

5

Manuseio de pólen e produção de híbridos de *Eucalyptus* e *Corymbia*

Valderês Aparecida de Sousa
Ananda Virgínia de Aguiar
José Elidney Pinto Júnior

Introdução

Embora o melhoramento florestal seja considerado uma ciência nova no Brasil, se comparado a outros países, o País hoje é referência, principalmente, na silvicultura de *Eucalyptus*. Assim como para outras espécies florestais, as estratégias de melhoramento genético visam ao aumento de produtividade e redução dos efeitos ambientais extremos, sendo baseadas em diferentes populações de melhoramento, cruzamentos, métodos e intensidades de seleção para aumentar a frequência dos alelos de interesse (Resende, 2000).

No Brasil, o melhoramento de eucaliptos atende aos segmentos mais importantes da indústria de madeira, papel e celulose e carvão, além de ser utilizado para inúmeras outras finalidades, como postes, bioenergia, cercas etc. (Assis; Resende, 2011). O País tem-se destacado, em nível mundial, pela produtividade alcançada aos plantios de *Eucalyptus*, com características da madeira que possibilitam inúmeros usos e ao incentivo em pesquisas focado na silvicultura, principalmente no melhoramento genético (Castro et al., 2016). Além disso, Assis e Resende (2011) ressaltam a identificação de espécies promissoras para as diferentes condições ambientais de plantio, como uma das ações significativas para o aumento de produtividade, devido às condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da cultura em latitudes semelhantes àquelas da Austrália.

Os primeiros plantios comerciais, a partir da década de 1960, foram implantados com mudas seminais, que resultavam em baixa produtividade e problemas com patógenos. Nas décadas de 1960 a 1970, as pesquisas foram concentradas no estabelecimento de testes de espécies e procedências com material originário, especialmente, da Austrália. Desde 1980, foram implementados os testes de progênes empregando-se a seleção recorrente intrapopulacional (Kageyama; Vencovsky, 1983), quando foram iniciados os estudos para o desenvolvimento de híbridos interespecíficos, como alternativa para reduzir a suscetibilidade às doenças e incrementar o potencial produtivo de *Eucalyptus* (Assis, 1987; Martins; Ikemori, 1987). A partir desse período até 1995, esforços foram concentrados na condução de cruzamentos controlados e na propagação vegetativa, possibilitando a uniformidade dos plantios, maior sobrevivência e ganhos expressivos de produtividade. Também, diversas estratégias e métodos de seleção foram propostos e aplicados (Resende et al., 1990; Resende; Higa, 1994; Resende; Barbosa, 2005, Resende, 2007; White et al. 2007; Rodrigues et al., 2008; Rosado et al., 2009; Massaro et al., 2010).

Na década de 1990 adotou-se a seleção recorrente recíproca e o desenvolvimento de híbridos entre espécies divergentes, além da produção de mudas clonais ao invés de seminais (Assis, 1996; Ferreira; Santos, 1997). A partir de 2000, incorporou-se, também, o desenvolvimento de híbridos interespecíficos e a técnica de clonagem

(Assis et al., 1992, Xavier; Comério, 1996, Assis, 1996, 2000, 2001; Higashi et al., 2000a, 2000b).

O uso de modelos experimentais e genético-estatísticos para os testes de progênies foi essencial para a estimativa de parâmetros genéticos e à obtenção de ganhos genéticos significativos no melhoramento do eucalipto. Atualmente, os programas de melhoramento baseiam-se na seleção das populações parentais e híbridas sintéticas, onde novos clones elites são incorporados anualmente ou a cada geração (seleção recorrente intrapopulacional, em população sintética) (Resende; Barbosa, 2005). Ademais, tem-se verificado a necessidade de retomar os programas de melhoramento por espécie, para obtenção de híbridos interespecíficos mais produtivos.

Paralelamente ao melhoramento genético florestal das espécies e híbridos de eucaliptos, outras práticas silviculturais também contribuíram efetivamente para o Brasil se destacar na produção de matéria-prima do gênero, com espécies alcançando produtividades médias anuais de até 36 m³ ha⁻¹ nos últimos anos, com o uso de estatísticas biométricas, ferramentas moleculares e propagação vegetativa e indução de florescimento precoce (Griffin et al., 1993; Resende et al., 2008; Fonseca et al., 2010; Grattapaglia; Resende, 2010; IBÁ, 2019).

Na atualidade, diversas ferramentas biotecnológicas são aplicadas ao melhoramento genético do eucalipto, visando reduzir o ciclo de melhoramento, a obtenção de valores genéticos e genotípicos mais acurados e a obtenção de ganhos mais expressivos e confiáveis. Atualmente, os incrementos de produtividade volumétrica de madeira têm sido menores que aqueles obtidos 45 anos atrás, porém, outras características qualitativas da madeira apresentam potencial a ser melhorado (Assis; Resende, 2011).

Como suporte aos programas de produção de híbridos, foi necessário o desenvolvimento da tecnologia de polinização controlada e manuseio do pólen para as espécies, individualmente. O conhecimento da biologia de reprodução é indispensável para esses procedimentos. Para o gênero *Eucalyptus*, metodologias atualmente utilizadas podem ser aperfeiçoadas, visando aumentar a eficiência dos programas de hibridação. Os protocolos de manuseio de pólen (coleta, secagem, armazenamento e testes de viabilidade), além de metodologia para a polinização controlada, vêm sendo definidos pelas pesquisas da Embrapa Florestas.

Híbridos de *Eucalyptus* spp. e seu potencial

O conceito de produtividade varia de acordo com as diversas finalidades. Para a produção de celulose, é relacionada a produção volumétrica, densidade da madeira e produção de lignina. A produção de carvão é expressada pela produção de carbono por hectare que, por sua vez, encontra-se relacionada diretamente ao volume, densidade da madeira, rendimento gravimétrico, além da resistência mecânica e granulometria.

Tendo em vista o uso industrial de toras na serraria, o colapso da fibra, a deformação, o enrolamento e a espiral, são importantes. Finalmente, os aspectos silviculturais como a adaptação às condições edafoclimáticas, forma do fuste, número e quantidade de galhos, bifurcação do fuste, pragas e doenças etc (Assis; Resende, 2011) devem ser considerados. Portanto, é importante considerar tanto os aspectos produtivos quanto os econômicos no desenvolvimento de híbridos.

Dentre as espécies de *Eucalyptus* utilizadas para a produção de híbridos, *E. urophylla* é a mais comum e se cruza facilmente com outras espécies. Sendo assim, tem sido utilizada amplamente para a produção de híbridos com diferentes características (Hodge; Dvorak, 2015). O híbrido de *E. urophylla* e *E. grandis* tem sido muito propagado comercialmente no hemisfério Sul, principalmente para a produção de celulose e de madeira maciça. Híbridos de *E. urophylla* x *E. pellita* e *E. urophylla* x *E. brassiana* já foram testados, sendo o primeiro na República do Congo e na Indonésia (Vigneron et al., 2000) e o último plantado comercialmente na região Nordeste do Brasil, como fonte de madeira de alta densidade para bioenergia. *E. benthamii* e *E. dunnii* também foram cruzados com *E. urophylla* e estão sendo testados nas áreas mais frias da América do Sul. Nesse caso, *E. urophylla* contribui para o incremento do crescimento e melhor capacidade de enraizamento do híbrido (Hodge; Dvorak, 2015).

A potencialidade de *E. urophylla* para a produção de sementes híbridas deve-se à variação genética para volume constatada entre procedências e progênies em mais de 125 testes estabelecidos em cinco países (Hodge; Dvorak, 2015). Procedências das ilhas da Indonésia onde a espécie ocorre originalmente, num total de sete, foram incluídas nesses ensaios. As melhores procedências, em termos de crescimento e sobrevivência, apresentaram volume de madeira variando de 25% a 30% superior à média. De acordo com Hodge e Dvorak (2015), procedências de menores altitudes mostraram maior crescimento, sendo que estas procedências apresentaram resultados muito próximos.

O uso de diversos híbridos de *Eucalyptus* também tem sido observado em várias partes do mundo, para a produção de madeira, tendo em vista as diferentes finalidades, principalmente celulose. No Sudeste da China, por exemplo, *E. urophylla* e seus híbridos são cultivados devido à sua performance de crescimento, forma do fuste e porcentagem de sobrevivência (Wang; Yang, 1996). Na África do Sul e Nova Zelândia os plantios são estabelecidos com híbridos de *E. grandis* e outras espécies (Verryn et al., 1996; Connochie; Shelbourne, 1996). O híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* é plantado comercialmente em quase todas as regiões brasileiras e no Congo (Wang; Yang, 1996; Vigneron et al., 2000). No Congo verificou-se a presença de heterose para o incremento volumétrico de madeira nos cruzamentos de *Eucalyptus* 12 ABL (clone do Congo) x *E. saligna* e *E. platyphylla* x *E. urophylla* (Chaperon, 1977). Clones de híbridos têm sido estabelecidos na Austrália, em sítios com precipitação pluviométrica baixa à moderada (500-750 mm), sendo eles: *E. camaldulensis* x *E. globulus*, *E.*

benthamii, *E. botryoides* e *Corymbia maculata*, para crescimento e *E. camaldulensis* × *E. grandis*, *E. camaldulensis* × *E. globulus*, *E. benthamii*, *C. maculata* e *C. variegata* para forma do fuste (Marcar et al., 2011).

