



**ALTERNATIVAS PARA MELHORAR A
EFICIÊNCIA DOS CRUZAMENTOS EM
PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE
*EUCALYPTUS***

ROSELAINÉ CRISTINA PEREIRA

2001

ROSELAINÉ CRISTINA PEREIRA

**ALTERNATIVAS PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DOS
CRUZAMENTOS EM PROGRAMAS DE
MELHORAMENTO DE *EUCALYPTUS***



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof. Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Roselaine Cristina

Alternativas para melhorar a eficiência dos cruzamentos em programas de
melhoramento de *Eucalyptus* / Roselaine Cristina Pereira. -- Lavras : UFLA, 2001.
41p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) -- UFLA.

Bibliografia.

1. *Eucalyptus camaldulensis*. 2. *Eucalyptus urophylla*. 3. Receptividade de
estigma. 4. Viabilidade de pólen armazenado. I. Universidade Federal de Lavras.

II. Título.

CDD-634.97342

ROSELAINÉ CRISTINA PEREIRA

**ALTERNATIVAS PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DOS
CRUZAMENTOS EM PROGRAMAS DE
MELHORAMENTO DE *EUCALYPTUS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 15 de fevereiro de 2001

Prof. Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado UFLA

Prof. Dr. Magno Antônio Patto Ramalho UFLA



**Prof. Dra. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

**Aos meus pais, Francisco e Sebastiana,
pelo amor e compreensão;**

DEDICO

Ao meu irmão, Rodrigo, pela amizade e constante presença;

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela constante presença em minha vida.

Ao Departamento de Biologia, professores e funcionários, pela oportunidade e ajuda.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À professora Dra Lisete Chamma Davide pela orientação, amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Magno Antônio Patto Ramalho pelas valiosas sugestões e atenção dispensada nas diversas etapas deste trabalho.

A V & M Florestal pelo fornecimento do material para os experimentos.

Ao pesquisador Hélder Bolognani Andrade pela amizade, atenção e orientação.

Aos professores César Brasil, João Bosco, José Eduardo, Samuel e José Eustáquio pelos conhecimentos transmitidos.

À professora Elaine que, mesmo distante, sempre se manteve presente.

À professora Giovana pela amizade e inúmeras contribuições.

À amiga Vânia pela leitura crítica deste trabalho.

Ao João Luís pela crítica e auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética pela alegria do convívio diário.

Aos colegas de curso pelo convívio sempre amigável.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	02
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>	02
2.2 <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.....	04
2.3 <i>Eucalyptus urophylla</i> ST Blake.....	05
2.4 Biologia floral do gênero <i>Eucalyptus</i>	06
2.4.1 Inflorescência.....	06
2.4.2 Botão floral e flor.....	06
2.4.3 Opérculo.....	07
2.4.4 Estames.....	07
2.4.5 Estilete e estigma.....	07
2.4.6 Ovário.....	08
2.4.7 Óvulo.....	08
2.4.8 Polinização.....	08
2.4.9 Fruto.....	09
2.5 Receptividade do estigma em espécies de <i>Eucalyptus</i>	09
2.6 Armazenamento e viabilidade do pólen.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Local.....	17
3.2 Alternativas experimentais.....	17
3.2.1 Avaliação do período de maior receptividade do estigma após a emasculação.....	17
3.2.1.1 Material genético.....	18
3.2.1.2 Condução do experimento.....	18

3.2.1.3 Análise estatística dos dados.....	20
3.2.2 Avaliação da viabilidade do pólen armazenado <i>in vitro</i>	20
3.2.2.1 Material genético.....	21
3.2.2.2 Condução do experimento.....	21
3.2.2.3 Análise estatística dos dados.....	22
3.2.3 Avaliação da viabilidade do pólen armazenado <i>in vivo</i>	22
3.2.3.1 Material genético.....	22
3.2.3.2 Condução do experimento.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Avaliação do período de maior receptividade do estigma após a emasculação.....	24
4.2 Viabilidade do pólen armazenado.....	27
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

PEREIRA, Roselaine Cristina. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. Lavras: UFLA, 2001. 41p.(Dissertação- Mestrado em genética e melhoramento de plantas)*

Em qualquer programa de melhoramento procura-se identificar procedimentos simples e rápidos para realizar hibridações, bem como a possibilidade de manter os grãos de pólen viáveis por longos períodos de modo a dar maior flexibilidade no trabalho dos melhoristas. Com intuito de obter essas informações foi realizado o presente trabalho visando avaliar a eficiência das polinizações realizadas logo após a emasculação e a viabilidade do pólen armazenado de clones de *E. camaldulensis* e *E. urophylla*, cultivados no noroeste do Estado de Minas Gerais. Para isto, foram realizadas polinizações controladas em diferentes períodos após a emasculação, isto é, com zero, um, três, cinco e sete dias. A eficiência da hibridação foi avaliada por meio da porcentagem de frutos vingados, número de sementes produzidas por fruto, porcentagem de sementes viáveis e também por meio da observação citológica do desenvolvimento do pólen ao longo do estilete. Para a avaliação da viabilidade do armazenamento dos grãos de pólen, foram coletados botões florais de clones das duas espécies próximo ao período da antese. As estruturas estaminais foram colocadas em placas de Petri e mantidas em dessecador por 24 horas. O pólen foi armazenado em freezer (-4°C) por 1,2 e 3 meses. A avaliação do pólen foi feita por meio de testes de germinação *in vitro* e *in vivo*. Para os testes *in vitro*, foram utilizadas lâminas escavadas contendo um meio com 0.8% de ágar e 30% de sacarose acrescido dos grãos de pólen. As lâminas foram incubadas por 24 horas a 25°C. Foram avaliadas 5 lâminas por tratamento, sendo considerados viáveis os grãos de pólen que emitiram tubos polínicos. Para a avaliação *in vivo*, foram realizadas polinizações com o pólen armazenado e, após 72 horas, coletados pistilos para verificar a geminação *in vivo* do pólen. Constatou-se que a eficiência das polinizações variou entre as espécies e entre as épocas. Contudo, a maior eficiência das polinizações foi obtida quando as mesmas foram realizadas no terceiro e quinto dia após a emasculação, porém as polinizações realizadas simultaneamente à emasculação produziram número suficiente de sementes, de

*Comitê orientador: Dra. Lisete Chamma Davide-UFLA (orientadora), Dr. Magno Antônio Patto Ramalho-UFLA, Hélder Bolognani Andrade- V&M Florestal.

modo a possibilitar essa prática em programas de melhoramento. Com relação ao armazenamento do pólen, verifica-se que apesar de ter ocorrido queda de viabilidade com o armazenamento, essa não foi suficientemente significativa de modo a inviabilizar o uso desse pólen nas hibridações artificiais.

ABSTRACT

PEREIRA, Roselaine Cristina. Alternatives to improve hybridization efficiency in eucalyptus breeding programs. Lavras: UFLA, 2001. 41p. (Dissertation- Master in genetics and plant breeding)*

Simple and quick hybridization procedures and ways to keep pollen grains viable for long periods are sought in plant breeding programs to provide greater work flexibility. The present study was carried out to assess the efficiency of pollinations made shortly after flower emasculation and the viability of stored pollen from *Eucalyptus camaldulensis* and *E. urophylla* clones cultivated in Northwestern Minas Gerais State. Controlled pollinations were carried out at zero, one, three, five and seven days after emasculation. Hybridization efficiency was assessed by the percentage of viable fruits, number of seeds produced per fruit, percentage of viable seeds and also by cytological observation of the pollen development along the style. Flower buds from clones of the two species were collected close to anthesis to assess the viability of pollen grain storage. The stamen structures were placed in Petri dishes and kept in a silica gel dryer for 24 hours. Pollen was then collected and stored in a freezer (-4°C) for 1, 2 and 3 months. Pollen assessed was carried out by *in vitro* and *in vivo* germination tests. The *in vitro* pollen grain germination tests were done in concave slides containing a 0.8% agar and 30% saccharose medium incubated at 25°C for 24 hours. Five slides per treatment were assessed and the pollen grains that emitted pollen tubes were considered viable. For the *in vivo* assessment, manual pollinations were performed with the stored pollen and their success was verified through pollen germination analysis in the receiving pistil after 72 hours. The efficiency of the pollinations varied with their delay and also between species. The greatest pollination efficiency was obtained when they were carried out on the third and fifth day after emasculation, but those performed simultaneously with emasculation produced enough seeds to allow this practice in breeding programs. The decrease in pollen viability with storage was not sufficiently significant to preclude the use of this procedure in artificial hybridization.

*Guidance Committee: Dra. Lisete Chamma Davide-UFLA (Major Professor), Dr. Magno Antônio Patto Ramalho-UFLA, Hélder Bolognani Andrade- V&M Florestal.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o melhoramento do eucalipto teve enorme sucesso contribuindo para expressivo aumento da produtividade de celulose e carvão vegetal. Esse sucesso foi obtido principalmente devido a seleção massal, seguida da obtenção de clones das plantas superiores e da seleção com famílias de meios-irmãos, visando a obtenção de populações melhoradas.

Contudo, para se continuar tendo resultados expressivos no melhoramento, há necessidade de envolver outros métodos. Esses métodos exigem polinizações artificiais, o que não era necessário nas alternativas de melhoramento até então utilizadas.

