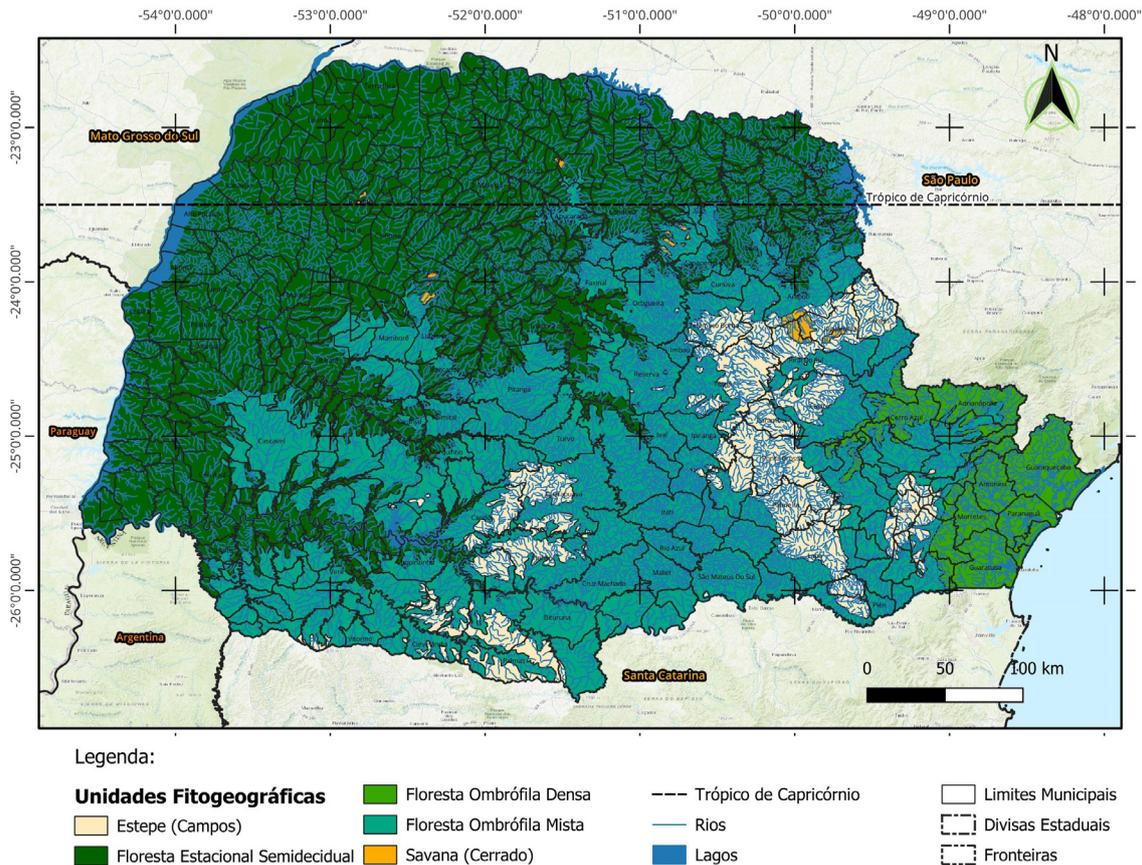
*Araucaria angustifolia* ocorre, particularmente, na Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou “Floresta com Araucária” (IBGE, 2012), ecossistema pertencente ao bioma Mata Atlântica, onde se destaca por seu alto porte e formato de cálice, facilmente identificado no estrato superior da floresta (Figura 1A) (Campanili;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

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

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

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

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



**Figura 2.** Unidades fitogeográficas no estado do Paraná.

Mapa: Wilson Anderson Holler

Fonte: Instituto Água e Terra (2023).