Possibilidades de cruzamentos

A compatibilidade e as diferenças genéticas entre espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* têm permitido inúmeras combinações viáveis, mediante cruzamentos. A complementariedade genética e fenotípica tem propiciado ganhos expressivos na produção e qualidade da madeira. Dessa forma, a demanda com o intuito de produzir híbridos é acentuada para esse gênero. Na maioria das vezes, busca-se a heterose ou vigor híbrido. Os plantios comerciais hoje são estabelecidos praticamente com clones de híbridos interespecíficos. A combinação híbrida de eucalipto mais conhecida e bem-sucedida no Brasil é entre *E. grandis* x *E. urophylla*, que compõe uma grande parte dos plantios comerciais estabelecidos. Esse cruzamento tem apresentado boa capacidade de combinação. Atualmente, inúmeras combinações são realizadas e testadas em campo para diversos propósitos, tais como produtividade, resistência à seca e ao frio, além de pragas e doenças. Para a qualidade da madeira, as combinações com maior potencial são: *E. globulus* x *E. urophylla*; *E. dunnii* x *E. urophylla*; *E. urophylla* x *E. smithii*. Para produção de carvão vegetal, sobressaem: *E. camaldulensis* x *E. urophylla*; *E. tereticornis* x *E. urophylla*; *E. brassiana* x *E. urophylla*; *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. grandis* x *E. pellita*. Segundo Assis e Mafia (2007), a experiência com a produção de híbridos mostra que a manifestação da heterose depende do local e também da afinidade genética entre as espécies. Baseados na compatibilidade de cruzamentos entre as diferentes seções (Transversaria e Maidenaria) e nas características de interesse, a Embrapa Florestas recomenda os seguintes híbridos, definidos para as diferentes situações:

Produtividade e resistência à umidade

E. torelliana x *Corymbia citriodora*. Híbrido de grande importância para o futuro, considerando que, em função das mudanças climáticas globais, a precipitação pluviométrica poderá ser incrementada em algumas regiões. Além disso, segundo Alfenas et al. (2009) e Ferreira e Milani (2002), essas espécies são resistentes à ferrugem, doença causada pelo fungo *Puccinia psidii*.

Produtividade e resistência à seca

Algumas espécies têm sido indicadas para a resistência à seca, como aquelas da seção Exertaria, sendo elas: *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. brassiana*, bem como

os híbridos (clones) entre *E. camaldulensis* x *E. grandis* e (*E. grandis* x *E. urophylla*) x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x *E. brassiana*; *E. tereticornis* x *E. brassiana*; *E. pellita* x *E. brassiana* e *E. pellita* x *E. grandis*.

Esses cruzamentos têm sido conduzidos com frequência no Brasil, de acordo com Verryn (2000). Além disso, para a Embrapa Florestas, esses mesmos cruzamentos são de importância estratégica, considerando-se o aquecimento global e a possibilidade do incremento das regiões com deficiência hídrica.

Produtividade e resistência ao frio

São poucos os materiais genéticos aptos a atender as demandas das regiões com baixas temperaturas, principalmente onde a ocorrência de geada é mais intensa. As da seção Maidenaria são indicadas para resistência ao frio (*E. viminalis*, *E. nitens*, *E. smithii*, *E. benthamii*, *E. badjensis* e *E. dunnii*). As três últimas espécies são as mais estudadas e plantadas no Sul do Brasil para resistência ao frio (Paludzyszyn Filho et al., 2005, 2006). Os híbridos *E. grandis* x *E. viminalis* e *E. urophylla* x *E. viminalis* são indicados para as regiões mais frias. Outras combinações híbridas também devem ser testadas para resistência ao frio, como: *E. urophylla* x *E. dunnii*; *E. benthamii* x *E. dunnii*; *E. grandis* x *E. dunnii*; e *E. benthamii* x *E. badjensis*.

Eucalyptus benthamii tem apresentado grande potencial para plantios em áreas de ocorrência de geadas severas (Higa; Carvalho, 1990; Higa, 1999; Silva, 2008). Porém, essa espécie apresenta algumas características relacionadas à qualidade da madeira que precisam ser analisadas mais adequadamente, visando atender à demanda do mercado para celulose e madeira para desdobro, sendo atualmente mais indicada para fins energéticos (Lima et al., 2007). A produção de híbridos dessa espécie com espécies mais produtivas deve ser o enfoque dos programas de melhoramento para as regiões de clima temperado, uma vez que combina características desejáveis de crescimento e resistência ao frio.

As regiões sujeitas às geadas frequentes limitam o bom desempenho e a sobrevivência da maioria das espécies de *Eucalyptus*. Segundo Assis e Mafia (2007), a hibridação, além de proporcionar a síntese de indivíduos resistentes ao meio ambiente, poderá produzir indivíduos com facilidade de serem clonados, uma vez que praticamente todas as espécies tolerantes ao frio são recalcitrantes ao enraizamento. Nesse sentido, é importante o avanço do programa de propagação vegetativa, antecipando possíveis problemas que possam surgir com os novos genótipos desenvolvidos.

Híbridos para produção de carvão vegetal

Para atender à demanda da siderurgia e carvão vegetal, a madeira deve apresentar propriedades tecnológicas específicas, como: rendimento gravimétrico, densidade, teor de carbono fixo, poder calorífico, resistência mecânica etc.

Para o carvão vegetal, as espécies da secção Exertaria são as mais indicadas, como *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. brassiana*. A secção Transversaria apresenta algumas limitações, como a densidade da madeira (*E. grandis* e *E. urophylla*) e propriedades mecânicas do carvão (*E. pellita*, *E. resinifera* e *E. robusta*).

Híbridos para resistência às doenças

O cancro do eucalipto (*Chrysosporthe cubensis*) é uma das doenças mais impactantes, sendo um grande problema. As espécies com maior resistência em relação à essa doença são *E. pellita*, *E. urophylla*, *E. robusta* e *E. resinifera* (Ferreira; Milani, 2002; Alfenas et al., 2009). Com relação à ferrugem, as principais fontes de resistência são encontradas nas espécies *E. pellita*, *E. resinifera*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, e *E. urophylla* (Ferreira; Milani, 2002; Alfenas et al., 2009). Outras espécies de fungos causadores de doenças em *Eucalyptus* spp. vêm sendo detectadas, principalmente, quando os plantios são estabelecidos em condições edafoclimáticas não adequadas ao desenvolvimento das plantas, como as manchas foliares e outras (Auer; Santos, 2009a, 2009b, 2009c, 2011; Soares et al., 2017). As espécies *E. brassiana*, *E. agglomerata* e *E. saligna* apresentaram resistência à mancha foliar (*Calonectria pteridis*) (Alfenas et al., 2016) Híbridos resistentes a essas doenças poderão também ser desenvolvidos no futuro, conforme a demanda do setor florestal.

Heterose híbrida

A hibridação interespecífica de *Eucalyptus* tem sido a maneira mais rápida e eficiente para a obtenção de efeito de heterose funcional, indivíduos mais produtivos para diferentes finalidades e, conseqüentemente, ganhos genéticos aos programas de melhoramento. Essa técnica associada à clonagem foi a maior precursora do sucesso da eucaliptocultura no Brasil. Por meio desse procedimento, é possível a complementaridade das características de crescimento, qualidade da madeira (celulose, carvão vegetal, compensados e laminados de madeira e serraria), resistência aos fatores bióticos (pragas e doenças), além da obtenção da heterose (vígor de híbrido).

O vígor híbrido em cruzamentos interespecíficos de eucalipto é relatado desde a década de 1960, por inúmeros autores (Boden, 1964; Venkatesh; Sharma, 1977a, 1977b, Griffin et al., 2000; Gwaze et al., 2000; Verry, 2000; Vigneron et al., 2000; Rezende; Resende, 2000; Potts; Dungey, 2004; Retif; Stanger 2009).

A heterose dos híbridos interespecíficos depende dos efeitos genéticos não aditivos, especialmente os dominantes (Khurana; Khosla, 1998; Dieters; Dungey 2000; Madhibha et al., 2013), ou da combinação positiva de características complementares, que são os efeitos genéticos aditivos (Martin, 1989; Nikles; Griffin, 1991; Verry, 2000).

A heterose devido à dominância (Nikles; Griffin, 1992) refere-se à complementaridade de genomas, em que a expressão intermediária de caracteres é superior no híbrido, devido à expressão extrema dos caracteres em um ancestral da espécie (Nicholas, 1987), exploração de maior diversidade alélica a partir da recombinação e seleção dentro de híbridos ou de geração avançada (Falconer; Mackay, 1996; Kerr et al., 2004b; Potts; Dungey, 2004). De acordo com Madhibha et al. (2013), quando a dominância em uma população é alta, esse efeito pode ser alto para as famílias híbridas.

A complementaridade (heterose complementar) parece ser o ponto chave dos híbridos de eucalipto (Nikles; Griffin, 1991), tal como o híbrido de *E. urophylla* e *E. grandis*, onde a resistência ao cancro advinda de *E. urophylla* e o crescimento de *E. grandis*, pode ter sido resultado de efeitos multiplicativos de características herdadas aditivamente (Campinhos; Ikemori, 1989; Vignerón et al., 2000).