Muito se conhece sobre a biologia floral do gênero *Eucalyptus* (Griffin e Hand, 1979; Cauvin, 1984; Sousa e Pinto, 1994; Oddie e McComb, 1998). Há algumas informações sobre a eficiência das polinizações artificiais entre as espécies de eucalipto e os trabalhos realizados mostram que ocorrem variações inter e intra-específicas, bem como a influência de fatores ambientais (Hogson, 1976 a; Griffin e Hand, 1979 e Oddie e McComb, 1998). As informações sobre a época de se proceder polinizações em relação ao momento da emasculação e viabilidade do pólen armazenado aumentam a possibilidade de sucesso com as hibridações artificiais.

Considerando que essas informações serão fundamentais para a continuidade dos programas de melhoramento de *Eucalyptus* conduzidos na região, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de obter informações sobre o período de receptividade do estigma e viabilidade do pólen armazenado, de modo a orientar os melhoristas a respeito de estratégias para aumentar a eficiência na hibridação artificial entre plantas de *E. camaldulensis* e *E. urophylla*, visando maximizar a obtenção de novas combinações híbridas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e foi inicialmente descrito e denominado por Charles Louis L' Heritier de Brutelle em 1788, o qual identificou a espécie *E. obliqua* (Hall, Jonhston e Chippendale, 1970). Desde então, aproximadamente 600 espécies, variedades e híbridos têm sido descritos; porém, somente 500 espécies foram reconhecidas efetivamente (Chippendale, 1988). É válido ressaltar que embora sejam consideradas espécies diferentes, são apenas no conceito tipológico (Mayr, 1977), já que a maioria se cruza produzindo descendentes férteis e viáveis.

São sete os subgêneros de *Eucalyptus* : *Blakella*, *Corymbia*, *Eudesmia*, *Symphyomyrtus*, *Idiogenes*, *Gaubaea*, *Monocalyptus* (Pryor e Johnson, 1971). Destes subgêneros, o *Symphyomyrtus* destaca-se, sob o ponto de vista econômico, por englobar a grande maioria das espécies utilizadas em plantios contínuos, tais como: *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligma*, *E. urophylla*, *E. tereticornis*, *E. robusta*, *E. dunnii*, entre outros.

O gênero *Eucalyptus* encontra-se predominantemente no hemisfério sul e constitui um componente distinto e dominante na flora australiana. Ocorre em uma ampla diversidade de condições edafoclimáticas no continente oceânico e áreas adjacentes, desde a latitude 7° Norte até 43° Sul (Boland et al., 1984). Quase a totalidade das espécies encontra-se na Austrália, com poucas espécies ocorrendo em Papua, Nova Guiné, Sulawesi e Mindanao (Hall, Jonhston e chippendale, 1970).

A identificação das espécies de eucalipto não é fácil quando um número suficiente de características não está disponível. Para este fim, deve-se levar em consideração características como: tamanho e forma da planta, tipo de casca do tronco e ramos, características das folhas e embrião, "seedling" e características juvenis, intermediárias e adultas da planta, incluindo tamanho e tipo de inflorescência, estrutura e forma das flores e frutos e morfologia das sementes. A localização geográfica e o habitat podem também ser de grande utilidade em casos de identificação de plantas de ocorrência natural (Boland et al. , 1984).

A maioria das espécies é arbórea e algumas são arbustivas, ocupando desde áreas pantanosas até áreas secas, solos de baixada de alta fertilidade, até solos arenosos muito pobres (Hall , Jonhston e Chippendale, 1970).

O Eucalipto vem sendo plantado em vários países a aproximadamente 200 anos (Florence, 1986), compreendendo 37,5% das florestas plantadas nos trópicos (Evans, 1987). A expansão do eucalipto no mundo teve seu auge nos anos 1950 e 1960 com grandes plantações industriais para produção de papel e carvão na Espanha, África do Sul, Índia e Brasil (Florence, 1986).

No Brasil, o eucalipto foi introduzido por Edmundo Navarro de Andrade no início do século XX, no Estado de São Paulo, sendo amplamente difundido para outras regiões do país, a partir de 1966, devido aos incentivos fiscais ao reflorestamento concedidos pelo governo brasileiro (Kageyama, 1980).

O grande sucesso do eucalipto é devido ao rápido crescimento, fácil manejo, alta plasticidade de suas espécies e à variabilidade no que diz respeito à adaptação a diversos tipos de climas e solos (Brune, 1983). Além disso, um outro fator importante é a facilidade para regeneração (Boland e Turnbull, 1981), produção regular e manutenção do vigor de suas sementes por muitos anos, sem necessidade de condições especiais de armazenamento (Andrade, 1991).

2.2 *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh

E. camaldulensis é a espécie com maior distribuição na Austrália e também uma das mais plantadas no mundo (Allen, 1979). A sua ocorrência no território australiano abrange 14° e 38° de latitude sul, 114° e 152° de longitude leste e altitudes de 30 a 600 m, ocupando ambientes ecológicos muito variados (Golfari, Caser e Moura, 1978).

Esta espécie desenvolve-se, principalmente, ao longo dos rios e também em regiões semi-áridas, em solos relativamente pobres e em uma ampla variedade de condições climáticas (de tropical a temperada). Entretanto, as principais áreas de ocorrência caracterizam-se por geadas no inverno e altas temperaturas no verão. As condições de temperatura normalmente variam de um mínimo de -6 ° C a um máximo de 54°C, com oscilação acima de 21°C durante o dia. A precipitação pluviométrica varia, em geral, de 250 a 650 mm/ano (Turnbull, 1973).

No Brasil, o *E. camaldulensis* foi introduzido no Estado de São Paulo no início do século, sendo conhecido como *E. rostrata* (Andrade, 1989). É uma espécie que apresenta bom desempenho em regiões de cerrado e caatinga, desenvolvendo-se bem no Norte e Nordeste brasileiro (Golfari, Caser e Moura, 1978).

A madeira do *E. camaldulensis* tem sido principalmente usada na fabricação de postes, lenha e na produção de carvão, sendo também utilizada como madeira serrada e para celulose. A espécie é ainda usada em sistemas agroflorestais e para produção de mel (Catie, 1984; Midgley, Eldridge e Doran, 1989).

O sucesso dessa espécie exótica é atribuído à sua superioridade em relação a outras do gênero na produção de madeira em solos pobres e secos, tolerância a períodos de alagamento, geadas, seca extrema e altas temperaturas,

combinada com rápido crescimento quando se tem água disponível, sendo, portanto, de interesse em programas de melhoramento (Midgley, Eldridge e Doran, 1989).

2.3 *Eucalyptus urophylla* ST Blake

E. urophylla ocorre naturalmente fora da Austrália, em algumas ilhas da extremidade do arquipélago de Sonda, nas ilhas de Timor, Wetar, Alor, Pantar, Lomblen, Adornara e Flores, ocupando as coordenadas geográficas de 119° - 128° de longitude e 6° - 11° S de latitude, em altitudes que variam de 300 a 3000 m (Lopez, 1992). A precipitação média nestas regiões varia de 1000 a 1500 mm/ano, com maior concentração de chuvas no verão; a estação seca varia de 3 a 6 meses, com temperatura média das mínimas entre 8° C a 12° C (Ruy, 1998).

No Brasil, o *E. urophylla* foi introduzido em 1919 por Edmundo Navarro de Andrade, no município de Rio Claro-SP. Até o ano 1996, juntamente com *E. saligna* e *E. grandis*, *E. urophylla* era uma das espécies do gênero mais plantadas nas regiões típicas de cerrado e com estações secas pronunciadas. Atualmente, no Brasil, existem cerca de 600.000 ha plantados com esta espécie e com seus híbridos (Ruy, 1998).

O *E. urophylla* é uma espécie de grande potencialidade para regiões de clima quente e de elevados déficits hídricos, sendo a espécie e seus híbridos bastante utilizados em programas de reflorestamento, devido ao bom desenvolvimento em regiões tropicais, a boa qualidade de madeira para carvão, celulose e, principalmente, à sua resistência ao fungo *Cryphonectria cubensis*, responsável pelo cancro (Ruy, 1998).

Suas árvores são de grande porte, sem tortuosidade, com forte dominância apical, casca tipo rugosa, folhas afiladas e normalmente ocupam solos de alta fertilidade (Ruy, 1998).

2.4 Biologia floral do gênero *Eucalyptus*

2.4.1 Inflorescência

As flores no gênero *Eucalyptus* ocorrem agrupadas em uma inflorescência presa à axila da folha por um pedúnculo. Cada inflorescência é constituída por flores simples ou por grupos de 3, 5, 7, 9, 11 ou mais flores (Potts e Gore, 2000).

As inflorescências podem formar cachos ou umbelos, apresentando se como: inflorescência axilar simples; inflorescência axilar composta; ou inflorescência terminal (Potts e Gore, 2000).

2.4.2 Botão floral e flor

O botão floral desenvolve-se inicialmente envolvido por uma bráctea, sendo bastante uniforme dentro das espécies, mas variando em forma e tamanho entre as diferentes espécies. Este pode ser peciolado ou séssil e envolvido por uma ou duas capas denominadas opérculo, que tem como função a proteção das partes femininas e masculinas até a antese. O estágio de botão compreende a presença de opérculo. Após a abscisão deste, denomina-se flor.

A flor do eucalipto é hermafrodita, apresentando numerosos estames arranjados em torno do estilete. A coloração da flor é determinada pela

coloração dos filamentos. Geralmente, as espécies oriundas do leste da Austrália apresentam filamentos brancos e, as do oeste, coloridos (Griffin, 1982).