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

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

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

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

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

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

## Descrição dos métodos

### Locais de amostragem de câmbio em árvores de araucária

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



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

### Escolha e marcação de árvores de araucária em populações naturais

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

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



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

### Método de coleta de amostras de tecido lenhoso com câmbio

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

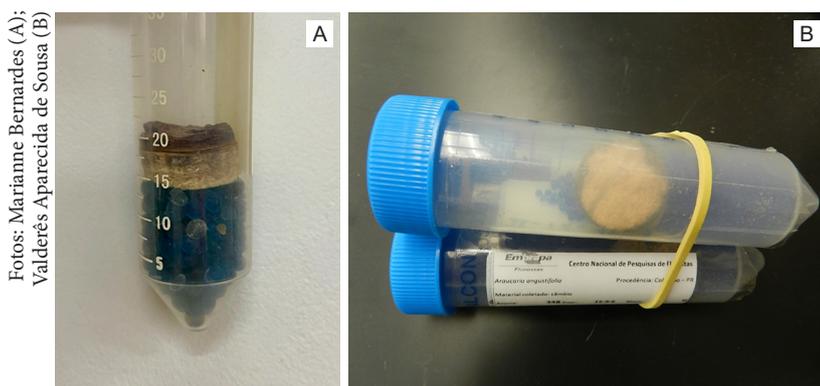


Fotos: Gustavo Crizel Gomes (A, B, D); Marcos Silveira Wrege (C)

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

### Método de armazenamento das amostras de tecido lenhoso com câmbio

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

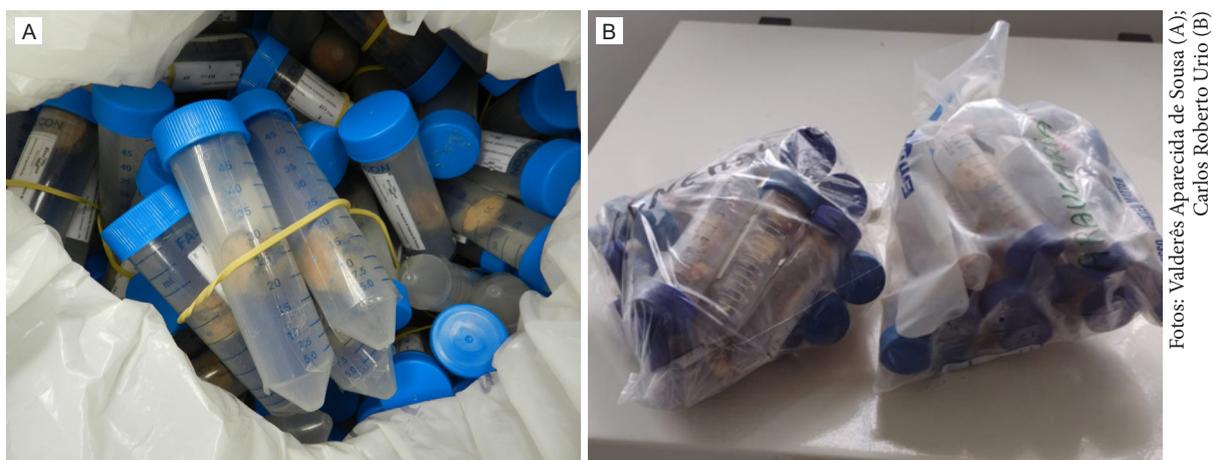


Fotos: Marianne Bernardes (A); Valderês Aparecida de Sousa (B)

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

A sílica gel é uma substância higroscópica comumente adicionada, na forma de sachês, no interior de frascos de medicamentos, peças eletrônicas, material fotográfico etc., visando impedir a proliferação de fungos (“mofos”) e ferrugem. Ela é também utilizada em dessecadores de laboratório, geralmente com granulometria entre 1 e 4 mm, sendo composta por cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) e sílica amorfa ( $\text{SiO}_2$ ) ou silicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ), mudando da cor azul para rosa à medida que absorve umidade. Deste modo, esta mudança de cor indica o momento ideal para substituição da sílica saturada com água por outra desidratada, permitindo a continuidade do processo de secagem da amostra de tecido lenhoso com câmbio. É importante ressaltar que a sílica umedecida pode ser seca em estufa com circulação forçada de ar, aquecido sob temperatura entre 60 e 80 °C, por 24 horas, recuperando sua capacidade de absorção de água.