Considera-se, ainda, que os ganhos genéticos semelhantes aos dos híbridos interespecíficos poderiam ser alcançados simplesmente com a remoção do efeito da endogamia por vasto cruzamento intraespecífico (Potts et al., 1992).

A heterose tem sido observada tanto em híbridos artificiais quanto nos naturais, via polinização livre. Por exemplo, o desempenho médio de 15 híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* para circunferência à altura do peito foi, em média, 38,7% maior do que as progênies puras (Trindade et al., 2001). A heterose também foi observada nos cruzamentos entre *E. grandis* x *E. urophylla* (Campinhos Júnior; Ikemori, 1977), *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. urophylla* x *E. maidenii*, *E. dunnii* x *E. maidenii* (Assis, 2000), *C. citriodora* x *C. torelliana* (Assis, 1985), *E. urophylla* x *E. tereticornis* e *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (Shen, 2000), dentre outros.

Além da polinização controlada, plantios intercalados com diferentes espécies de *Eucalyptus* têm sido realizados para a obtenção de sementes híbridas a partir da polinização livre (Oda; Ferreira, 1983; Assis; Mafía, 1987). Porém, não se recomenda esse procedimento para espécies com defasagem de florescimento.

Barreiras reprodutivas

O conhecimento prévio das barreiras reprodutivas entre indivíduos de diferentes espécies é necessário para o sucesso, tanto das combinações interespecíficas quanto dos plantios comerciais. As barreiras pré e pós-zigóticas impedem a utilização do vigor híbrido entre inúmeras espécies de *Eucalyptus* (Pryor, 1957; Gore et al., 1990; Ellis et al., 1991). De maneira geral, os principais subgêneros são isolados reprodutivamente e, dentro desses, as espécies com maior distância taxonômica apresentam barreiras mais significativas. Espécies de uma mesma subseção apresentam menores barreiras pré-zigóticas após os cruzamentos (Cauvin, 1983; Potts et al., 1987; Tibbits, 1989). Essas barreiras encontram-se relacionadas, em sua maioria, às barreiras fisiológicas

que resultam em anormalidades no desenvolvimento do tubo polínico (Ellis et al., 1991, Potts; Dungey, 2004). Espécies pertencentes à mesma subsérie ou subseção, como *E. globulus* e *E. nitens* (Subgenus *Symphyomyrtus*, Series *Viminales*, Subseries *Globulinae*), apresentam maior chance de gerar sementes híbridas com bom potencial produtivo e resistência às pragas (Pryor; Johnson, 1971). Porém, barreiras relativas ao tamanho das estruturas reprodutivas podem dificultar a polinização dessas espécies. *E. nitens*, por exemplo, deve ser sempre utilizado como genitor, por apresentar estruturas reprodutivas menores que *E. globulus* (Gore et al., 1990).

Certamente, um determinado grau de divergência genética/taxonômica é esperado para o sucesso nos cruzamentos e na expressão do vigor híbrido, resultante da expressão por endogamia em um extremo e dos efeitos dos cruzamentos interespecíficos no outro (Potts et al., 1987; Potts et al., 1992).

As anormalidades deletérias ocorrem, em proporções significativas, nas famílias híbridas, principalmente entre *E. globulus*, *E. nitens*, e *E. bicostata*, se expressando em diferentes estágios do ciclo da vida (Potts et al., 1992). O mecanismo genético da expressão dessas anormalidades é diferente da endogamia, não sendo previsível.

Alguns problemas têm sido observados para os híbridos. Um deles se refere à baixa produção de sementes viáveis para atender às demandas dos plantios. Além disso, a produção de sementes híbridas entre as espécies relacionadas é menor (16% a 35%) que as de polinizações intraespecíficas. Adicionalmente, as anormalidades e mortalidades das mudas podem ser de três a quatro vezes maiores em progênies híbridas. Para que o sucesso ocorra no plantio de híbridos é necessário testá-los, juntamente com os pais, em diversos ambientes (Martín, 1989). Para a utilização em plantios comerciais, os híbridos devem ser validados. Sendo assim, o desenvolvimento de híbridos interespecíficos deve focar nas espécies com facilidade na propagação vegetativa por estaquia. A clonagem (micropropagação), quando conduzida, deve ser realizada diretamente das sementes, para se evitar a obtenção de material vegetativo estéril. Todavia, quando se conduz a clonagem em idade precoce, uma porcentagem significativa de anormalidades pode ser incorporada, se comparadas às idades mais avançadas.

Polinização controlada

Técnicas empregadas

A polinização controlada, realizada desde 1950 (Pryor, 1951), vem sendo uma das ferramentas mais importantes nos programas de melhoramento genético de *Eucalyptus* spp., por propiciar ganhos rápidos. Constitui-se na principal ferramenta

para a obtenção de híbridos interespecíficos com problemas de defasagem de florescimento e diferenças na morfologia floral (Volker et al., 1988).

Eucalyptus spp. é protândrico e, sendo assim, as técnicas de polinização controlada inicialmente envolviam o isolamento das flores, para evitar a contaminação das sementes híbridas produzidas. Para a utilização desse método eram necessárias três visitas, sendo: 1) remoção de flores abertas e botões jovens e emasculação de flores próximas à abertura e isolamento (com sacos) para evitar a contaminação dessas flores com pólen indesejáveis; 2) polinização controlada no momento da máxima receptividade do estigma, com a retirada dos sacos, aplicação de pólen aos estigmas e reensacamento; e 3) remoção dos sacos uma semana após a polinização (Van Wyk, 1977).

A técnica de polinização em uma única etapa (*One Step Pollination* - OSP) proposta por Harbard et al. (1999) e testada por Assis et al. (2005), induzindo à protoginia, viabilizou economicamente a polinização controlada do eucalipto, por reduzir o número de visitas para apenas uma, como observado em pomares de sementes de *E. globulus* no Chile. Portanto, em uma única etapa emascula-se o botão pré-receptivo, corta-se o topo do estigma, permitindo que a secreção intracelular seja liberada, viabilizando-se, assim, a aderência dos grãos de pólen depositados. A seguir, procede-se à cobertura do estilete, cortado e polinizado, com um tubo plástico ou, ainda, cobre-se a flor com sacos de isolamento (Harbard et al., 1999; Williams et al., 1999). O pólen utilizado deve ser reumidificado por 24 horas, caso esteja armazenado. Trindade et al. (2001) observaram que o crescimento do tubo polínico nessa circunstância é mais rápido do que em condições normais de maturação, constituindo-se em mais uma vantagem desse método. Não é necessária a revisão do trabalho até a colheita da cápsula (Harbard et al., 1999). Dessa forma, tem-se menos trabalho, reduzindo-se os custos. Segundo Espejo et al. (2001), esta metodologia tem sido aplicada para produzir sementes de cruzamentos elites para plantios comerciais no Chile, Portugal e Austrália. No Brasil, essa técnica tem sido empregada com sucesso e, de acordo com Assis e Mafia (2007), a polinização controlada foi viabilizada de maneira mais eficiente para atender à produção de híbridos, comercialmente. Todavia, para as espécies de *Eucalyptus* de flores pequenas, como *E. nitens*, essa técnica não funciona, pois produz uma quantidade de sementes inaceitavelmente baixa, de acordo com Williams et al. (1999) mas, essa metodologia se mostrou eficiente para material não melhorado de *E. globulus* (Harbard et al., 1999; Williams et al., 1999).

Propagação vegetativa e pomar indoor e outdoor

Com a utilização de híbridos, surgiu a necessidade de alavancar a propagação vegetativa para assegurar o aproveitamento da heterose e a produção massiva de mudas, tendo em vista atender às demandas dos plantios comerciais. Frequentemente, a impossibilidade de clonagem dos híbridos tem sido a maior restrição do uso desses

materiais em grande escala. Portanto, a propagação vegetativa tornou-se extremamente necessária para atender essa demanda, tendo viabilizado, com grande sucesso, os programas de produção e uso de híbridos do eucalipto, potencialmente com maiores ganhos genéticos obtidos. A propagação vegetativa tem sido eficiente para uniformizar e incrementar a produtividade, bem como reduzir o ciclo de melhoramento genético, especialmente no processo de seleção e multiplicação de híbridos inter e intraespecíficos. Ademais, a propagação assexuada permitiu o plantio de genótipos em sítios específicos e, conseqüentemente, um maior incremento da produtividade (Madhibha et al., 2013).

Por outro lado, a produção de sementes híbridas, para atender a demanda da silvicultura comercial ainda é extremamente insuficiente e onerosa (Madhibha et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de um híbrido depende da possibilidade de propagação vegetativa bem-sucedida (Assis, 2000). O enraizamento de estacas e miniestacas, bem como a propagação *in vitro* a partir de gemas e raízes adventícias são os meios mais usados na eucaliptocultura (Santos et al., 2005).

Algumas espécies e genótipos de *Eucalyptus*, assim como híbridos, apresentam maior facilidade à propagação vegetativa do que outras, como *E. urophylla* e seus híbridos. Para outras espécies, o processo de enraizamento é muito difícil, tal como *E. benthamii*, e requer um investimento maior em pesquisas e infraestrutura. Portanto, a qualidade do sistema radicular é um indicativo fiel ou representativo do tipo de plantio adotado ao(s) clone(s).

