

ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DOS CRUZAMENTOS EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE *Eucalyptus*¹

Roselaine Cristina Pereira¹; Lisete Chamma Davide²;
Magno Antônio Patto Ramalho³; Helder Bolognani Andrade⁴

RESUMO: 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 pela avaliação da eficiência das polinizações realizadas logo após a emasculação e a viabilidade do pólen armazenado de clones de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus 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. O pólen foi armazenado em freezer (-18°C) por 1, 2 e 3 meses. A avaliação do pólen foi feita por meio de testes de germinação *in vitro* e *in vivo*. 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 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.

Palavras-chave: *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urophylla*, receptividade de estigma, viabilidade de pólen armazenado.

¹ Engenheiro Agrônomo, Mestre, DBI, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: rcristinapereira@yahoo.com.br

² Bióloga, Doutora, Professora Titular, DBI, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: lcdavide@ufla.br.

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Titular, DBI, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: magnoapr@ufla.br.

⁴ Engenheiro Florestal, Mestre, Pesquisador, V&M Florestal, Paraopeba, Minas Gerais, Brasil.

ALTERNATIVES TO IMPROVE HYBRIDIZATION EFFICIENCY IN *Eucalyptus* BREEDING PROGRAMS

ABSTRACT: 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 *Eucalyptus 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. Pollen was then collected and stored in a freezer (-18°C) for 1, 2 and 3 months. Pollen assessed was carried out by in vitro and in vivo germination tests. 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.

Key words: *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urophylla*, stigma receptivity, viability storage pollen.

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 à seleção massal, seguida da obtenção de clones das plantas superiores e da seleção com famílias de meios-irmãos visando à obtenção de populações melhoradas. Entretanto, para se continuar tendo resultados expressivos no melhoramento há necessidade de novas estratégias (Gonçalves et al., 2001). Essas estratégias obrigatoriamente irão exigir o emprego de polinizações manuais, o que não era necessário nos trabalhos de melhoramento até então utilizados.

Muito se conhece da biologia floral de *Eucalyptus* (Griffin & Hand, 1979; Cauvin, 1984; Sousa & Pinto, 1994; Oddie & McComb, 1998). Contudo, há escassez de informações sobre eficiência das polinizações artificiais entre as

espécies de eucalipto e os poucos trabalhos realizados mostram que ocorrem variações inter e intra-específicas, bem como a influência de fatores ambientais (Hogson, 1976a,b; Griffin & Hand, 1979 e Oddie & McComb, 1998). Então, informações sobre a época de se realizar 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*, foi conduzido o presente trabalho com o objetivo de obter informações sobre o período de receptividade do estigma após a emasculação. As informações orientarão os melhoristas sobre as estratégias para aumentar a eficiência na polinização artificial entre *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*, visando maximizar a obtenção de novas combinações híbridas. As duas espécies foram escolhidas por apresentarem boa ca-

pacidade de combinação. Além disso, *Eucalyptus camaldulensis* é uma espécie rústica e bem adaptada à região noroeste do estado de Minas Gerais e *Eucalyptus urophylla*, associa fenótipos favoráveis para a produção de carvão e apresenta boa produtividade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado pertence a V&M Florestal, localizada a 19°17'S de latitude, 44°29'W de longitude e 700m de altitude, temperatura mínima anual de 15°C e máxima de 24°C, precipitação média anual de 1.353 mm e déficit hídrico de 40-100mm. As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA. Foram realizados dois experimentos distintos; no primeiro, foi avaliado o período de maior receptividade do estigma após a emasculação e, no segundo, a viabilidade do pólen armazenado.

2.1 Avaliação da receptividade do estigma após a emasculação

A receptividade do estigma foi avaliada por meio de características que indicaram a eficiência dos cruzamentos como desenvolvimento do tubo polínico e produção de sementes. Para isso foram utilizados cinco clones de *Eucalyptus camaldulensis* (04, 18, 19, 31 e 42) e quatro clones de *Eucalyptus urophylla* (01, 07, 20 e 30). Foram realizados seis cruzamentos controlados utilizando esses clones, como segue, lembrando que o primeiro genitor é sempre o feminino (U01xC04, U20xC19, U30xC18, U07xC31, C18xU30, C42xU20)

Para a realização dos cruzamentos controlados, foi utilizada a metodologia proposta por Assis et al. (1998). Os cruzamentos controlados foram realizados em cinco épocas diferentes do desenvolvimento floral: no mesmo dia da emasculação, 1, 3, 5 e 7 dias após a emasculação. Para a avaliação da receptividade do estigma por meio do desenvolvimento do tubo polínico *in vivo*, foram coletados 25 pistilos polinizados no mesmo

dia, 1 e 3 dias após a emasculação, em diferentes horários (6, 24, 48, 72 e 96 horas após a polinização). Os pistilos foram fixados em FAA (6 álcool etílico absoluto: 3 clorofórmio: 1 ácido acético glacial) por 24 horas e armazenados em álcool 70% a 4°C até a avaliação. A análise do desenvolvimento *in vivo* do tubo polínico foi realizada conforme a metodologia sugerida por Odie & McComb (1998).