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



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

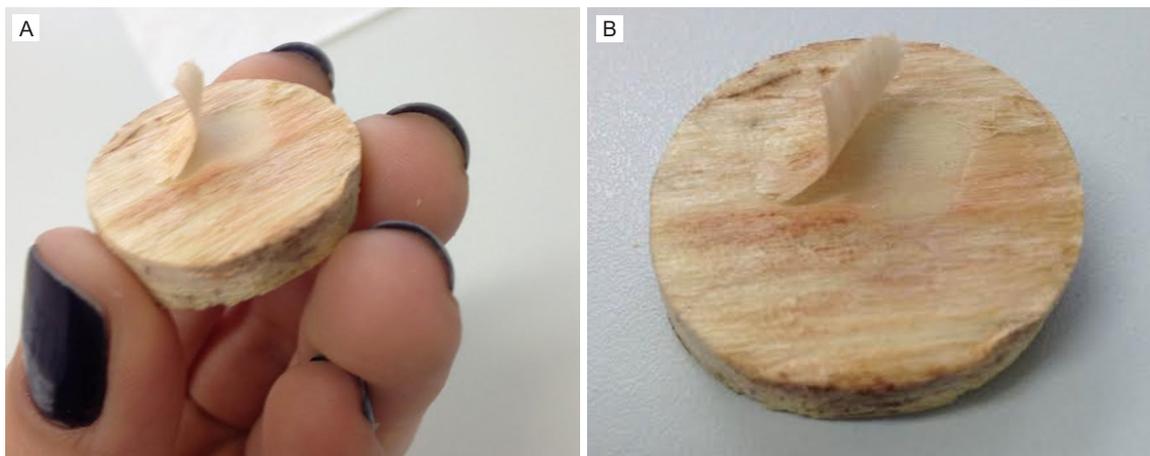
Recomenda-se que os câmbios sejam extraídos das amostras de tecido lenhoso (como descrito no item seguinte), depositados em pequenos tubos com capacidade de 1,5 a 2,0 mL e, posteriormente, acondicionados em freezer sob temperatura de -16 °C ou -80 °C para armazenamento de médio ou longo prazos, respectivamente.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