Por sua vez, o processo de micropropagação, apesar de eficiente, ainda é oneroso para algumas empresas. Anteriormente, a produção de mudas de eucalipto em larga escala, por empresas brasileiras de papel e celulose, era realizada pelo enraizamento de estacas e produção de material clonal de plantas-mães selecionadas em testes de procedências e progênies, clonais ou povoamentos comerciais (Watt et al., 2012). A partir de 2000, com a evolução dos jardins clonais por várias empresas florestais, com material rejuvenescido da propagação *in vitro* (micropropagação), a produção de mudas clonais se tornou mais eficiente (Gonçalves, 1980; Higashi et al., 2000a; Santos et al., 2005). Assim, materiais clonais micropropagados de segmentos nodais, a partir de várias subculturas, são implantados, enraizados na estufa sob neblina e transferidos para o jardim microclonal (Iannelli et al., 1996, Santos et al., 2005). As principais vantagens desse método, segundo algumas empresas, são: (i) redução do ciclo de melhoramento genético, (ii) a porcentagem de enraizamento incrementa, quando esse tipo de estaca é usada; (iii) aumento da taxa de sobrevivência; (iv) o período de execução da propagação reduz de 90-120 dias para 75-85 dias; (v) redução do investimento em estruturas (estufas) etc. (Watt et al., 2012).

Devido ao porte elevado das árvores adultas de *Eucalyptus*, a polinização controlada é muito complicada e onerosa. Para viabilizar esse procedimento, tem sido utilizada com sucesso a construção de pomares *indoor* ou *outdoor*, empregando-se

enxertos de genótipos selecionados nos testes de progênes e, geneticamente divergentes.

A opção por um desses tipos de pomar vai depender das condições climáticas do local, onde será estabelecida a estrutura, e da disponibilidade de mão de obra. Em região de clima subtropical, é necessário assegurar às espécies tropicais envolvidas um intervalo de temperatura adequado à sobrevivência das mesmas. Para isso, poderão ser construídas duas estruturas: uma simples, com controle de umidade e sistema de fertirrigação, e outra com controle adicional de temperatura. Além disso, poderá ser incluída uma área com solo coberto com brita para o deslocamento das plantas envasadas, quando as mesmas não estiverem florescendo ou sendo polinizadas.

Uma estrutura simples de casa de vegetação poderá ser feita, utilizando-se alguma estrutura já existente ou construindo-se uma estrutura com piso de concreto, telado nas laterais e cobertura do tipo duas águas ou em arco, com sistema de fertirrigação.

Modelo de cruzamentos e procedimentos estatísticos

Os dialelos são delineamentos utilizados para melhor controle das combinações interespecíficas, bem como para estimativas de parâmetros genéticos utilizados para definir os principais genitores em hibridações. Quanto maior a divergência genética entre as espécies, maior será a probabilidade de obter vigor híbrido. Assim, as capacidades específicas e geral de combinação poderão ser preditas a partir desses delineamentos de cruzamentos. Os marcadores moleculares são uma ferramenta que pode ser usada para nortear, a priori, a escolha dos genitores para os cruzamentos controlados. Alguns fatores que influenciam negativamente essa escolha são: a falta de ligação entre marcadores e os genes dos caracteres; diferenças nas contribuições dos locos para a característica e a relação baixa ou média entre a divergência genética e a performance híbrida, não sendo útil para a predição, devido à baixa correlação entre a matriz de divergência genética e a capacidade específica, bem como a falta de informação acurada relacionada ao efeito da dominância. Porém, com as novas tecnologias genômicas, essa informação poderá ser mais precisa e assertiva.

Dentre os delineamentos usados destaca-se o dialelo parcial, modelo adaptado por Griffin (1956). O uso de cruzamentos dialélicos entre clones das espécies permite avaliar a capacidade de combinação, verificar o melhor testador para futuros trabalhos de melhoramento, assim como inferir a respeito do tipo de efeito gênico presente na expressão dos caracteres envolvidos.

Para o desenvolvimento de híbridos intraespecíficos, uma ótima opção é o delineamento em “V”, que deve ser usado para os genitores com maiores valores genéticos aditivos na população de melhoramento (Tabela 1), permitindo o cruzamento dos genitores mais vezes. Essa é uma forma de aumentar a probabilidade de obter indivíduos excepcionalmente superiores nas progênes. Considerando os dez melhores genitores da população, ordenados de acordo com os seus valores genéticos

preditos, o delineamento em V, apresentado a seguir, permite definir os cruzamentos a serem realizados, quando o número total deles é fixado em 25. O delineamento para a obtenção de 25 híbridos interespecíficos será o fatorial 5 x 5, que equivale ao dialélico parcial desconexo com 10 genitores (Tabela 1) (Resende, 2002).

Tabela 1. Delineamento em V para a obtenção de 25 indivíduos híbridos por cruzamento interespecífico (White et al., 2007) modificado por Resende (2002).

Genitor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		X	X	X	X	X	X	X	X	X
2			X	X	X	X	X	X	X	
3				X	X	X	X	X		
4					X	X	X			
5						X				
6										
7										
8										
9										
10										

Neste caso, apenas os melhores cruzamentos são realizados e o número de cruzamentos por genitor são indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos melhores cruzamentos e do número de genitores por cruzamento.

Genitor	Nº cruzamentos	Genitor	Nº cruzamentos
1	9	6	5
2	8	7	4
3	7	8	3
4	6	9	2
5	5	10	1

Estratégias de seleção para as progênes híbridas

As estratégias baseadas na seleção recorrente recíproca (SRR) são as mais indicadas para o melhoramento de híbridos de eucalipto (Resende; Higa, 1990), devido esse gênero apresentar, principalmente, heterose e dominância alélica para caracteres de crescimento (Assis; Resende, 2011). Esta estratégia foi adotada no Brasil a partir de 2000 (Resende; Resende, 2000). O método de SR adotado para maximizar ganho

por unidade de tempo foi a SRR de genitores ou seleção interpopulacional (Comstock et al., 1949) com híbridos intermediários (SRR-G-HI), especialmente para os híbridos *E. urophylla* x *E. grandis* (Resende; Higa, 1990; Resende, 2002; Resende; Barbosa, 2005; Resende et al., 2005). As populações parentais são melhoradas simultaneamente com a aplicação da seleção recorrente, para obter a capacidade geral de combinação (Nikles; Newton, 1991; Madhibha et al., 2013). De maneira geral, a correlação entre a capacidade geral de combinação (CGC) dos pais em espécies puras e a CGC dos pais em cruzamentos híbridos, denominada capacidade geral de hibridização (CGH) por Nikles e Newton (1991), tem sido o parâmetro mais importante. Valores altos dessa correlação têm sido observados entre a densidade da madeira e a resistência a doenças em híbridos *E. nitens* x *E. globulus* (Dungey et al., 1997; Volker 2002).

Quatro estratégias híbridas de seleção foram investigadas quanto à eficiência de seleção por Kerr et al. (2004a, 2004b). Os autores concluíram o esquema SRR-SF (seleção recorrente recíproca baseada em um índice que combina efeitos das espécies puras, híbridos e indivíduos) reduz o tempo entre as gerações pela metade, visto que as progênes híbridas e as puras são melhoradas simultaneamente. Por apresentarem um intervalo de geração reduzido, o ganho genético anual obtido é superior à seleção recorrente recíproca (SRR). Para estruturas genéticas com moderados efeitos de dominância e para que as correlações entre as populações puras e híbridas sejam maiores que zero, a SYN é a melhor estratégia. Porém, os autores constataram que tanto a SRR-SF quanto a SRR apresentam ganho anual mais consistente em maior número de estruturas genéticas que a espécie pura (PSS) e a SYN. Em situações complicadas de melhoramento (baixas herdabilidades e correlações entre híbridos e espécies puras), a RRS-FS é mais indicada. A estratégia de espécies sintéticas testada (SYN) mostrou-se a mais econômica, seguida pela estratégia RRS-SF (Kerr et al., 2004b).

Com a inclusão de outras espécies nos cruzamentos (*E. globulus*, *E. camaldulensis*, *E. pellita*, *E. dunnii*, *E. benthamii* e *E. viminalis*, dentre outras), e a combinação de várias características em um único indivíduo, surgiu um novo método de SRR, denominado populações sintéticas multiespécies (SRR-PSME). Este método tem congregado vários caracteres para a produção de celulose (resistência à seca e às doenças, volume, densidade, rendimento e teor e qualidade da lignina) (Assis, 2000; Resende; Assis, 2008). Porém, as gerações avançadas de híbridos têm, muitas vezes, resultado na redução do vigor híbrido, devido à ruptura de complexos de genes coadaptados ou perda ou duplicação de segmentos cromossômicos (Potts; Dungey, 2004).