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 interior do ovário.

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

- porcentagem de vingamentos dos frutos (PV): (número de frutos vingados/número de botões polinizados)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 (PG): (número de sementes germinadas/número total de sementes avaliadas) X 100.

Os dados obtidos para essas estimativas foram submetidos à análise de variância no programa estatístico MSTAT, em que ora foi observado o efeito de espécie dentro de época, ora o efeito de época dentro de espécie, considerando o seguinte padrão modelo estatístico:

$$Y_{ij} : m + a_i + e_{(j)i}$$

em que:

Y_{ij} : é a observação referente à época i , $i=1, \dots, 5$ dentro da espécie j , $j=1, 2$;

m : é a média geral;

a_i : é o efeito da época de polinização i , $i= 1, \dots, 5$;

$e_{(j)i}$: é o efeito da espécie j , $j=1, 2$ na época i , $i=1, \dots, 5$.

2.2 Avaliação da viabilidade do pólen armazenado

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

Para a avaliação da viabilidade do pólen *in vitro* foram utilizados os clones 04, 19 e 42 de *Eucalyptus camaldulensis* e os clones 01, 07 e 40 de *Eucalyptus urophylla*. Nesses clones foram selecionados ramos com botões florais próximos da antese. As anteras foram coletadas e tiveram os teores de umidade reduzidos utilizando-se um dessecador com sílica gel por 24 horas. Posteriormente, os grãos de pólen foram transferidos para frascos de vidro (8ml) com tampa de borracha e armazenados em freezer por 1, 2 e 3 meses.

A germinação *in vitro* dos grãos de pólen armazenados foi comparada com a de grãos de pólen frescos em meio de cultura contendo 30% de sacarose e 0,8% ágar. O meio foi colocado em lâminas escavadas e o pólen espalhado sobre o meio com auxílio de um pincel. As lâminas foram colocadas dentro de placas de petri com papel de filtro umedecido e incubadas por 24 horas a 27°C. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando-se cinco repetições, tendo cada repetição sido constituída por uma lâmina, na qual foram avaliados cem grãos de pólen. A viabilidade do pólen foi verificada em função da porcentagem de pólen germinado, sendo considerados viáveis aqueles grãos de pólen que haviam emitido tubo polínico, conforme sugerido por Cook & Stanley (1960) e enfatizado por Sousa (1988).

Os dados obtidos também foram submetidos à análises de variância, considerando as seguintes fontes de variação: espécies; épocas dentro de espécies e clones dentro de épocas dentro de espécies.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da receptividade do estigma por meio de desenvolvimento do tubo polínico *in vivo*, constatou-se que em todos os casos foi possível observar a presença de grãos de pólen germinando no estigma, tubos polínicos presentes ao longo do estilete e no interior do ovário. Entretanto, houve diferença na quantidade em função da época, ficando evidente que eles foram muito mais freqüentes nos cruzamentos realizados no terceiro dia após a emasculação.

Pelas análises de variância foi detectada diferença significativa entre híbridos ($P \leq 0.01$) 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%. Houve diferenças quanto à eficiência dos cruzamentos, mas em nenhum cruzamento foi constatada uma porcentagem de vingamento que inviabilizasse um programa de melhoramento, considerando que a menor porcentagem de vingamento foi de 46% (Tabela 2).

Embora não tenha sido realizado um estudo mais detalhado, aparentemente o maior vingamento é esperado quando se utilizam clones de *Eucalyptus urophylla* como fêmea (Tabela 2). Alguns fatores poderiam ter influenciado essa diferença. Um deles é o tamanho da flor, uma vez que as flores de *Eucalyptus camaldulensis* são menores que as de *Eucalyptus urophylla* e, portanto, o manuseio é mais difícil tornando-as mais suscetíveis a danos durante o processo de emasculação.

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 das sementes (PG) dos seis diferentes cruzamentos híbridos.