2.4.3 Opérculo

O opérculo é derivado da fusão de pétalas e sépalas. Sua estrutura é bastante variável, sendo utilizada, principalmente, para diferenciar os subgêneros *Monocalyptus* e *Symphyomyrtus* (Potts e Gore, 2000). As espécies do subgênero *Symphyomyrtus* têm dois opérculos, um derivado da fusão das pétalas e outro derivado da fusão das sépalas. As espécies do subgênero *Monocalyptus* apresentam um opérculo simples e há dificuldade de verificar se este é derivado das pétalas ou sépalas ou da combinação de ambas (Pryor, 1976).

2.4.4 Estames

O estame consiste do filete e da antera. Os estames são numerosos e encontram-se compactados e envolvidos pelo opérculo. Após a abscisão do opérculo há a expansão dos numerosos estames. Em algumas espécies os filetes mais externos apresentam anteras reduzidas, não funcionais ou ausentes. As anteras consistem de dois sacos unidos longitudinalmente por um tecido conectivo (Potts e Gore, 2000).

2.4.5 Estilete e estigma

O estilete é simples, apresentando diferenças em comprimento, espessura e rigidez de acordo com a espécie. O estigma normalmente é úmido e apresenta-se viscoso e dilatado no período de maior receptividade (Anderson, 1984).

Variações na morfologia do estigma e do estilete são utilizadas para diferenciação dos grupos (Boland e Sedgley, 1986).

2.4.6 Ovário

O ovário é multi-locular, com muitos óvulos por lóculo (Potts e Gore, 2000). O número de óvulos por ovário é bastante variável entre as espécies. O ovário de *E. regnans*, por exemplo, contém, em média, cerca de 31 óvulos, dos quais aproximadamente 16 óvulos são normais, 3 são óvulos anormais e 12 são estéreis (Sedgley et al., 1989). Em contraste, o ovário de *E. woodwardii* contém, em média, 280 óvulos, dos quais 160 são férteis, 41 anormais e 79 estéreis (Sedgley, 1989).

2.4.7 Óvulo

O óvulo do eucalipto é típico das angiospermas, contendo 7 células e oito núcleos. Cada óvulo é fertilizado por um tubo polínico. A orientação do óvulo pode ser hemitrópica ou anatrópica (Pots e Goore, 2000).

2.4.8 Polinização

Após a abscisão do opérculo, ocorre a deiscência das anteras. Nesse momento, o estigma não está totalmente expandido e, portanto, não se encontra receptivo. A protandria favorece a polinização por outra fonte, embora possa ser feita pela mesma planta, uma vez que podem ocorrer diferentes períodos de picos de antese em diferentes indivíduos, reforçando a polinização cruzada dentro de uma população (Pryor, 1976). Este mesmo autor define o gênero

Eucalyptus como sendo predominantemente, de hábito alógamo e as populações sendo compostas por indivíduos heterozigotos.

Na maioria das espécies, a polinização é feita por insetos, tais como moscas, besouros, abelhas ; nas espécies de flores grandes a polinização é feita por pássaros (Pryor, 1976).

2.4.9 Fruto

O fruto é constituído de uma cápsula lenhosa sendo que sua deiscência ocorre no ápice, por meio de 3 a 6 aberturas.

2.5 Receptividade do estigma em espécies de *Eucalyptus*

A determinação da receptividade do estigma tem como consequência a maior eficiência das polinizações levando também a uma economia de tempo e de pólen, uma vez que evita que as polinizações sejam feitas repetidas vezes, para assegurar a produção de sementes.

No gênero *Eucalyptus*, o período de receptividade do estigma pode variar com o subgênero. As espécies do subgênero *Monocalyptus* apresentam desenvolvimento floral mais lento que as do subgênero *Symphyomyrtus* (Pryor, 1971; Eldridge, 1970; Griffin e Hand, 1979). Essa variação também se dá em nível inter e intra-específico (Griffin e Hand, 1979; Sousa e Pinto, 1994). Sendo assim, espécies como *E. cinerea*, *E. macarthurii* e *E. occidentalis* (Polunina, 1959), *E. grandis* por Hogson (1976a), *E. gunnii* (Cauvin, 1984), *E. dunnii* (Sousa e Pinto, 1994) e *E. camaldulensis* (Oddie e McComb, 1998) tem capacidade de produzir sementes quando as polinizações são realizadas logo após a emasculação. Mesmo no subgênero *Symphyomyrtus* são observadas espécies com taxa mais lenta de desenvolvimento floral. Em *E. urnigera*, por

exemplo, a receptividade do estigma ocorre entre o 13-28 dias após a antese (Savva, Potts e Reid, 1988). Contudo, é válido ressaltar que o *E. urnigera* floresce no inverno, enquanto a maioria das espécies acima citadas florescem no verão (Oddie e McComb, 1998).

O período de máxima receptividade é bastante variável e polinizações controladas utilizando *E. regnans* mostraram que a maior eficiência das polinizações ocorreu entre o 10-14 dias após a antese (Griffin e Hand, 1979).

Em *E. grandis*, verificou-se que a maioria do pólen aplicado nas polinizações realizadas logo após a antese é perdido, pois o estigma não se encontra no período de maior receptividade (Hogson, 1976b). O mesmo autor verificou o período de receptividade do estigma em *E. grandis* baseando-se na produção de sementes e germinação do pólen no estigma e constatou que o período de maior receptividade é observado entre o segundo e o sexto dia após a antese, com máxima receptividade no quarto dia após a antese (Hogson, 1976a e b).

Em trabalhos realizados com *E. cinerea*, *E. macarthuri* e *E. occidentalis* foi observado que os estigmas mostraram-se mais receptivos em um período entre 2 e 3 dias após a antese (Polunina, 1959), enquanto que para *E. woodwardii*, Sedgley e Smith (1989) e Sedgley (1989), o período de maior receptividade ocorreu sete dias após antese. Esse período coincidiu com a máxima pegajosidade e entumescimento do estigma. Em *E. dunnii*, foi verificado que para uma maximização da eficiência das polinizações controladas e, conseqüentemente, uma melhor produção de sementes, esta deve ser realizada no sexto dia após a antese (Sousa e Pinto, 1994).

Oddie e McComb (1998) definiram o melhor período de receptividade do estigma de *E. camaldulensis* através de avaliações sobre o pico de produção de sementes e análises do desenvolvimento do tubo polínico no estigma. Os autores verificaram que flores polinizadas até três dias após a antese

apresentaram o máximo de sementes por fruto (45 a 55 sementes por fruto com 95% a 100% de eficiência nas polinizações).

As modificações na morfologia e viscosidade do estigma são características importantes que podem auxiliar na determinação do período de maior receptividade do estigma, indicando o melhor momento para a realização da polinização artificial. Contudo, uma estratégia mais segura para estabelecer o período ótimo de receptividade do estigma, garantindo maior sucesso nas polinizações artificiais, seria estabelecer o período de maior receptividade utilizando dias após a antese (Hogson, 1976a).

Além da variação do melhor período de receptividade entre as espécies de eucalipto, há evidências de que a receptividade do estigma é afetada pela temperatura e diferença de altitude (Hogson, 1976 a e b; Eldridge et al., 1993; Savva, Potts e Reid, 1988). As espécies que ocupam locais com altas altitudes e florescem no inverno, como, por exemplo, *E. urnigera*, demoram mais para se tornarem receptivas, enquanto, nas espécies que florescem no verão, como *E. camaldulensis*, a receptividade ocorre mais rapidamente (Oddie e McComb, 1998).

Assim, o conhecimento do período de maior receptividade do estigma é de grande importância para aumentar a eficiência das hibridações artificiais, podendo possibilitar uma racionalização do processo quando se verifica que as polinizações realizadas logo após a emasculação não diferem significativamente das realizadas no período de maior receptividade.

2.6 Armazenamento e viabilidade do pólen

O armazenamento do pólen justifica-se em programas de hibridação quando há defasagem no florescimento entre as espécies parentais ou clones de interesse, ou quando os mesmos se encontram em regiões distintas.

Apesar de parecer um procedimento simples, cuidados durante a extração e o armazenamento do pólen são necessários, uma vez que há a tendência de queda de seu poder germinativo.

A extração do pólen pode ser realizada à seco, em água e/ou solventes orgânicos, como acetona, éter etílico e éter petróleo (Griffin, 1982; Cangiani, 1988; Sousa, 1988). Alguns trabalhos têm demonstrado que a extração do pólen de *Eucalyptus* em água, seguida de dupla filtragem, secagem em dessecador com sílica gel e armazenamento sob baixas temperaturas é um método bastante eficiente (Griffin, 1982; Cangiani, 1988). Contudo, Sousa (1988), trabalhando com várias espécies do gênero *Eucalyptus*, verificou que a extração a seco é mais indicada do que a feita em água ou solventes orgânicos. A autora comenta isso se deve à degeneração de proteínas do pólen quando em contato com água, o que levaria a uma perda do seu poder germinativo .

Além do tipo de extração, a viabilidade do pólen pode ser afetada por fatores genéticos, fisiológicos e condições de armazenamento (Sousa, 1988; Shivanna e Johri, 1989).