Para a produção de celulose, Resende e Assis (2008) propuseram quatro opções de cruzamento, com base em oito populações sintéticas:

- Produção de celulose em ambientes tropicais. População sintética 1: *E. grandis* (crescimento), *E. camaldulensis* ou *E. tereticornis* (resistência à seca e às doenças, alta densidade) e *E. globulus* (baixo teor de lignina, alto rendimento e alta densidade) x população sintética 2: *E. urophylla* (crescimento), *E. pellita* (resistência à seca e às doenças, alta densidade) e *E. dunnii* (baixo teor de lignina, alto rendimento). Segundo Assis (2000), essas populações capitalizam heteroses entre pares de espécies que já foram cruzadas duas a duas e validadas no campo.
- Produção de celulose para ambientes tropicais. População sintética 1: *E. grandis* (crescimento), *E. pellita* (resistência à seca e às doenças, alta densidade) e *E. dunnii* (baixo teor de lignina, alto rendimento) x população sintética 2: *E. urophylla* (crescimento), *E. camaldulensis* ou *E. tereticornis* (resistência à seca e às doenças, alta densidade) e *E. globulus* (baixo teor de lignina, alto rendimento e alta densidade). Estas propostas visam inserir em apenas uma geração de recombinação alelos de todas as espécies em um mesmo indivíduo.
- Produção de celulose em ambientes tropicais. População sintética 1: *E. grandis* (crescimento), *E. pellita* (resistência à seca e às doenças, alta densidade) e *E. globulus* (baixo teor de lignina, alto rendimento e alta densidade); população sintética 2: *E. urophylla* (crescimento), *E. camaldulensis* ou *E. tereticornis* (resistência à seca e às doenças, alta densidade) e *E. dunnii* (baixo teor de lignina, alto rendimento).
- Produção de celulose em ambientes frios. População sintética 1: *E. grandis* (crescimento), *E. globulus* (baixo teor de lignina, alto rendimento e alta densidade), *E. viminalis* (resistência ao frio e alta densidade), *E. saligna* (crescimento e densidade maior que a de *E. grandis*) x população sintética 2: *E. urophylla* (crescimento), *E. dunnii* (baixo teor de lignina, alto rendimento), *E. smithii* (baixo teor de lignina, alto rendimento, alta densidade, resistência ao frio), *E. benthamii* (resistência ao frio). Essas populações viabilizam a aplicação da seleção genômica ampla por apresentarem um alto desequilíbrio de ligação e baixo tamanho efetivo populacional (em torno de 100).

Manuseio do pólen

Técnicas adequadas para o manuseio do pólen de *Eucalyptus* spp. são necessárias, pela curta longevidade sob condições naturais, e pela defasagem no florescimento observadas para esse gênero. A assincronia pode ocorrer dentro de espécies (Sousa; Higa, 1991), populações e, mais acentuadamente, entre espécies, sendo que essa última tem sido amplamente reportada na literatura (Florence, 1964; Ashton, 1975; Griffin, 1980; Moran, Griffin, 1983; Keatley, Hudson, 2007; Khanduri et al., 2008). Apesar desse processo ocorrer em padrões regulares, as condições ambientais podem influenciar as espécies de forma diferente. A altitude é um dos fatores que tem sido citados

na literatura (Hodgson, 1976; Griffin, 1980). Embora não se saiba com precisão a razão da defasagem (Griffin; Hand, 1979), Graça (1987), estudando o florescimento de *E. dunnii*, verificou a influência da localização geográfica, com tendência de maior florescimento em prol das maiores latitudes e temperaturas médias do mês mais frio mais baixas. O conhecimento da biologia e fenologia reprodutivas constitui-se em um dos passos primordiais ao manuseio do pólen.

Os trabalhos pioneiros tratando o pólen de *Eucalyptus* spp. surgiram no final da década de 1950, na Austrália, primeiramente com Pryor (1954) e, em seguida, com Boden (1958). No Brasil, o primeiro trabalho reportando o manuseio de pólen de *Eucalyptus* spp. foi publicado por Gabrielli et al. (1965). Desde então, diferentes estudos têm sido conduzidos para espécies desse gênero (Borges et al., 1973; Cangiani, 1988; Sousa, 1988; Menck et al., 1990, dentre outros).

Coleta

O principal fator para o sucesso do armazenamento diz respeito à viabilidade inicial do pólen. Batos e Nikolic (2013), estudando o abeto sérvio (*Picea omorika*), verificaram forte correlação positiva entre o pólen fresco e armazenado sob temperatura de -20 °C. Por conseguinte, esforços devem ser dispendidos na obtenção do pólen com a máxima viabilidade inicial, para o armazenamento adequado. Para tanto, o conhecimento da maturidade na coleta é necessário, implicando no conhecimento da biologia reprodutiva específica.

Estudos sobre a coleta para o gênero *Eucalyptus* foram conduzidos na Austrália e também no Brasil, destacando-se: Borges et al. (1973), Sousa (1982) e Menck et al. (1990). Griffin et al. (1982), trabalhando com *E. regnans*, adotaram uma metodologia de coleta demonstrando que a maturidade máxima ocorria na antese. Dessa forma, sugeriram a coleta de ramos com os botões próximo à perda do opérculo (Figuras 1A e 1B), mantendo-os com as extremidades na água, até o momento da antese (Figuras 1A, 1B e 1C). Ademais, com a remoção das flores abertas, a possibilidade de contaminação das novas flores seria evitada. O trabalho de Menck et al. (1990) corroborou essas descobertas. Esses autores trabalharam com *E. grandis*, *E. smithii*, *E. dunnii*, *E. brassiana*, *E. urophylla* e *E. camaldulensis* e observaram melhores resultados de germinação quando o pólen foi coletado em botões abertos, em casa de vegetação, do que em botões coletados no campo. Dessa forma, o método adotado por Griffin et al. (1982) e outros autores como Sousa e Pinto Júnior (1992) para *E. dunnii*, continua sendo o mais adequado e utilizado para esse gênero.

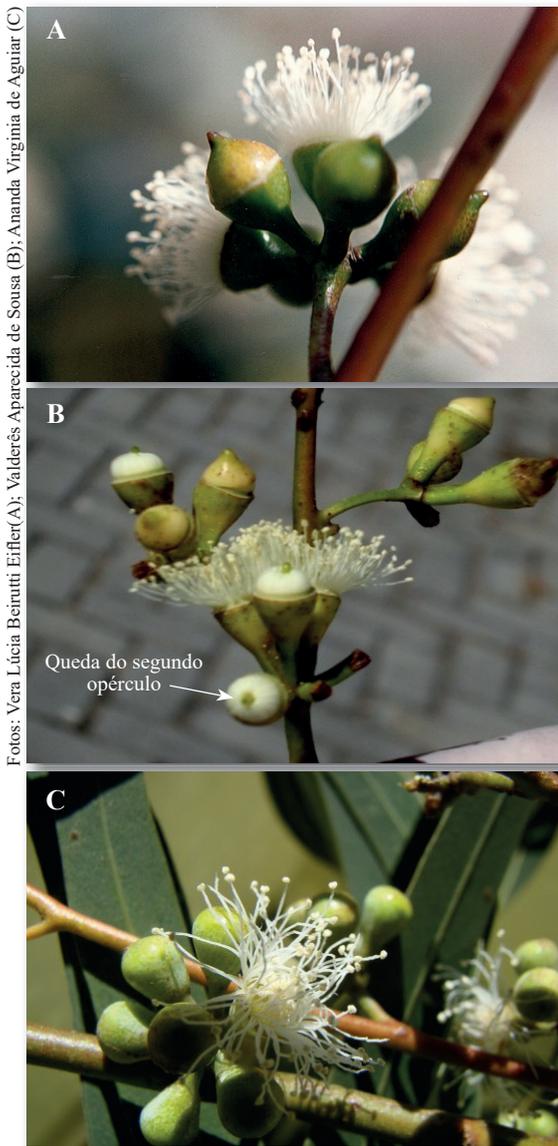


Figura 1. Ramo de *E. dunnii* mostrando vários estágios de desenvolvimento: botão verde, botão com opérculo amarelado, no início da abscisão, e flores abertas (A); botões florais em desenvolvimento (até a queda do segundo opérculo) e de *E. benthamii* (B) e híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. benthamii*(C).

Extração

Esse procedimento é necessário para a redução das impurezas e custos, para evitar contaminações e para restringir o espaço necessário para o armazenamento do pólen. Para diversas espécies folhosas, a reduzida produção de pólen e a sua característica aderente consistem em um agravante para o armazenamento nas quantidades

adequadas. Grande parte dessas espécies são polinizadas por insetos e os eficientes mecanismos para o transporte e polinização, como a aderência, dificulta a extração do pólen das estruturas estaminais. A maioria das espécies de eucaliptos de interesse comercial, no Brasil, apresenta pólenes com essas características. Uma das formas mais utilizadas, na prática, para separar o pólen do material inerte tem sido a secagem, seguida da utilização de peneiras de malha fina. Nesse caso, deve-se considerar as perdas do pólen aderido às anteras, que podem ser relativamente grandes.