## Método de extração de câmbio de amostra de tecido lenhoso

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

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

Fotos: Marianne Bernardes

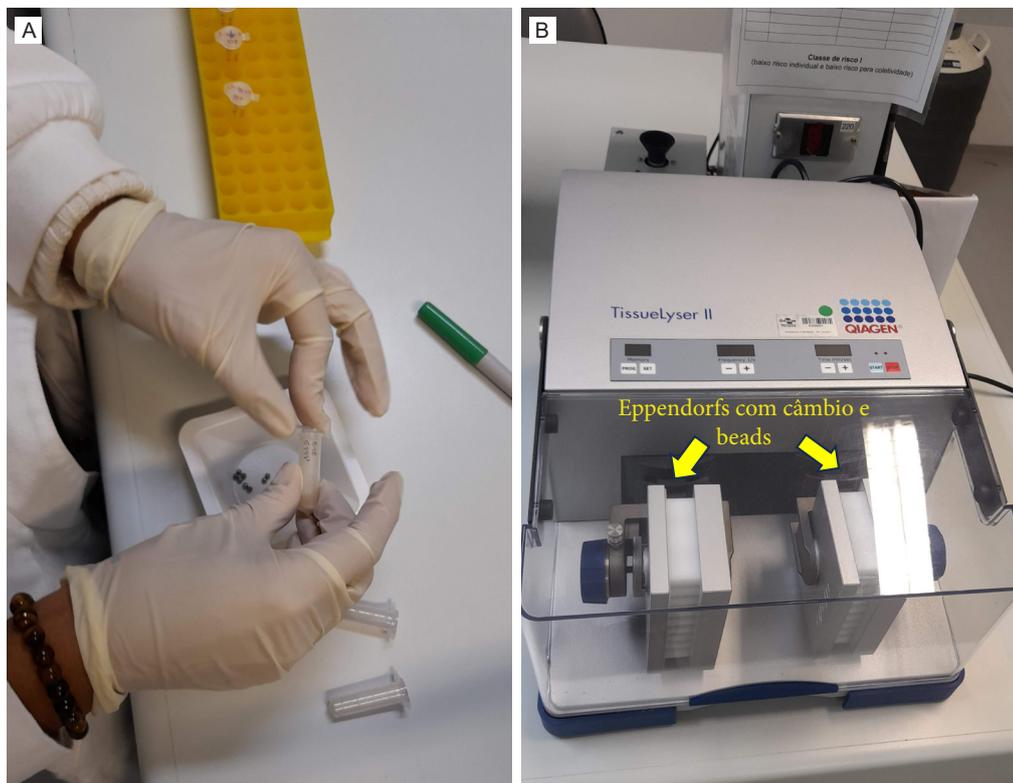


**Figura 8.** Separação cuidadosa do câmbio localizado sob o tecido suberoso de *Araucaria angustifolia* (A) e detalhe do câmbio na forma de uma fina película (B).