Para a maioria das espécies, baixas temperaturas e umidades de armazenamento favorecem a longevidade do pólen, pois diminuem a atividade metabólica e ação de microorganismos como fungos e bactérias (Stanley e Linskens, 1974; Mattews e Kraus, 1981; Martins, Prera e Kageyama, 1981; Wyk, 1981). A baixa umidade do pólen (8-10%) propicia um bom armazenamento, independente do método a ser empregado, embora, o teor de umidade adequado para um bom armazenamento varie entre as espécies (Sprangue e Johnson, 1977; Goddard e Mattews, 1981; Haunold e Stanwood, 1985). As gramíneas, por exemplo, requerem alta umidade e normalmente seu pólen tem longevidade menor que a maioria das espécies (Adhikari et al., 1998). Em estudos com milho foi verificado que os grãos de pólen não suportam uma redução de umidade equivalente a 50% sem perda de suas funções normais. Em

reduções superiores a esse nível, os tubos polínicos não se formaram ou morreram (Barnabás, 1985).

A importância da redução da umidade do pólen é enfatizada para armazenamento a curto prazo (Snyder e Clausen, 1974).

Vários métodos são utilizados para reduzir a umidade do pólen a teores desejados, tais como: secagem à vácuo, uso de sílica-gel, ácido sulfúrico, hidróxido de potássio, cloreto de cálcio e a liofilização (Stanley e Linskens, 1974). Este último já é usado com sucesso em espécies florestais (Wright, 1976).

Vários estudos sobre armazenamento de pólen de *Eucalyptus* têm sido relatados com detalhes (Boden, 1958; Gabrielli, Cunha e Maule, 1965; Borges, Silva e Ferreira, 1973; Cauvin, 1984; Cangiani, 1988; Sousa, 1988). Para o armazenamento, o pólen deve ser coletado de botões florais próximos a abscisão, em seguida procede-se a secagem, que preferencialmente, deve ser feita com sílica-gel, uma vez que dessecantes como cloreto de cálcio, hidróxido de potássio e ácido sulfúrico podem causar danos aos grãos de pólen. Temperaturas baixas são recomendadas para armazenamento de pólen de eucalipto.

Uma nova forma de armazenamento de pólen foi proposta por Griffin et al. (1982). Nesse caso, os autores separaram o pólen das estruturas estaminais utilizando água destilada, através de um processo de dupla filtragem. O pólen foi, então, depositado sobre um filtro de miliporo. Esses filtros foram secos sobre sílica-gel e, em seguida, cortados em tiras e armazenados em frascos à temperatura de -16°C . Os autores enfatizam que se deve tomar cuidado com a extração úmida devido ao problema de eluição das proteínas da parede do pólen. Através desse método, os autores armazenaram pólen de *E. regnans* nas temperaturas de 5°C e -16°C , avaliaram a viabilidade aos 36 dias e 12 meses de armazenamento e concluíram que a conservação em temperatura ambiente foi adequada para um período de 36 dias, mas uma alta viabilidade foi mantida por

um ano, à -16°C . Resultados parecidos, usando este método, foram obtidos por Cangiani (1988) trabalhando com *E. camaldulensis*.

Outra maneira de armazenamento de pólen bastante atrativa é através do emprego de solventes orgânico. Contudo, para o gênero *Eucalyptus* não se dispõe de resultados positivos. Sousa e Gonçalves (1986) verificaram que o pólen de *E. camaldulensis* tratado com éter etílico e de *E. urophylla* tratado com acetona, visando o armazenamento, não germinaram devido à desidratação excessiva.

Sousa (1988) avaliou diferentes métodos de extração e armazenamento de pólen de *Eucalyptus* spp. verificando que a extração do pólen à seco é mais adequada do que em água e solventes orgânicos (acetona, éter etílico e éter petróleo) e que o armazenamento do pólen em “freezer” (-16°C) foi mais eficiente do que em refrigerador (4°C), em um período de três meses.

Além de métodos adequados de armazenamento é importante, também, o conhecimento da viabilidade do grão de pólen armazenado, um fator importante para garantir o sucesso das hibridações controladas.

A viabilidade do pólen pode ser determinada através de métodos “in vivo” ou “in vitro” (Shivanna e Rangaswamy, 1992).

Nos testes de germinação “in vivo”, deposita-se o grão de pólen em estigma receptivo. Após um determinado tempo o estigma é destacado e em seguida procede-se a contagem do número de tubos polínicos que penetraram no estigma (Stanley e Linskens, 1974). Contudo, alguns eventos podem dificultar a prática do método de germinação “in vivo”, tais como: a dificuldade da penetração do tubo polínico na superfície cuticular; a presença de água no estigma podendo levar à ruptura do pólen, impedindo a germinação; a não receptividade do estigma ou a incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo; a aplicação de alta concentração de pólen que poderá inibir a penetração do tubo polínico no estilete; a ocorrência de uma queda acentuada na

temperatura, podendo modificar drasticamente a germinação do pólen “in vivo”, conduzindo a uma viabilidade aparentemente alta; e a dificuldade de identificar os tubos polínicos dos grãos germinados no estigma.

A avaliação da viabilidade do pólen “in vivo” também pode ser feita através de sua capacidade em produzir sementes (Stanley e Linskens, 1974). Contudo, o tempo é um dos fatores que mais influencia o seu emprego. Para pinho, por exemplo, são necessários 20 meses para produção de sementes e para a maioria das angiospermas, são necessários 1 a 3 meses.

Nos testes “in vitro” a viabilidade pode ser verificada por meio da germinação do pólen ou pela utilização de corantes específicos .

Nos testes de germinação “in vitro”, o pólen é espalhado sobre um meio, que no caso das espécies de *Eucalyptus* envolve sempre sacarose (Boden, 1958; Gabrielli, Cunha e Maule, 1965; Cangiani 1988) e a viabilidade é observada por meio da porcentagem de grãos de pólen germinados. Cangiani (1988) comenta que para *E. camaldulensis*, é aconselhável um meio para a germinação “in vitro” constituído de 0.8% de ágar e 20% de sacarose. De acordo com Sousa (1988), um meio com 0.8% ágar e 30% sacarose é suficiente para avaliar a viabilidade do pólen da maioria das espécies de eucalipto, uma vez que a adição de outros nutrientes depende de vários fatores, como, por exemplo, o estado nutricional da planta doadora de pólen.

X A avaliação da viabilidade do pólen através do uso de corantes é bastante atrativa, especialmente pela rapidez na obtenção dos resultados. Contudo, a validade deste método tem sido questionada devido a problemas que têm surgido com o uso de corantes como, por exemplo, a coloração de grãos de pólen inviáveis de híbridos ou grãos imaturos ou abortados. Além disso, pólen que apresenta uma leve coloração pode exibir alta viabilidade (Stanley e Linskens, 1974).

Vários corantes têm sido empregados com este propósito, como: azul de algodão em lactofenol, azul de anilina em lactofenol, iodeto de potássio, carmin-acético, metil-floxina verde e tetrazólio nitro-azul (Hauser e Morrison, 1964; Stanley e Linskens, 1974). O emprego de corantes tem demonstrado que a porcentagem de viabilidade normalmente é mais alta do que aquela obtida por germinação (Galletta, 1983).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos de campo foram conduzidos na V & M Florestal, em Paraopeba-MG, localizada a 19°17' S de latitude, 44° 29'W de longitude e 700m de altitude, com temperatura mínima anual de 15°C e máxima de 24°C, precipitação média anual de 1.353 mm e deficit hídrico de 40-100 mm. As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras/MG.

3.2 Alternativas experimentais

Foram conduzidos dois trabalhos distintos. No primeiro foi avaliado o período de maior receptividade do estigma após a emasculação e, no segundo, foi feita a avaliação da viabilidade do pólen armazenado.

3.2.1 Avaliação do período de maior receptividade do estigma após a emasculação

O período de maior receptividade do estigma foi determinado por meio de características que indicaram a eficiência dos cruzamentos como: o desenvolvimento do tubo polínico *in vivo* e a produção de sementes.

3.2.1.1 Material genético

O material experimental para a avaliação do período de maior receptividade do estigma após a emasculação foi constituído por 5 clones de *E.camaldulensis* (PSME1 Camaldulensis 04, PSME2 Camaldulensis 18, PSME2 Camaldulensis 19, PSME2 Camaldulensis 31 e PSME1 Camaldulensis 42) e 4 clones de *E.urophylla* (PSME1 Urophylla 01, PSME1 Urophylla 07, PSME1 Urophylla 20, PSME1 Urophylla 30).

3.2.1.2 Condução do experimento

Foram realizadas 6 polinizações controladas utilizando clones de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh e de *Eucalyptus urophylla* St Blake, como seguem, lembrando que o primeiro genitor é sempre o feminino:

- PSME1-Urophylla 01 x PSME1- Camaldulensis 04
- PSME1-Urophylla 20 x PSME2- Camaldulensis 19
- PSME1-Urophylla 30 x PSME2- Camaldulensis 18
- PSME1-Urophylla 07 x PSME1- Camaldulensis 31
- PSME2- Camaldulensis 18 x PSME1- Urophylla 30
- PSME1- Camaldulensis 42 x PSME1- Urophylla 20.

Para a realização dos cruzamentos controlados foi utilizada a metodologia proposta por Assis, Jardim e Bauer (1998). Nos clones utilizados como genitores femininos, foram selecionados ramos contendo botões florais próximos da antese. Esses botões florais foram emasculados, lavados com água destilada e em seguida os botões florais foram submetidos a isolamentos individuais, onde apenas o estigma foi protegido. A proteção foi feita encaixando-se finos tubos plásticos coloridos sobre os estigmas, os quais foram fechados em suas extremidades superiores com pequenos chumaços de algodão.