Com o intuito de incrementar o rendimento desse processo para *Eucalyptus* spp., foi utilizada a extração com água (Griffin et al., 1982; Sousa, 1982; Cangiani, 1988; Menck et al., 1990). Ao contrário de Griffin et al. (1982), os demais autores detectaram o efeito negativo sobre a germinação do pólen extraído. Não se conhece a razão para isso, podendo ser atribuída à eluição de componentes da parede do pólen, dentre outras. Dessa forma, diante da potencialidade do uso dos solventes orgânicos, para o pólen de diversas espécies de plantas (Iwanami, 1972, 1975, 1984; Mishra; Shivanna, 1982; Yabuya, 1983), pesquisas foram concentradas também para o gênero *Eucalyptus*. Essa técnica foi apresentada por Stanley e Linskens (1974), como uma forma de superar o problema da manutenção de um nível específico de umidade e também para o transporte do pólen, sem a necessidade do uso de gelo seco ou refrigeração. Esses autores enfatizaram, também, a facilidade da polinização manual e a especial vantagem do emprego para as espécies que apresentam o pólen com superfície viscosa. Portanto, o uso dessa técnica para espécies de *Eucalyptus* é bastante promissor, mas é necessário testar, individualmente a reação específica aos solventes.

Inúmeros solventes têm sido utilizados, tanto para a extração quanto para o armazenamento de pólen. Dentre os mais empregados destacam-se: acetona, álcool amílico, benzeno, etanol, éter etílico, éter dietílico, éter de petróleo, hexano, ciclohexano metanol, xileno, tolueno, tetracloroeto de carbono e clorofórmio (Iwanami, 1972, 1975, 1984; Mishra; Shivanna, 1982; Yabuya, 1983; Jain; Shivanna, 1988; Kopp et al., 2002; Khan; Perveen, 2006; Perveen et al., 2007; Perveen; Kahn, 2009; Chaudhury et al., 2010; Perveen; Sarwar, 2011; Vale et al., 2016).

Resultados negativos de viabilidade foram observados para *E. urophylla*, usando-se a acetona (Souza; Gonçalves, 1986) e para *E. camaldulensis* (Sousa; Pinto Júnior, 1992), usando-se éter, tanto etílico quanto de petróleo. No entanto, a extração com benzeno, xileno e tolueno foi promissora para *E. dunnii* e *E. urophylla*, enquanto o xileno e tolueno mostraram melhores resultados para *E. grandis*. Sendo assim, deve-se dar continuidade aos protocolos de uso dessas substâncias para o gênero *Eucalyptus*.

Secagem e armazenamento

A umidade e temperatura são os principais fatores que influenciam a longevidade do pólen durante o armazenamento (Lei et al., 2020), devendo ser controlados. Ambos se encontram diretamente relacionados ao metabolismo e à contaminação do pólen por microrganismos. A redução dessas atividades tende a incrementar a longevidade do pólen armazenado.

A redução da umidade é sempre necessária e, mesmo no curto prazo, essa medida é indispensável. Snyder e Clausen (1974) enfatizam que a preservação da viabilidade do pólen, mesmo por algumas semanas, requer essa redução. Esses autores afirmam que a intensidade de secagem depende da espécie e do método de armazenamento empregado (curto, médio ou longo prazo).

De um modo geral, o nível de desidratação é inversamente proporcional à temperatura de armazenamento.

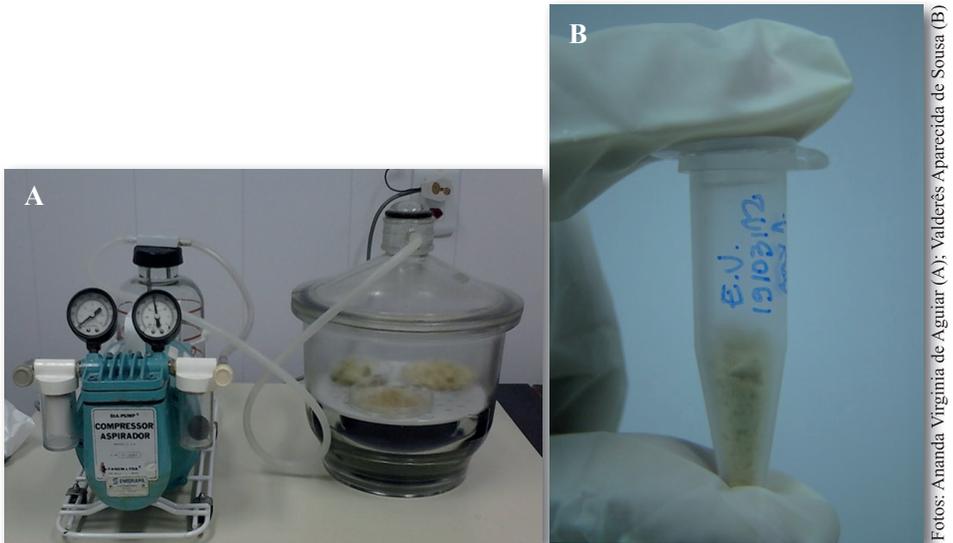
Para a conservação no refrigerador (4 °C), a redução menos drástica da umidade pode ser aceitável, porém, isso implica no encurtamento da viabilidade. Para o armazenamento sob temperaturas mais baixas, como em congeladores (*freezers*) (- 18 °C, - 20 °C, - 36 °C) e *ultra freezers* (- 80 °C) é necessária a secagem mais drástica. Para a criopreservação (-196 °C), há necessidade de uma redução de umidade ainda mais drástica. De acordo com Matthews e Kraus (1981), sob temperaturas reduzidas, caso não haja uma secagem apropriada, pode ocorrer a formação de gelo intracelular, implicando na ruptura da parede da célula.

De maneira geral, Sprague e Johnson (1977) e Goddard e Matthews (1981) recomendam o intervalo de umidade entre 8% a 10% para um armazenamento adequado, independentemente do método empregado. Siregar e Sweet (2000), observando a influência da umidade no armazenamento de *Pinus radiata*, verificaram que a umidade de 10% foi eficiente para o armazenamento no refrigerador (4 °C), por aproximadamente 1 ano, com redução mínima de germinação (de 93% para 84%).

Apesar de ser necessária a secagem intensa do pólen, para o armazenamento sob temperaturas muito baixas, deve-se ressaltar que certos pólenes (recalcitrantes) não suportam elevado nível de desidratação. Nesse grupo se incluem os trinucleados (comum nas gramíneas). Essa condição tem sido limitante ao armazenamento (Brewbaker, 1967; Stanley; Linskens, 1974; Frankel; Galun, 1977; Barnabás, 1985; Mayer, 2000; Carrijo García, 2015; Jayapraksh, 2017). Barnabás (1985) indicou 50% como umidade segura para o pólen de *Zea mays* já Stanley e Linskens (1974) indicaram 40% de umidade para o pólen de *Tulipa*, *Plantago media*, *Clivia cusculus* e *Parnassa*. Exceção é relatada por Boyle (2001), para o pólen de *Schlumbergera truncata* (cacto-de-ação-de-graças) que, mesmo sendo trinucleado, pode tolerar à dessecação intensa (umidade de 4%) e pode ser armazenado sob temperaturas abaixo de 0 °C. Portanto, nota-se que o índice de umidade adequado deve ser testado para as diferentes espécies.

Secagem à vácuo

Diferentes métodos de secagem foram testados e descritos para o pólen de *Eucalyptus* spp., dentre eles a secagem sob vácuo com sílica gel (Figuras 2A e 2B). Trata-se de um procedimento simples e recomendado por alguns autores (Frankel; Galun, 1977; Matthews; Kraus, 1981).



Fotos: Ananda Virgínia de Aguiar (A); Valderês Aparecida de Sousa (B)

Figura 2. Secagem a vácuo com sílica-gel de pólen de *E. benthamii* (A); Eppendorf com pólen de *Eucalyptus urophylla* seco e pronto para o armazenamento (B).

Nesse procedimento a secagem depende da umidade inicial do pólen. Snyder (1961) recomenda o período de 15 minutos (utilizando vácuo de 5 mm de Hg), para que o pólen de pinus do sul dos Estados Unidos atinja a umidade adequada (entre 11% e 14%) para o armazenamento no refrigerador, e 30 minutos para o armazenamento no “freezer”. Ahlgren e Ahlgren (1978) armazenaram o pólen de *Pinus strobus*, com sucesso, durante oito anos após permanência no dessecador, com sílica-gel, por 48 horas. O ideal é que esse método seja testado especificamente.

Estufa

A secagem em estufa é um método relativamente simples, mas deve-se atentar para a temperatura limite que as espécies podem tolerar. Além disso, com a secagem de grandes quantidades de pólen por um período mais prolongado, pode ocorrer acúmulo de umidade em excesso e, com isso, levar a uma elevada taxa de contaminação por

fungos. Diferentes métodos de secagem foram estudados por Sousa (1988) para *Eucalyptus* spp., dentre eles: câmara seca (temperatura constante de 22 °C) estufa (35 °C e 40 °C constantes) e dessecador com sílica-gel (utilizando vácuo e temperatura ambiente em laboratório). A interação entre os métodos e as espécies, no tocante à viabilidade do pólen foi detectada, enfatizando a necessidade do tratamento individual para as espécies. Verificou-se que apenas a secagem em estufa (40 °C) foi demasiada e prejudicial para a maioria das espécies. Ficou evidente que a velocidade de secagem das estruturas estaminais variou entre as espécies, tendo sido maior para *E. urophylla* e *E. grandis* e menor para *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*, enfatizando o comportamento específico e a necessidade de pesquisas para as espécies, individualmente.