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

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

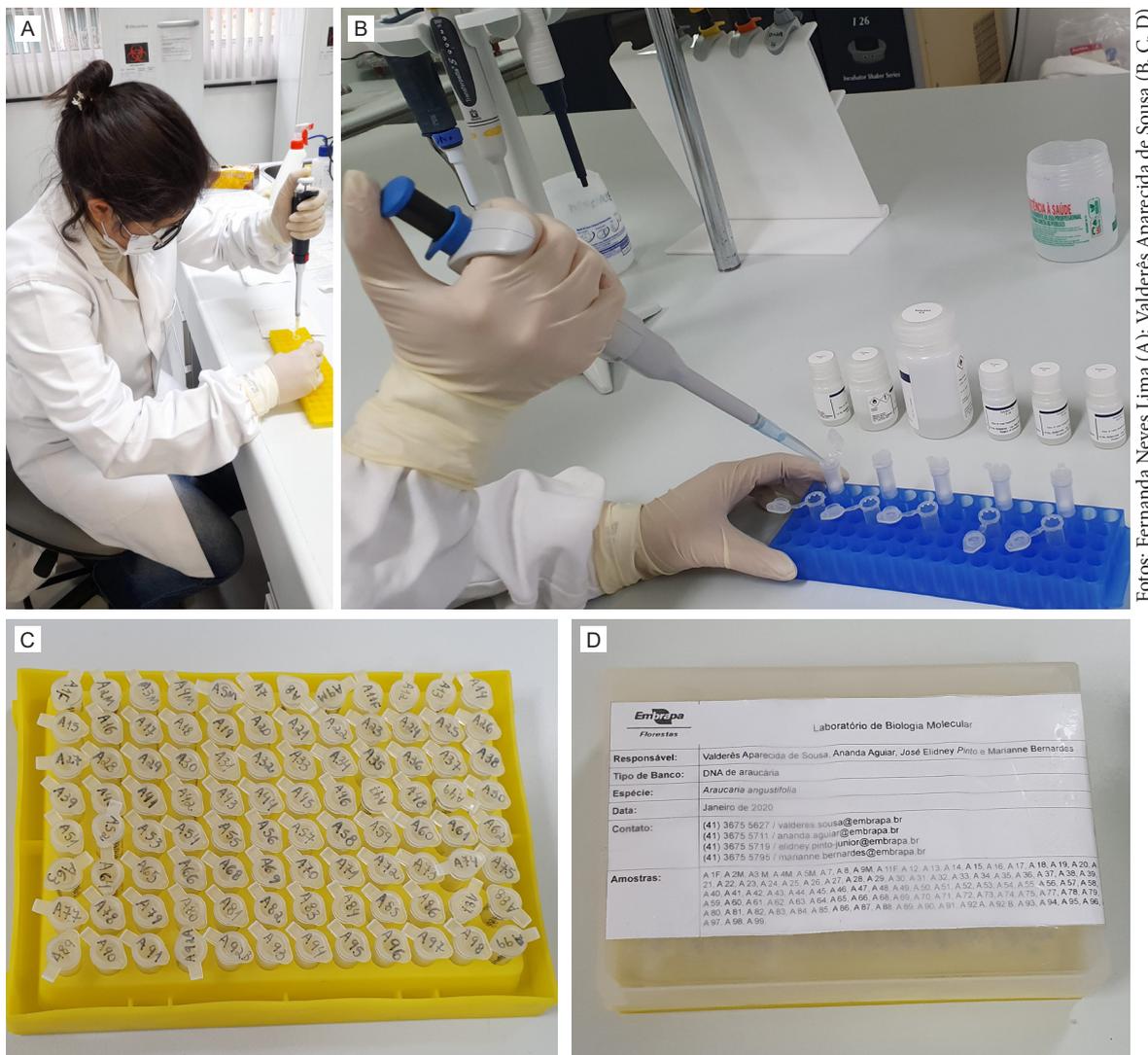
Fotos: Fernanda Neves Lima



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

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

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



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

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

## Considerações finais

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

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

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

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

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

## Referências

- AGUIAR, A. V. de; SOUSA, V. A. de; PINTO JUNIOR, J. E.; MIKICH, S. B.; LIEBSCH, D. A araucária e suas especificidades. In: SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária: pesquisa e desenvolvimento no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 3, p. 47-68. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229160/1/EmbrapaFlorestas-2021-LV-AraucariaEmbrapa-cap3.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2023.
- CAMPANILLI, M.; SCHAFFER, W. B. (org.). **Mata Atlântica: patrimônio dos brasileiros**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2010. 408 p.
- GODOY, R. C. B. de; CARVALHO, C. W. P. de; GUIDOLIN, M. E. B. Z.; IKEDA, M.; NOGUEIRA, R. I.; HELM, C. V.; CORNEJO, F. E. P.; COSTA, F. J. O. G. da; BARRETO, A. G. Valor nutricional e processamento do pinhão. In: SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). **Araucária: pesquisa e desenvolvimento no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 16, p. 321-336. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229178/1/EmbrapaFlorestas-2021-LV-AraucariaEmbrapa-cap16.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- IBGE. **Manuais técnicos em geociências: manual técnico da vegetação brasileira**. 2 ed. Rio de Janeiro, 2012. 275 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv63011.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- INSTITUTO ÁGUA E TERRA (Paraná). **Unidades fitogeográficas no estado do Paraná**. Curitiba, 2023. Disponível em: <https://geopr.iat.pr.gov.br/img/repositorio-de-dados/?id=c93c60705f16462380e0fe66b1f77245#>. Acesso em: 21 set. 2024.
- INSTITUTO DE TERRAS, CARTOGRAFIA E GEOCIÊNCIAS (Paraná). **Formações fitogeográficas: estado do Paraná**. Curitiba, 2009. 1 mapa color. Escala 1:2.000.000. Disponível em: [https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-07/mapa\\_fitogeografico\\_a3.pdf](https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/2020-07/mapa_fitogeografico_a3.pdf). Acesso em: 11 dez. 2023.
- LI, Z.; CHEN, F.; HUANG, C.; ZHENG, W.; YU, C.; CHENG, H.; ZHOU, R. Genome-wide mapping and characterization of microsatellites in the swamp eel genome. **Scientific Reports**, v. 7, artigo 3157, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03330-7>.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Araucariáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1966. 62 p. (Flora ilustrada catarinense).

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

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

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

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

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

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

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

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