A fixação do tubo protetor no estigma foi feita com fita adesiva. As polinizações controladas foram realizadas em 5 estágios diferentes do desenvolvimento floral: no mesmo dia da emasculação, 1, 3, 5 e 7 dias após a emasculação. Em cada polinização, foram coletados 25 pistilos em diferentes horários após a polinização (6h, 24h, 48h, 72h e 96h). Os pistilos coletados foram fixados em FAA (6 álcool absoluto: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) por 24 horas e armazenados em álcool 70% à 4°C até a avaliação. Para análise do tubo polínico, os pistilos foram hidratados em água deionizada por 30 minutos, e em seguida hidrolisados em NaOH 8 N a 60°C. Posteriormente, os pistilos foram submetidos a um banho em água deionizada gelada por 10 minutos, clareados em hipoclorito de sódio 1% e corados com azul de anilina 0.1% , usando-se como solvente uma solução de fosfato de potássio 0.1N, por quatro a seis horas. Em seguida, os pistilos foram colocados em lâminas microscópicas com uma a duas gotas de glicerol 80%, cobertos com lamínulas e levemente esmagados. As lâminas foram, então, observadas em Microscópio de Fluorescência Olympus BX60, com excitação violeta com filtro excitador de 390nm a 420nm e filtro de barreira 450nm.

A receptividade do estigma foi estudada em função da presença de grãos de pólen germinando no estigma, abundância de tubos polínicos ao longo do estilete e no ovário.

A produção de sementes foi avaliada na 14^a a 16^a semana após as polinizações quando os frutos já se encontravam maduros, considerando as seguintes estimativas:

-porcentagem de vingamento dos frutos (PV) = (número de cruzamentos vingados/ número de cruzamentos realizados) x100;

-número de sementes por polinização (NSP) = número de sementes produzidas/número de polinizações realizadas;

-número de sementes por fruto (NSF) = número de sementes produzidas/
número de frutos vingados;

-porcentagem de germinação das sementes produzidas (PG) = (número
de sementes germinadas/ número total de sementes)x100.

3.2.1.3 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos para porcentagem de vingamento dos frutos, número de sementes por polinização, número de sementes por fruto e porcentagem de germinação foram submetidos à análise de variância entre/dentro, considerando o efeito de cruzamento dentro de época e vice-versa. As análises foram realizadas pelo programa MSTAT, considerando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij}: m + a_i + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} : é a observação referente à época i dentro da espécie j ;

m : média geral;

a_i : é o efeito da época de polinização i ;

$e_{j(i)}$: é o efeito da espécie j dentro da época i .

3.2.2 Avaliação da viabilidade do pólen armazenado *in vitro*

A viabilidade do pólen *in vitro* foi estudada por meio da germinação dos grãos de pólen em meio de cultura.


3.2.2.1 Material genético

Para a avaliação da viabilidade do pólen *in vitro* foram armazenados grãos de pólen de 3 clones de *E. camaldulensis* (Camaldulensis 04, Camaldulensis 19 e Camaldulensis 42) e 3 clones de *E. urophylla* (Urophylla 01, Urophylla 07 e Urophylla 40).

3.2.2.2 Condução do experimento

Nos clones citados no item 3.2.2.1, foram selecionados ramos com botões florais cujos opérculos estavam próximos do período de abscisão. As anteras, coletadas juntamente com suas estruturas estaminais, tiveram os teores de umidade reduzidos utilizando um dessecador com sílica gel por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a retirada dos grãos de pólen, os quais foram transferidos para frascos de vidros (8ml) com tampas de borracha e armazenados em freezer por 1, 2 e 3 meses.

A viabilidade do pólen armazenado foi comparada com a de grãos de pólen frescos por meio de germinação *in vivo*. Para isso, foi preparado meio de cultura contendo 30% de sacarose e 0.8% de ágar. Os elementos constituintes do meio foram diluídos em água destilada e dissolvidos em forno de microondas até a dissolução completa do ágar. O meio, ainda quente, foi colocado em lâminas de vidro adaptadas com anéis plásticos que substituíram o uso de lâminas escavadas. Os grãos de pólen foram espalhados sobre o meio, ligeiramente morno, com auxílio de um pincel. As lâminas foram colocadas em placas de Petri, com papel de filtro umedecido e incubadas em estufa com temperatura de 27° C, durante 24 horas. Foram avaliadas 5 lâminas por clone e por período de armazenamento, sendo avaliados 100 grãos de pólen por lâmina. A viabilidade do pólen foi dada em função da porcentagem de pólen germinado, sendo



considerandos como germinados aqueles grãos de pólen que haviam emitido tubo polínico, conforme sugerido por Cook e Stanley (1960) enfatizado por Sousa (1988).

3.2.2.3 Análise estatística dos dados

Para a análise *in vitro* da viabilidade do pólen armazenado, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando-se 5 repetições, sendo que cada repetição foi constituída por uma lâmina na qual foram avaliados 100 grãos de pólen. Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = m + s_i + a_{j(i)} + c_{k(ji)} + e_{ijkl}$$

em que:

Y_{ijkl} : é o valor observado na espécie i , época j , clone k , repetição l ;

m : média geral;

s_i : efeito da espécie i , $i = 1, 2$;

$a_{j(i)}$: efeito de época j , $j = 1, 2, 3, 4$, dentro da espécie i ;

$c_{k(ji)}$: efeito do clone $k=1, 2, 3$, dentro da época j dentro da espécie i ;

$e_{l(ijk)}$: efeito da repetição l dentro da espécie i , na época j , no clone k .

3.2.3 Avaliação da viabilidade do pólen armazenado *in vivo*

A avaliação da viabilidade do pólen armazenado *in vivo* foi feita por meio da observação da germinação do pólen no estigma, bem como pela presença de tubos polínicos ao longo do estilete e interior do ovário.

3.2.3.1 Material genético

Foram utilizados 3 clones de *E.camaldulensis* (PSME2- camaldulensis 23, PSME1- camaldulensis 46 e PSME1 camaldulensis 42) e 2 clones de *E. urophylla* (PSME1- urophylla 01 e PSC-Ta.04- urophylla clone 57).

3.2.3.2 Condução do experimento

A coleta e armazenamento dos grãos de pólen foi realizada conforme a metodologia descrita no item 3.2.2.2.

A viabilidade do pólen foi avaliada através de testes de germinação *in vivo* por 15, 30, 45 ou 60 dias de armazenamento. As polinizações controladas e o tratamento dos pistilos coletados para avaliação microscópica foram realizadas de acordo com as metodologias descritas no item 3.2.1.2. Foram avaliados somente nos pistilos coletados 72 horas após as hibridações.

4 RESULTADOS

4.1 Receptividade do estigma após a emascação

Inicialmente é preciso comentar que foi feita a coleta de pistilos após as diferentes polinizações, considerando aquelas realizadas simultaneamente à emascação, com um dia e três dias após a emascação. Constatou-se que em todos os casos foi possível observar a presença de grãos de pólen germinando no estigma, tubos polínicos ao longo do estilete e interior do ovário (Figura 1). Entretanto, houve diferença na quantidade em função da época, ficando bem evidente que eles foram muito mais frequentes nas polinizações realizadas três dias após a emascação.

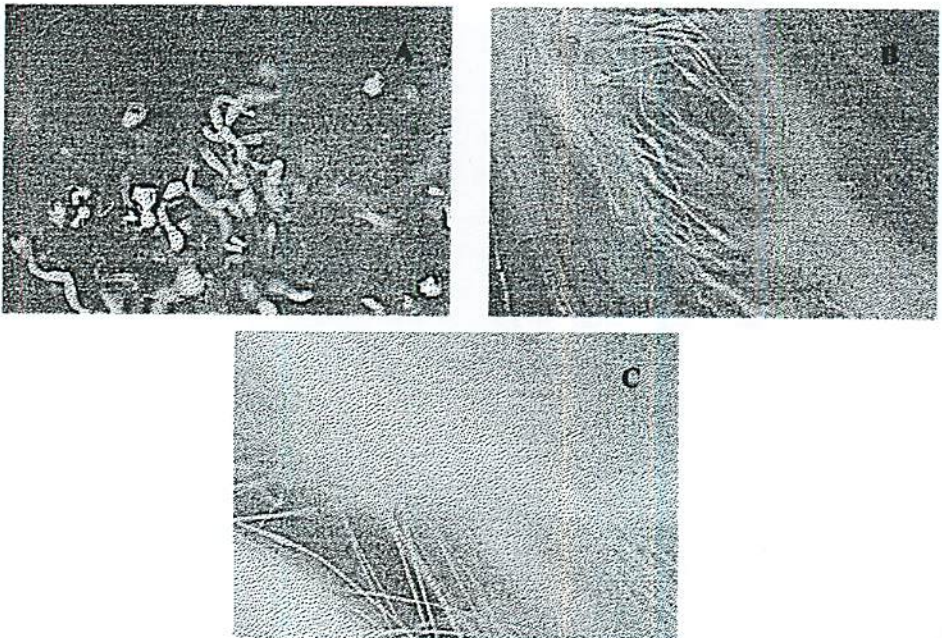


Figura 1 Grãos de pólen germinando no estigma (A), tubos polínicos ao longo do estilete e interior do ovário (C). UFLA, Lavras, 2001.