Outras formas de secagem, como o uso de ácido sulfúrico, têm sido reportadas na literatura. Duffield e Snow (1941) mantiveram a umidade do pólen em torno de 20% por um ano, enquanto Matthews e Kraus (1981) apontam a possibilidade de se atingir 15% para espécies florestais, com o uso de solução de 1,5 de gravidade específica. No entanto, estes autores ressaltam a possibilidade da redução da viabilidade pela emissão de SO₂ e SO₃.

A secagem com o emprego de soluções salinas (0,5% a 66%) também tem sido relatada. Hong et al. (1999) armazenaram, com sucesso, o pólen de *Typha latifolia* L., sob condições de umidade oriunda de sete soluções salinas saturadas (com umidade relativa de 0,5% a 66%).

A liofilização tem sido outro método empregado para reduzir drasticamente a umidade, visando ao armazenamento no longo prazo. De acordo com Stanley e Linskens (1974), esse método consiste na redução de temperatura (- 60 °C a - 80 °C), seguida da aplicação de vácuo de 50-250 mm de Hg, para remover a água por sublimação. O pólen liofilizado pode, então, ser armazenado sob diferentes condições.

Diversos trabalhos citam o armazenamento bem-sucedido de pólen liofilizado. Dentre esses, destacam-se: Wang (1975) para diversas espécies florestais; Boughediri et al. (1995) para tamareira (*Phoenix dactilifera* L.); Perveen e Alikhan (2007) para *Carica papaya*; e Khan et al. (2013) para *Prunus amygdalus* Batsch (Rosaceae).

Apesar da importância desse método, o mesmo deve ser testado individualmente para as espécies, considerando especialmente a velocidade do congelamento, para que não ocorra danos pela ruptura das células.

A determinação precisa da umidade é necessária para o manuseio do pólen, podendo ser feita de forma simples, como sugerem Goddard e Matthews (1981), mediante acompanhamento da perda de peso de 1 g na estufa. No entanto, Syder e Clausen (1974) enfatizam que a duração desse processo não deve exceder uma hora, para evitar a volatilização. Esse procedimento deve ser testado para as espécies individualmente, com o controle da viabilidade após o procedimento. Existem métodos que envolvem equipamentos mais sofisticados, desde as décadas de 1970 e 1980, como o aparelho de Ohaus (Goddard; Matthews, 1981), onde a umidade é lida em sete minutos

após a exposição do pólen à luz de uma lâmpada com 4,5 watts de potência e o método de Jensen (1970), citado por Goddard e Matthews (1981), que permite determinar pequenas quantidades de pólen, apresentando boa precisão. O aparelho empregado mede o conteúdo absoluto de umidade de uma amostra sob vácuo intenso. A pressão de vapor liberada é condensada como gelo. Quando o gelo evapora do sistema, causa uma pressão de volume conhecido. Essa pressão resultante é proporcional à massa de água liberada, sendo medida, em seguida, por um manômetro a óleo.

Atualmente existem equipamentos que determinam com precisão a umidade de uma pequena quantidade de pólen, bem como a sua viabilidade.

Conforme enfatizado anteriormente, a temperatura desempenha um papel crucial na manutenção da viabilidade do pólen, durante o armazenamento. Para esse propósito, tem-se utilizado mais comumente as seguintes temperaturas: próximo a 25 °C, em laboratório, refrigerador (4 °C), *freezers* e *ultra freezers* (-18 °C, -20 °C, -36 °C, -70 °C - 80 °C), além de crio temperaturas (entre -196 °C e -271 °C, dependendo da finalidade).

Temperaturas mais baixas têm sido mais eficientes para assegurar a viabilidade do pólen por longos períodos (Machado et al., 2014, para coco; Cuchiara et al., 2012, para *Ricinus comunis* L.; Batos; Nikolic, 2013, para abeto-sérvio (*Picea omorika*/Panc./Purkyne); Akond et al., 2012, para *Lagerstroemia* spp.; Chagas et al., 2009, para pêssego e nectarina; Imani et al., 2011, para quatro cultivares de maçã; Özcan, 2020, armazenando pólen de *Prunus avium* L.; Kulus, 2019, para pólen de tomate, dentre inúmeras outras espécies).

A criopreservação (entre -180 °C e -271 °C), com o emprego de gases liquefeitos, tem sido enfatizada para a conservação do pólen, especialmente em nitrogênio líquido (-196 °C). Essas temperaturas, de acordo com Stanley e Linskens (1974), reduzem a atividade citoplasmática a praticamente zero. Dessa forma, o pólen pode ser armazenado por um longo período de tempo.

Stanley e Linskens (1974) citam estudos indicando que o pólen de *Lupinus* preservado sob temperatura de -180 °C poderia permanecer inalterado e vivo por aproximadamente um milhão de anos. Porém, nem todas as espécies resistem a esse tipo de armazenamento. Diversos estudos, e dentre eles o de Jia et al. (2017), que estudaram 20 espécies ornamentais e demonstraram que algumas foram severamente danificadas pelo armazenamento criogênico. Os autores atribuíram esse resultado ao estresse oxidativo induzido pelo armazenamento criogênico no nitrogênio líquido.

Deve-se salientar que o processo de congelamento se mostra uma etapa crítica na manutenção da viabilidade do pólen. Se, por um lado, a umidade mais elevada pode provocar danos pela formação de gelo intracelular, por outro, segundo Kartha (1985), o limite inferior estimado entre 1% e 5% deve ser utilizado com cuidado, pois pode haver redução de viabilidade nesses níveis.

Para evitar injúrias pelo congelamento, tem-se utilizado os crioprotetores. Inúmeros produtos têm sido empregados, tais como etanol, glicóis DMSO (dimetilsulfóxido), acetato de amônio, carboidratos, sorbitol, betaína, sarcosina, uréia, açúcares, álcoois-açúcares, diferentes aminoácidos, polióis, óxido de trimetilamina e o glicerol, como o mais efetivo deles (Kartha, 1985). O último apresenta a vantagem de não ser tóxico, mesmo em alta concentração. Porém, tem sido eficiente para as células animais (Kartha, 1985), mas não para os vegetais (Luza; Polito, 1988). No entanto, pesquisas mais recentes têm mostrado o potencial do glicerol para pólen (Nogueira et al., 2011) para feijão; Vargas et al., 2011, para mamona). Os aminoácidos são considerados bons crioprotetores de células vegetais, devido à sua rápida permeabilidade (Kartha, 1985).

Outro fator muito discutido no armazenamento em nitrogênio líquido é a velocidade do processo. Pesquisadores como Luza e Polito (1988) aconselham o congelamento lento ($1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$), mas citam autores que utilizaram um amplo intervalo de velocidade variando de $0,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Lee et al., 1985, para *Simmondsia* sp.) e ainda autores que encontraram bons resultados, como Nath e Anderson (1975), com uma alta velocidade de congelamento ($200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, para *Lilium longiflorum* L. e *Zea mays* L.).

Esse tipo de armazenamento apresenta um custo elevado, em relação aos demais, e tem sido utilizado nos bancos de conservação (ex situ) e também para o armazenamento de longo prazo em programas de melhoramento de espécies cultivadas. Nesse sentido, Senula e Keller (2014) citam a importância dessa técnica na preservação de *Allium cepa* L. Livingston e Ching (1967) destacam que dois pesquisadores japoneses mantiveram viável o pólen de 30 espécies de angiospermas, por um período de 5 a 7 anos, em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Gomes et al. (2003) conservaram pólen de cebola (*Allium cepa* L.) por dois anos de armazenamento. Ganeshan e Alexander (1991) armazenaram o pólen de quatro variedades de limão durante 3,5 anos, Marchant et al. (1992) armazenaram duas cultivares de rosa inglesa, Chaudhury et al. (2010) armazenaram pólen de manga (*Mangifera indica* L.) e lichia (*Litchi chinensis* Sonn.). Da mesma forma, obtiveram êxito no armazenamento de pólenes, Xu et al. (2014), para *Camellia*, *Paeonia* e *Prunus mume*, Karun et al. (2014), para o pólen de coco; Kulus (2019), para pólen de tomate, Dinato et al. (2020), para o pólen de capim-da-bahia (*Paspalum notatum* Flugge), dentre muitas outras espécies.

Todavia, havendo a necessidade de utilização do pólen armazenado com teor de umidade muito baixo, deve-se preceder à reumidificação. Esse procedimento tem sido feito rotineiramente para a germinação do pólen de diversas espécies (Duffield; Snow, 1941; Cohen et al., 1989; Parton, 1998, Tyagi; McComb, 1992; Kozłowski; Pallardy, 2002).

Sousa (1990) deu início, no Brasil, aos estudos de criopreservação para *Eucalyptus* spp. Para isso, utilizou pólenes com umidade reduzida. A taxa de resfriamento em

nitrogênio líquido (-196 °C) foi de 19 °C min⁻¹ e a viabilidade, determinada pelo teste de germinação *in vitro*, mostrou que, sob essas condições, o pólen das espécies estudadas não foi negativamente afetado, demonstrando o potencial para o armazenamento de *Eucalyptus* spp. Deve-se enfatizar, então, que a taxa de resfriamento é um dos fatores mais importantes para a aplicação dessa técnica.