Table 1. Summary of the joint analysis of variance of the six different hybrid crosses for percentage of viable fruits (PV), number of seeds per pollination (NSP), number seeds per fruit (NSF) and percentage of germination of seeds.

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 a 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 cruzamentos (híbridos) realizados entre *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*.

Table 2. Average results obtained for different hybrid combination for percentage of viable fruits (PV), number of seeds per pollination (NSP), number seeds per fruit (NSF) and percentage of germination of seeds among the different crosses made between *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus urophylla*.

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	84,4

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

Quando se considera o efeito de épocas, só foi detectada diferença significativa entre o número de sementes por polinização (NSP) e o número de sementes por fruto (NSF) (Tabela 3).

Na Tabela 4 observa-se que a porcentagem de vingamento (PV) foi alta, independente da época de polinização, indicando que a eficiência do cruzamento, avaliada pelo vingamento dos frutos, foi a mesma. 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 (Tabela 4). Este fato está de acordo com dados encontrados na literatura, em que é mencionada que a maior eficiência das polinizações ocorre no período de maior receptividade do estigma (Polunina 1959; Sedgley & Smith, 1989;

Sousa & Pinto, 1994; Oddie & McComb, 1998). Contudo, as polinizações realizadas logo após a emasculação também produziram sementes, ficando 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 fruto fosse menor.

Assim, essa operação pode ser realizada rotineiramente e, caso haja necessidade de uma grande produção de sementes, pode-se pensar aumentando o número de polinizações. Essa prática não seria difícil em *Eucalyptus*, pois suas flores são grandes, ocorrem em grande quantidade e têm um amplo período de florescimento. Dessa forma, além de se ter menos trabalho, tem-se grande flexibilidade e aumenta-se o número de combinações a serem feitas.

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 cruzamentos híbridos realizados nas cinco diferentes épocas de polinização.

Table 3. Analysis of variance for percentage of viable fruits (PV), number of seeds per pollination (NSP), number seeds per fruit (NSF) and percentage of germination of seeds for hybrid crosses made in the five different time of pollination.

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 a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4. Resultados médios obtidos 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.

Table 4. Average results obtained for percentage of viable fruits (PV), number of seeds per pollination (NSP), number of seeds per fruit (NSF), and percentage seed germination (PG) among the pollinations performed in different periods after emasculatation.

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 ($P \leq 0,05$).

Contudo, é válido comentar que novos estudos devem ser realizados, procurando aumentar a eficiência das polinizações controladas. Por exemplo, verificar a eficiência das polinizações realizadas logo após a emasculação, porém, sem proteção das flores, o que tornaria o processo mais eficiente, 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 e também que, 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. Neste trabalho verificaram-se diferenças significativas de viabilidade entre espécies e entre épocas dentro de cada espécie. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre clones dentro de uma mesma espécie (Tabela 5).

Ficou evidenciado que os pólenes perdem sua viabilidade com o tempo de armazenamento. Essa perda de viabilidade foi maior em *Eucalyptus camaldulensis*, cerca de 4.4% por mês, enquanto que em *Eucalyptus urophylla* não chegou a 1% por mês (Figura 1). No entanto, mesmo com quatro meses de armazenamento, a porcentagem de pólenes viáveis foi superior a 40%.

O pólen de *Eucalyptus camaldulensis*, como mostra a Tabela 6, mostrou-se mais viável do que o de *Eucalyptus urophylla*.

Tabela 5. Análise da variância da porcentagem de germinação *in vitro* do pólen fresco e armazenado nas três diferentes épocas de avaliação.

Table 5. Analysis of variance of percentage of *in vitro* germination for fresh and stored pollen in the different times.

FV	GL	QM
		Germinação
Entre espécies	1	1562,41**
Entre épocas/espécie	6	26,03**
Entre clones/época/espécie	16	43,80
Erro	96	30,32
CV (%)	11,97	

**Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

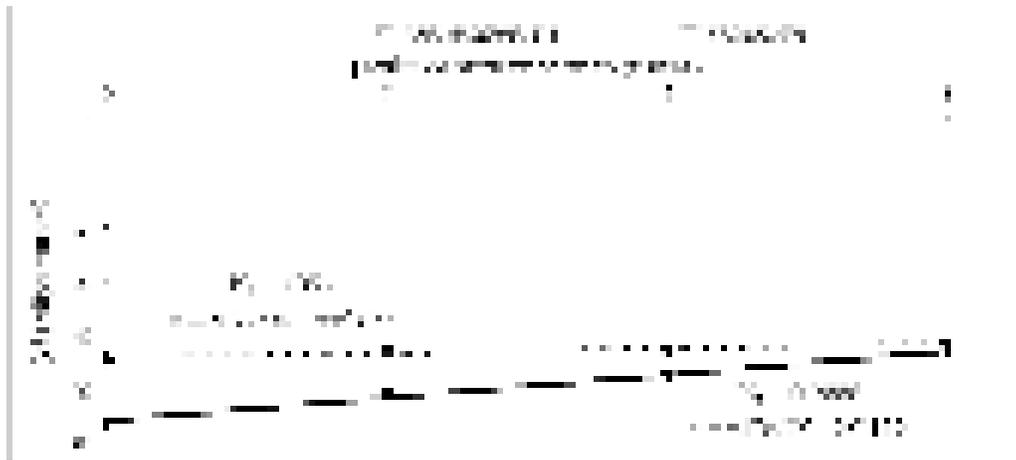


Figura 1. Equação de regressão da porcentagem de germinação do pólen em função da época de armazenamento para *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*.

Figure 1. Regression equation of percentage of germination in different times of storage for *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus urophylla*

Tabela 6. Resultados médios da viabilidade, do pólen fresco e armazenado por 1, 2 e 3 meses de diferentes clones de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*, por meio de germinação *in vitro*.

Table 6. Average results of viability of fresh and stored pollen for 1, 2 e 3 months of different *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus urophylla* clones using *in vitro* germination.

<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.

Além disso, durante a avaliação da germinação *in vitro*, observou-se que o *Eucalyptus camaldulensis* emite e desenvolve mais rapidamente seu tubo polínico. Resultados semelhantes foram obtidos por Sousa (1988), trabalhando com viabilidade de pólen de várias espécies do gênero *Eucalyptus*, inclusive *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*. Contudo, Cangiani (1988), trabalhando com *Eucalyptus 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.

Estes resultados evidenciam que o armazenamento de pólen em *Eucalyptus* é eficiente, haja vista que a quantidade de pólen que pode ser armazenada está 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 (-18°C). Como foi men-

cionado, com até três meses de armazenamento, tanto para os clones de *Eucalyptus camaldulensis* como para os de *Eucalyptus 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 quatro meses é, sob o ponto de vista prático, tempo mais do que suficiente para dar maior flexibilidade às atividades de hibridação dos programas de melhoramento.

4 CONCLUSÕES

A eficiência dos cruzamentos controlados variou entre as espécies e entre as épocas e foi maior em *Eucalyptus urophylla*, especificamente quando o cruzamento foi realizado de 3 a 5 dias depois da emasculação. Contudo, independente da espécie, as polinizações realizadas imediatamente após a emasculação produziram um número satisfatório de sementes, de modo a possibilitar que essa prática seja utilizada pelos melhoristas para facilitar o seu trabalho.

O pólen armazenado em freezer (-18°C) por até 3 meses pode ser utilizado nos cruzamentos controlados, sem comprometer a eficiência dos mesmos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à V&M Florestal, pelo fornecimento do material experimental e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos do primeiro autor.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- CANGIANI, S. M. P. **Extração e armazenamento de pólen em eucalyptus camaldulensis**. Piracicaba: IPEF, 1988. (IPEF. Circular Técnica, 162).
- CAUVIN, B. **Eucalyptus hybridation controlee**: premiers resultats, 1983. Versailles: AFOCEL, 1984. p. 85-117. (Annales de Recherches Sylvicole)
- COOK, S. A.; STANLEY, R. G. Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. **Silvae genetica**, Frankfurt, v. 9, n. 5, p. 34-36, Sept./Oct. 1960.
- 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.
- GONÇALVES, F. M. A.; REZENDE, G. D. S. P.; BERTOLUCCI, F. L. G.; RAMALHO, M. A. P. progresso genético por meio de seleção de clones de eucaliptum plantios comerciais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 295-301, jul./set. 2001.
- 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. 99, p. 53-58, 1976b.
- 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.
- SEDGLEY, M.; SMITH, R. M. Pistil receptivity and pollentube growth in relation to the breeding system of *Eucalyptus woodwardii* (Symphyomyrtus: myrtaceae). **Annals of Botany**, London, v. 64, n. 1, p. 21-31, July 1989.
- SOUSA, V. A. **Manejo e viabilidade do pólen de Eucalyptus SPP**. 1988. 155 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- SOUSA, V. A.; PINTO JUNIOR, J. E. Receptividade estigmática em *E. dunnii*. IPEF, Piracicaba, v. 47, p. 44-49, maio 1994.