Como já mencionado, as análises de variância foram realizadas procurando-se verificar o efeito das combinações híbridas e, posteriormente, da época de polinização. Inicialmente é oportuno salientar que a precisão experimental foi na maioria dos casos baixa, isto é, coeficiente de variação alto. Veja que só foi detectada diferença significativa entre híbridos ($P \leq 0.01$), apenas para a porcentagem de vingamento (Tabela 1).

Os resultados médios apresentados na Tabela 2 mostram que a porcentagem de vingamento foi alta e que a maior média para a porcentagem de vingamento foi observada nas combinações U01xC04 e U30xC18, ambas com 100% de vingamento. Já a combinação C42xU20 apresentou a menor média de vingamento dos frutos, apenas 46%. Embora não fosse detectada diferença significativa para o número de sementes por polinização (NSP), número de sementes por fruto (NSF) e porcentagem de germinação das sementes (PG), provavelmente em função da precisão experimental, observou-se variação para esses caracteres. Novamente, as combinações U01xC04 e U30xC18 foram as que apresentaram maiores valores para os três caracteres (Tabela 2).

TABELA 1 Resumo das análises de variância da porcentagem de vingamento dos frutos (PV), número de sementes por polinização (NSP), número de sementes por fruto (NSF) e porcentagem de germinação (PG) dos seis diferentes híbridos. UFLA, Lavras, 2001.

FV	GL	QM			
		PV	NSP	NSF	PG
Entre híbridos	5	2189.86**	438.58	309.49	229.75
Dentro	24	212.86	218.21	284.19	313.42
CV(%)		18.42	95.76	93.82	20.96
Média		79.19	15.43	17.97	84.48

**= significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 2 Resultados médios obtidos para as diferentes combinações híbridas para os caracteres porcentagem de vingamento de frutos (PV), número de sementes por polinização (NSP), número de sementes por fruto (NSF) e porcentagem de germinação das sementes (PG) entre os diferentes híbridos realizados entre *E. camaldulensis* e *E. urophylla*. UFLA, Lavras, 2001.

Cruzamentos	PV	NSP	NSF	PG
U01xC04	100 a	25 a	25 a	73 a
U20xC19	84 b	15 a	18 a	86 a
U30xC18	100 a	27 a	27 a	89 a
C18xU30	65 c	9 a	11 a	91 a
U07xC31	80 b	15 a	20 a	88 a
C42xU20	46 c	2 a	6 a	80 a
Médias	79.19	15.43	17.97	84.48

*médias numa mesma coluna seguidas de mesma letra não diferem estaticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

Quando se considera o efeito de épocas, os resultados da estimativa do CV foram semelhantes aos relatados anteriormente, isto é, a precisão também foi baixa na avaliação de todos os caracteres. Só foi detectada diferença significativa entre o número de sementes por polinização (NSP) e o número de sementes por fruto (NSF) (Tabela 3).

Chama atenção, que a porcentagem de vingamento (PV) foi alta independentemente da época de polinização, indicando que a eficiência do cruzamento, avaliada pelo vingamento dos frutos, foi a mesma independente da época. O mesmo fato ocorreu para a porcentagem de germinação. Com relação ao número de sementes por polinização observa-se que esse foi bem superior quando as polinizações foram realizadas com 3 ou 5 dias após a emasculação. Evidentemente, esse resultado foi o mesmo para o número de sementes por fruto (Tabela 4).

TABELA 3 Análise de variância da porcentagem de vingamento dos frutos (PV), número de sementes por polinização (NSP), número de sementes por fruto (NSF) e porcentagem de germinação (PG) dos híbridos realizados nas cinco diferentes épocas de polinização. UFLA, Lavras, 2001.

FV	GL	QM			
		PV	NSP	NSF	PG
Entre épocas	4	658.107	791.312**	1196.972**	473.522
Dentro	25	537.021	170.584	143.203	271.072
CV (%)		29.16	84.67	66.60	19.49
Médias		79.19	15.43	17.98	84.48

**= significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 4 Resultados médios obtidos para as diferentes épocas de polinização para os caracteres porcentagem de vingamento de frutos (PV), número de sementes por polinização (NSP), número de sementes por fruto (NSF) e porcentagem de germinação das sementes (PG) entre as polinizações realizadas em diferentes épocas após a emasculação UFLA, Lavras, 2001.

Épocas/Dias	PV	NSP	NSF	PG
0	71 a	5.75 b	6.40 b	84.90 a
1	90 a	12.45 b	13.40 b	90.10 a
3	65 a	25.87 a	34.10 a	88.21 a
5	85 a	29.05 a	31.82 a	90.17 a
7	85 a	4.00 b	4.09 b	69.05 a
Médias	79.19	15.43	17.98	84.48

* médias numa mesma coluna seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

4.2 Viabilidade do pólen armazenado

A viabilidade do pólen armazenado foi verificada por meio de testes de germinação *in vitro* e *in vivo*. Para os testes de germinação *in vitro* foi realizada a avaliação da viabilidade do pólen fresco e armazenados por 1, 2 ou 3 meses. De acordo com a Tabela 5 verifica-se diferenças significativas ($P \leq 0.01$) entre as espécies e épocas dentro de cada espécie contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os clones dentro de uma mesma época e espécie. Constatou-se que ocorreu decréscimo na viabilidade do pólen com o decorrer do armazenamento (Figura 2). O decréscimo, avaliado pelo coeficiente de regressão b , foi mais acentuado no pólen de *E. camaldulensis* ($b = -4.34$) do que em *E. urophylla* ($b = -0.939$). Assim em *E. camaldulensis* para cada mês de armazenamento é esperada uma redução de 4,34% na viabilidade do pólen. Vale salientar contudo, que mesmo com 3 meses de armazenamento mais de 40% dos pólenes ainda estavam viáveis, tanto em *E. camaldulensis* como em *E. urophylla*.

TABELA 5 Análise da variância da porcentagem de germinação *in vitro* do pólen fresco e armazenado nas três diferentes épocas de avaliação. UFLA, Lavras, 2001.

FV	GL	QM
		Germinação
Entre espécies	1	1562.41**
Entre épocas/espécie	6	261.03**
Entre clones/época/espécie	16	43.80
Erro	96	30.32
CV (%)	11.97	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

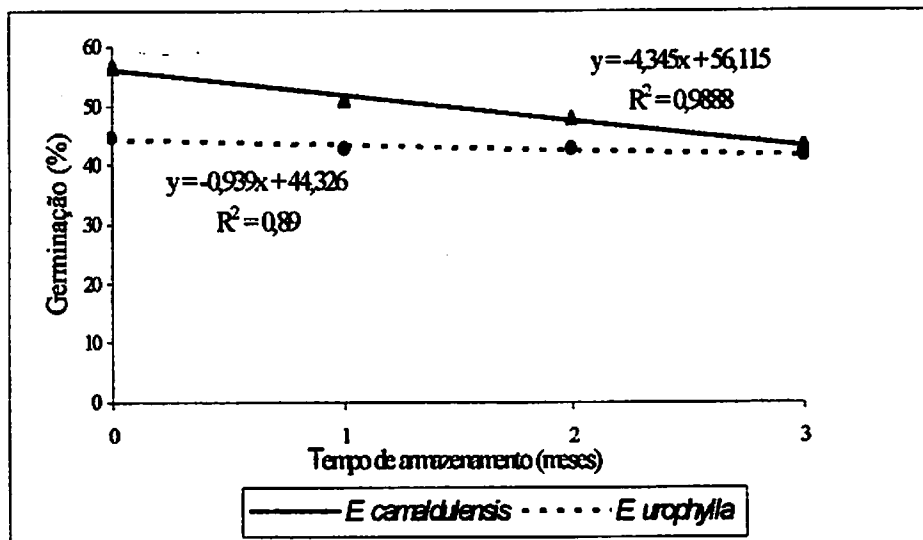


FIGURA 2 Equação de regressão da porcentagem de germinação do pólen em função da época de armazenamento para *E. camaldulensis* e *E. urophylla*. UFLA, Lavras, 2001.

Embora não fosse detectada diferença significativa entre clones dentro de época e espécie pelo teste F, observa-se que o clone 04 de *E. camaldulensis* na média das 4 épocas apresentou viabilidade maior do que os demais, o mesmo ocorrendo para o clone 01 de *E. urophylla* em relação aos demais (Tabela 6). É oportuno salientar que a diferença de viabilidade entre os clones foi inferior a 5%.

TABELA 6 Resultados médios da viabilidade do pólen fresco e armazenado por 1, 2 e 3 meses germinação para os diferentes clones de *E. camaldulensis* e *E. urophylla*. UFLA, Lavras, 2001.

<i>E. camaldulensis</i>	Germinação (%)	<i>E. urophylla</i>	Germinação(%)
Camaldulensis 04	52.60 a	Urophylla 01	44.60 a
Camaldulensis 19	48.05 b	Urophylla 07	40.90 b
Camaldulensis 42	48.15 b	Urophylla 40	38.20 b

* médias numa mesma coluna seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott.

Com relação a análise da viabilidade do pólen armazenado *in vivo* não se verificou diferenças de viabilidade em função do tempo de armazenamento, constando-se em todos os casos alta frequência de tubos polínicos em desenvolvimento ao longo do estilete e no interior do ovário.

5 DISCUSSÃO

As duas espécies foram escolhidas porque a *E. camaldulensis* é muito rústica e bem adaptada à região Noroeste do estado de Minas Gerais, já a *E. urophylla*, embora não possua a mesma rusticidade da espécie anterior, associa fenótipos favoráveis para a produção de madeira serrada e carvão e apresenta boa produtividade. Vale salientar que embora sejam consideradas espécies diferentes, isso ocorre apenas no conceito tipológico (Mayr, 1977), já que se cruzam produzindo descendentes férteis e viáveis. Além do mais, essas duas espécies apresentam boa capacidade de combinação e, por essa razão, estão merecendo grande atenção dos melhoristas nos programas de hibridação.

A região de Paraopeba, onde foram conduzidas as hibridações, se caracteriza por apresentar altas temperaturas e precipitação concentrada nos meses de outubro a fevereiro, sendo, provavelmente, uma condição bem distinta das que foram realizadas os demais trabalhos sobre polinização em *Eucalyptus* (Griffin e Hand, 1979; Sedgley e Smith, 1989; Sousa e Pinto, 1994; Oddie e McComb, 1998).

As polinizações artificiais em *Eucalyptus* não são difíceis, pois as flores são grandes, em grande número e apresentam amplo período de floração (Potts e Gore, 2000). Contudo, devido à altura das plantas, a operação torna-se complicada, exigindo do melhorista estratégias para tornarem viáveis as polinizações. Uma delas é a construção de andaimes para facilitar ao operador atingir as flores. Esse processo, além de caro, é trabalhoso, apresentando pequena flexibilidade e restringindo o número de combinações a serem feitas. Uma outra alternativa é a enxertia, que possibilita o florescimento com menor altura contudo também restringe as combinações. O ideal é identificar as árvores que se deseja cruzar e no campo mesmo realizar as hibridações, utilizando para

isto, uma escada ou outro artifício para atingir as flores. Para que esse procedimento seja eficaz, é necessário, por exemplo, que a emasculação e a polinização sejam realizadas simultaneamente. Na literatura, é mencionado que a maior eficiência das polinizações ocorre quando as flores são polinizadas alguns dias após a emasculação, isto é, no período de maior receptividade (Polunina, 1959; Sedgley e Smith, 1989; Sousa e Pinto, 1994; Oddie e McComb, 1998).

Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciaram que as polinizações realizadas três dias após a emasculação foram mais eficientes (Tabela 4). Isto coincide com os resultados obtidos por Oddie e McComb (1998) trabalhando com *E. camaldulensis*. Contudo, ficou evidente que é possível ter sucesso nas polinizações realizadas logo após a emasculação. Nesse caso, constatou-se que o vingamento dos frutos foi praticamente o mesmo, embora o número de sementes por frutos fosse menor. Assim, essa operação pode ser realizada rotineiramente e caso haja necessidade de um grande número de sementes, pode-se compensar aumentando o número de polinizações.

Com relação às combinações híbridas, nota-se que elas diferem quanto à eficiência das hibridações, mas em nenhum caso foi constatada porcentagem de vingamento que inviabilizasse o programa de melhoramento haja vista que a menor porcentagem de vingamento foi de 46% (Tabela 2). Embora não fosse realizado um estudo mais detalhado, aparentemente o maior vingamento é esperado quando se utilizam clones de *E. urophylla* como fêmeas. Alguns fatores poderiam ter influenciado essa diferença. Um deles é o tamanho da flor, uma vez que as flores de *E. camaldulensis* são menores que as de *E. urophylla*, sendo portanto, o manuseio é mais difícil, tornando-as mais suscetíveis a danos durante o processo de emasculação.

Contudo, é válido comentar que novos estudos devem ser realizados procurando aumentar a eficiência das polinizações controladas. Por exemplo,

verificar e eficiência das polinizações realizadas logo após a emasculação porém sem proteção das flores, tornaria o processo mais rápido, prático e econômico. Entretanto, para esse processo tornar-se viável, seria necessário o emprego de algum gene marcador e/ou técnicas moleculares, visando verificar se realmente ocorreu a hibridação desejada.

Um outro problema no melhoramento por hibridação no *Eucalyptus* é que nem sempre há coincidência de florescimento das plantas a serem cruzadas; também, em muitos casos, elas podem estar localizadas em regiões distintas. Para isso, a principal opção é o armazenamento do pólen. Contudo, esse pólen deve evidentemente manter sua viabilidade. Nesse trabalho ficou evidenciado que os pólenes perdem sua viabilidade com o tempo de armazenamento. Essa perda foi maior em *E. camaldulensis*, cerca de 4.4% por mês, e em *E. urophylla* não chegou a 1% por mês. No entanto, mesmo com 4 meses de armazenamento a porcentagem de pólenes viáveis foi superior a 40%.

O pólen de *E. camaldulensis*, como mostra a Tabela 6, tem maior viabilidade que o de *E. urophylla*. Além disso, durante a avaliação da germinação *in vitro*, observou-se que o *E. camaldulensis* emite e desenvolve mais rapidamente seu tubo polínico. Observou-se, também, que sob condições de armazenamento, o pólen de *E. camaldulensis* tende a uma queda gradativa de viabilidade enquanto que em *E. urophylla*, a viabilidade manteve-se constante durante o período de armazenamento (Tabela 6). Resultados semelhantes foram obtidos por Sousa (1988) trabalhando com viabilidade de pólen de várias espécies do gênero *Eucalyptus*, inclusive *E. camaldulensis* e *E. urophylla*. Contudo, Cangiani (1988), trabalhando com *E. camaldulensis*, verificou que os grãos de pólen quando armazenados por 20, 40, 60, 80 e 100 dias, apresentaram maiores médias de viabilidade que o pólen fresco. É preciso ressaltar que Cangiani (1988) utilizou extração em água, enquanto que neste trabalho e no de Sousa (1988) a extração foi feita a seco para evitar a degeneração de proteínas

do pólen quando em contato com a água, o que poderia levar à perda do poder germinativo. Esses resultados evidenciam que o armazenamento de pólen em *Eucalyptus* é eficiente, haja vista que a quantidade de pólen que pode ser armazenada é muito acima das necessidades e a operação é muito simples, exigindo apenas que a umidade do pólen seja retirada fazendo uso de um dessecador. Caso não seja possível, um recipiente contendo algum dessecante, como, por exemplo, sílica gel, seria suficiente. Após o dessecamento, o armazenamento é feito sob baixa temperatura (-4° C). Como foi mencionado, com até 3 meses de armazenamento, tanto para os clones de *E. camaldulensis* como para os de *E. urophylla*, foi possível ter mais de 40% de viabilidade, que é uma porcentagem alta em função da quantidade de pólen que é usada nas polinizações. É importante salientar que 4 meses são, sob o ponto de vista prático, tempo mais do que suficiente para dar maior flexibilidade às atividades de hibridação dos programas de melhoramento.

6 CONCLUSÕES

A eficiência da hibridação artificial variou entre as espécies e entre as épocas e foi maior em *E. urophylla*, especificamente quando a emasculação foi realizada de 3 a 5 dias antes da polinização. Contudo, independente da espécie, as polinizações realizadas simultaneamente à emasculação produziram um número suficiente de sementes, possibilitando que essa prática seja utilizada pelos melhoristas para facilitar o seu trabalho.

Apesar de ter ocorrido queda de viabilidade do pólen com o armazenamento em freezer (-4^o C) por até 3 meses, essa não foi suficientemente significativa a ponto de impedir o uso do pólen nas hibridações artificiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, K.N.; CAMPBELL, C.G. *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fgopyrum esculentum* Moench) pollen, *Euphytica*, Wageningen, v.102, n.1, p.87-92, 1998.
- ALLEN, B. Red Gum Country- the forest of the foodplains. *Forest and Timber*, Sydnei, v.15,n.3, p.2-8, 1979.
- ANDERSON, C.A. The anatomy and histochemistry of the pistil of *Eucalyptus obliqua* L'Herit. In: 'Pollination 84'. Melbourne: The University of Melbourne, 1984.
- ANDRADE, H.B. Avaliação das espécies e progenies de *Eucalyptus* L' Heritir (myrtaceae) nas regiões norte e noroeste do Estado de Minas Gerais. Lavras: ESAL, 1991. 165p. (Dissertação – Mestrado em Ciência Florestal).
- ANDRADE, M.C. Influência da casca de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden no rendimento e qualidade de carvão vegetal. Viçosa: UFV, 1989. 86p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ASSIS, T.F. de; JARDIM, N.S.; BAUER, J.F.S. Métodos alternativos de cruzamentos controlados em *Eucalyptus*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *EUCALYPTUS*, 1997, Salvador. Proceedings... Salvador: EMBRAPA, 1997. v.1, p.265-269.
- BARNABÁS, B. Effect of water loss on germination ability of maize (*Zea mays* L.) pollen . *Annals of Botany*, Oxford, v.55, n.2, p.201-204, Feb. 1985.
- BODEN R.W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. *Australian Forestry*, Camberra, v.12, n.2, p.73-81, Mar. 1958.
- BOLAND, D. J.; BROOKER, M.I.H.; CHIPPENDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JONHSTON, R.D.; KLEINIGG, D.A.; TURNER, J.D. *Forest trees of Australia*. Melbourne: Nelson-CSIRO Publishers, 1984. 687p.

- BOLAND, D.J.; SEDGLEY, M.** Stigma and style morphology in relation to taxonomy and breeding systems in *Eucalyptus* and *Angophora* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.34, p.569-584, 1986.
- BOLAND, D.J.; TURNBULL, J.W.** Selection of Australian trees other than eucalyptus for trials as fuelwood species developing countries. **Australian Forestry**, Brisbane, v.44, n.4, p.235-246, July 1981.
- BORGES, C.P.; SILVA, A.A.; FERREIRA, M.** Estudos preliminares sobre a conservação do pólen de *Eucalyptus* spp. IPEF, Piracicaba, v.6, p.3-32, jan./jun. 1973.
- BRUNE, A.** Estratégias de melhoramento genético de árvores para energia. In : **SYMPOSIUM ON PLANTATION FOREST IN THE NEOTROPICS IT'S ROLE AS SOURCE OF ENERGY**, Viçosa: IUFRO, 1983. 11p.
- CANGIANI, S.M.P.** Extração e armazenamento de pólen em *Eucalyptus camaldulensis*. Piracicaba: IPEF, 1988. (IPEF. Circular Técnica, 162)
- CATIE**, Centro agronomico tropical de Investigacion y ensinanza especies para leña: arbustos y árboles para la produccion de energia. Turrialba, Costa Rica, 1984. 343p.
- CAUVIN, B.** *Eucalyptus* hybridation controlee: premiers resultats, 1983. Versailles: AFOCEL, 1984. p.85-117. (Annales de Recherches Sylvicole)
- CHIPPENDALE, G.M.** *Eucalyptus, Angophora* (Myrtaceae). Canberra: Australian Government Publishing Service, 1988. (Flora of Australia, 19).
- COOK, S.A.; STANLEY, R.G.** Tetrazolium chloride as na indicator of pine pollen germinability. *Silvae Genetica*, Frankfurt, v.9, n.5, p.34-36, Sept./Oct. 1960.
- ELDRIDGE, K.G.** Breeding system of *Eucalyptus regnans*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *EUCALYPTUS*, 1970, Proceedings... Verparanta, Finland: IUFRO, 1970. v.1. (Section 22 Meeting).
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; WYK, G.V.** *Eucalypt* domestication and breeding. Oxford: [S.n.], 1993. 288p.

- EVANS, J. Site and species selection-changing perspectives. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v.21, p.299-310, 1987.
- FLORENCE, R.G. Cultural problems of *Eucalyptus* as exotics. *The Commonwealth Forestry review*, London, v.65, n.2, p.141-160, 1986.
- GABRIELLI, A.C.; CUNHA, R.A. ; MAULE, V. Conservação do pólen de diversas espécies de *Eucalyptus* para fins de cruzamento. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v.40, n.2, p.52-57, jun. 1965.
- GALLETTA, G.J. Pollen and seed mangement. In: MOORE, J.N.; JANICH, J. (eds). *Methods in fruit breeding*. Purdue, USA: Purdue University Press, 1983. p.23-47.
- GODDARD, R.E.; MATEWS, F.R. Pollen testing. In: USDA FOREST SERVICE. *Pollen Management Handbook*. Washington, 1981. p.40-43.
- GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOURA, V.P.G. Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil. Piracicaba: PRODEPEF, 1978. (PRODEPEF. Serie Técnica, 11).
- GRIFFIN, A.R. Pollination ecology of *Eucalyptus* – a framework for study. In: WILLIANMS, E.G.; KNOX, R.B.; GILBERT, J.H.; BERNHARDT, P. (eds). 'Pollination'82. Melbourne: Melbourne University, 1982. p.42-56. (Proceedings of the Symposium held at Melbourne University)
- GRIFFIN, A.R.; CHING, K.K.; JOHNSON, K.W.; HAND, F.F.; BUGESS, I. P. processing *Eucalyptus* pollen for use in controlled pollination. *Silvae Genetica*, Frankfurt, v.31, n.5/6, p.198-203, 1982.
- GRIFFIN, A.R.; HAND, F.C. Post-anthesis development of flowers of *Eucalyptus regmans* F-Muell and the timing of artificial pollination. *Australian Forest Research*, Melbourne, v.9, n.1, p.9-15, Apr. 1979.
- HALL, N.; JONHSTON, R.D.; CHIPPENDALE, G.M. *Forest trees of Australia*. Canberra: Australia Gov. Publishers, 1970. 334p.
- HAUNOLD, A.; STANWOOD, P.C. Long-term preservation of hop pollen in liquid nitrogen. *Crop Science*, Madison, v.25, n.1, p.194-196, Jan./Feb. 1985.

- HAUSER, E.J.P.; MORRISON, J.H. The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. *American journal of Botany*, New York, v.51, n.7, p.748-52, July 1964.
- HODGSON, L.M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *E. grandis* (Hill) Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station . 1. Flowering, controlled pollination methods, pollination and receptivity. *South African Forest Journal*, Pretoria, n.97, p.18-28, 1976a.
- HODGSON, L.M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *E. grandis* (Hill) Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station . 3. Relative yield, breeding systems, barriers to selfing and general conclusions. *South African Forest Journal*, Pretoria, n.97, p.18-28, 1976b.
- KAGEYAMA, P.Y. **Variação genética em progênies de uma população de *E. grandis* (Hill) Maiden.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1980. 125p. (Tese - Doutorado em).
- LOPEZ, C.R. **Variações fenotípicas e genéticas de *Eucalyptus urophylla* ST BLAKE da ilha de Flores (Indonésia).** Piracicaba: ESALQ/USP, 1992. 125p. (Dissertação - Mestrado em)
- MARTINS, M.E.; PRERA, L.E.H.; KAGEYAMA, P.Y. **Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético.** Piracicaba: IPEF, 1981. 8p. (IPEF. Circular Técnica, 128).
- MATTEWS, F.R.; KRAUS, J. Pollen storage. In: USDA FOREST SERVICE. **Pollen management handbook.** Washington, 1981. p.37-39.
- MAYR, E. **Populações, espécies e evolução.** São Paulo: Nacional, 1977. 485p.
- MIDGLEY, S.J.; ELDRIDGE, K.G.; DORAN, J.C. Genetic resource of *Eucalyptus camaldulensis*. *Commonwealth Forestry Review*, London, v.68, n.4, p.295-308, 1989.
- ODDIE, R.L.A.; McCOMB, J.A. Stigma receptivity in *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh . *Silvae Genetica*, Frankfurt, v.47, n.2/3, p.142-146, Sept. 1998.
- POLUNINA, N.N. The embryology of *Eucalyptus*. *Trudy glavnogo botanicheskogo Sada Leningrad*, v.6, p.191-210, 1959.

- POTS, B.; GORE, P. Reproductive biology and controlled pollination of *Eucalyptus*- a review. In: SYMPOSIUM ON HYBRID BREEDING AND GENETICS, 2000, Noosa, Australia.
- PRYOR, L.D. *The Biology of Eucalyptus*. Edward Arnold, 1976. 83p. (Studies in Biology, 61)
- PRYOR, L.D.; JOHNSON, L.A.S. *A classification of the Eucalyptus*. Canberra: Australian National University, 1971. 102p.
- RUY, F. *Variação da qualidade da madeira em clones de Eucalyptus urophylla ST BLAKE da ilha de Flores, Indonésia*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. 69p. (Dissertação - Mestrado em Tecnologia da Madeira).
- SAVVA, M.; POTTS, B.M.; REID, J.B. The breeding system and gene flow in *E.urnigera*. In: *Pollination '88*. Parkeville: University of Melbourne, 1988. p.176-182.
- SEDGLEY, M. Ovule and seed development in *Eucalyptus woodwardii* Maiden (Symphyomyrtus). *Botanical Gazette, Chicago*, v.150, n3, p.271-280, Sept. 1989.
- SEDGLEY, M.; SMITH, R.M. Pistil receptivity and pollentube growth in relation to the breeding system of *Eucalyptus woodwardii* (Symphyomyrtus: myrtaceae). *Australian Journal of Botany, Melbourne*, v.37, p.397-411, 1989.
- SHIVANNA, K.R.; JOHRI, B.M. *The angiosperm pollen, structure and function*. John Wiley and Sons, 1989.
- SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. *Pollen biology: a laboratory manual*. 1982. 119p.
- SNYDER, E.B.; CLAUSEN, K.E. Pollen handling. In: *USDA FOREST SERVICE. Seed of woody plants in the United States*. Washington, 1974. p.75-97.
- SOUSA, V.A. *Manejo e viabilidade do pólen de Eucalyptus SPP*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1988. 155p. (Dissertação - Mestrado em Ciências Florestais).

- SOUSA, V.A.; GONÇALVES, A.N. Efeitos de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 5., 1986, Olinda. Anais... Olinda: SBS/SBEF, 1986. p.76.
- SOUSA, V.A.; PINTO JUNIOR, J.E. Receptividade estigmática em *E. dunnii*. IPEF, Piracicaba, v.47, p.44-49, maio 1994.
- SPRANGUE, J.R.; JOHNSON, V.W. Extration and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14., 1977, Gainesville. Proceedings... Macon: Easteern Tree Seed, 1977. p.20-27.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen Biology Biochemistry Managemente**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307p.
- TURNBULL, J.W. The ecology and variation of *Eucalyptus camaldulensis* . **Forest genetics Resources Informations**, v.2, p.32-40, 1973.
- WRIGHT, J.W. **Introduction to Forest Genetics**. New York: Academic Press, 1976. 463p.
- WYK, G.V. Pollen management for *Eucalyptus*. In: USDA FOREST SERVICE. **Pollen management handbook**. Washington, 1981. p.84-88.