Outros fatores que atuam na viabilidade do pólen armazenado

Além da umidade e temperatura, outros elementos desempenham um papel importante na manutenção da viabilidade do pólen durante o armazenamento, dentre eles os fatores genéticos que têm sido determinantes ao armazenamento do pólen de diversas espécies, tais como variedades de chá (Lei et al., 2020), cultivares de rosa (Giovannini et al., 2015), acessos de coco (Machado et al., 2014) e árvores de abeto-sérvio (*Picea omorika* [Pancic] Purkyne) (Batos; Miljković, 2019).

Elucidações sobre o decréscimo de viabilidade durante o armazenamento envolve, ainda, o metabolismo dos carboidratos (Carrizo Garcia et al., 2015) ou carboidratos e proteínas (Kirby; Smith, 1974; Stanley; Linskens, 1974). Oliver et al. (1997) destacam os altos níveis de ácidos graxos. Ademais, a inativação das enzimas, hormônios de crescimento e ácido pantotênico, além dos danos provocados pela dessecação, também podem contribuir para o decréscimo da viabilidade do pólen (Harrington, 1970; King, 1965, citados por Wang, 1975).

Componentes fisiológicos também contribuem para o sucesso ou fracasso no armazenamento de pólen. Dentre esses, o estado nutricional da planta durante o desenvolvimento do pólen (Linskens; Stanley, 1974).

Independente da forma utilizada para reduzir a umidade em *Eucalyptus* spp., Sousa (1990) demonstrou a resistência de diferentes espécies à dessecação significativa.

A contaminação do pólen também prejudica a sua conservação. Stanley e Linskens (1974) citam diferentes trabalhos enfatizando o problema da infecção por fungos. A influência desses fungos pode ocorrer de forma direta ou indireta. Indiretamente, pode acarretar mudanças químicas dos colóides ou a inibição de enzimas como amilases e invertases. Destacam, ainda, o efeito destrutivo da luz ultravioleta sobre a viabilidade do pólen na prevenção por infecção fúngica.

Testes de viabilidade do pólen

A avaliação da viabilidade de pólenes, tanto recém-colhidos quanto armazenados, é de extrema importância para estabelecer a potencialidade de uso desse material. Para isso, são utilizados tanto os testes *in vivo* quanto *in vitro*.

Testes de germinação in vivo e produção de sementes

No método in vivo, após depositar o pólen em um estigma receptivo, destaca-se o estilete e procede-se à contagem dos tubos que penetraram no estigma, comparando-os, em seguida, com o número total de grãos (Stanley; Linskens, 1974). Entretanto, alguns problemas observados podem afetar esse tipo de avaliação, dentre eles: i) a dificuldade de penetração do tubo polínico na superfície estigmática, devido à superfície cuticular; ii) a presença de água no estigma pode levar ao rompimento do pólen, prejudicando a germinação; iii) incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo; iv) a aplicação de elevada concentração pode inibir a penetração do tubo polínico no estilete; v) ocorrendo uma queda acentuada da temperatura, pode haver uma queda na germinação, levando a uma viabilidade aparentemente baixa; e vi) dificuldade de identificar os grãos germinados no estigma, por ocasião da contagem.

Adicionalmente, utiliza-se a capacidade de o pólen produzir sementes como um critério de avaliação (Stanley; Linskens, 1974). No entanto, os autores citam o agravante do ciclo reprodutivo, como limitante ao uso, dentre outros fatores.

Testes de germinação in vitro

A avaliação in vitro é muito mais vantajosa, por proporcionar maior rapidez.

De acordo com Heslop-Harrison et al. (1984), os métodos utilizados para a avaliação da qualidade do pólen in vitro são: testes de germinação, testes do conteúdo de células vegetativas com corantes, testes de atividades enzimáticas e procedimento fluorocromático (FCR), especialmente testes com integridade de membranas plasmáticas da célula.

Face ao amplo emprego da germinação in vitro e corantes específicos, esses métodos serão melhor abordados.

Vários métodos são conhecidos e descritos por Stanley e Linskens, (1974), para a germinação in vitro. Porém, o que utiliza ágar ou gelatina merece destaque, pela facilidade de incorporação de açúcares e outros elementos estimulantes para a germinação do pólen, propiciando uma umidade relativa constante e adequada à germinação. Esses autores enfatizam as condições aeróbicas da superfície como convenientes e a facilidade de manuseio das lâminas. Para se obter estimativas confiáveis da viabilidade do pólen armazenado, é necessário dispor de um meio de cultura que possibilite a expressão do seu potencial fisiológico para a formação do tubo polínico.

Os componentes do meio de cultura variam de acordo com a espécie e têm sido amplamente estudados. A maioria das espécies necessita de uma fonte de carboidratos e outros elementos estimulantes. O carboidrato é, normalmente, necessário para o crescimento inicial do tubo, mas, segundo Dorman (1976), existem pólenes, como o de *Pinus* spp., que germinam apenas em água destilada. Os dois papéis principais

atribuídos aos açúcares, por Bhojwani e Bhatnagar (1974), referem-se ao controle da pressão osmótica e funcionam também como substrato respiratório. Diversos açúcares são empregados para essa finalidade. Dentre esses, destacam-se a sacarose como um dos mais utilizados em concentrações diversas, considerando as diferentes espécies de plantas (Klaehn; Neu, 1960, para *Prunus serotina* e *Populus tremuloides*; Bomben et al., 1999, para clone triplóide de *Actinidia chinensis*; Cuchiara et al., 2012, para *Ricinus comunis* L; Giovannini et al., 2015, para seis cultivares comerciais de rosas; Chander et al., 2019) para maçã-doce (*Annona squamosa* L.) cv. Balanagar; Batos; Nikolic, 2019, para abeto-sérvio (*Picea omorika* [Pancic] Purkyne), dentre dezenas de outras espécies).

Outros açúcares, como glicose, frutose, lactose, galactose, rafinose e sorbitol, têm sido também pesquisados e empregados para diferentes espécies de plantas (Stanley; Linskens, 1974; Miranda; Clement, 1990; Guarnieri et al., 2006; Imani et al., 2011; Giovannini et al., 2015; Impe et al., 2019).

Os testes de germinação *in vitro* para o *Eucalyptus* spp. (Figuras 3A, 3B e 3C) envolvendo a sacarose, apresentaram bons resultados, desde o início dos testes (Boden, 1958; Gabrielli et al., 1965; Borges et al., 1973). A concentração de 30% foi determinada por Sousa (1988), e tem sido adotada com sucesso, por vários pesquisadores.

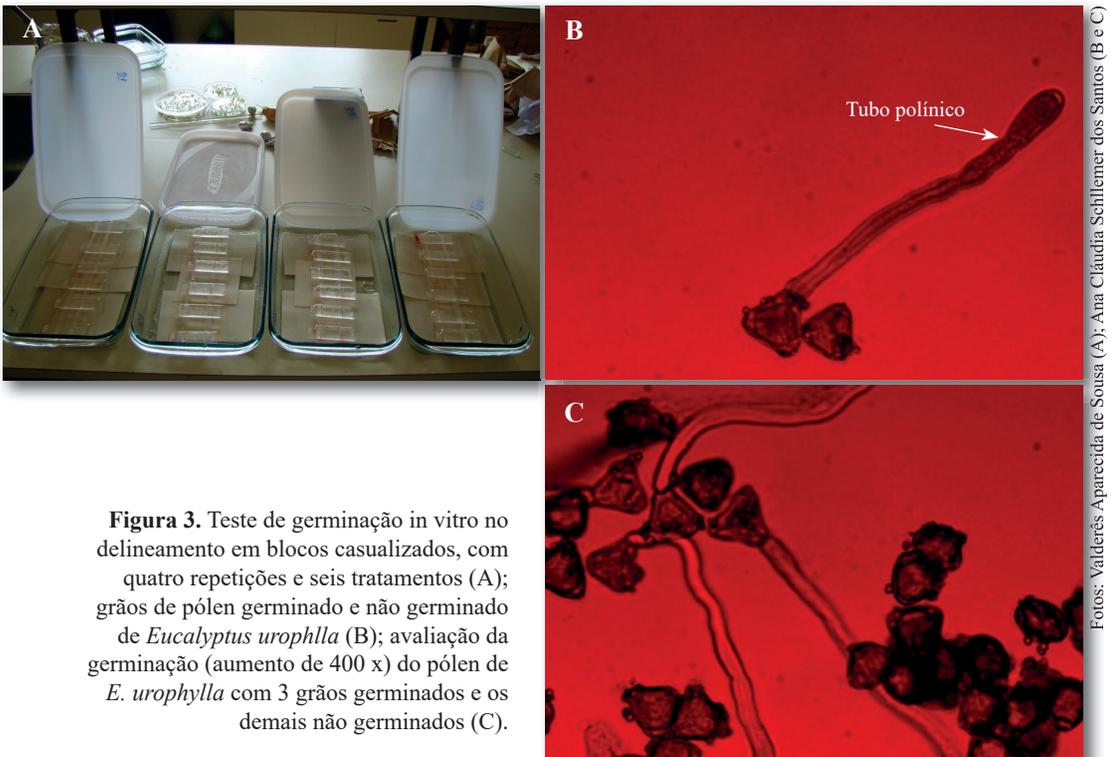


Figura 3. Teste de germinação *in vitro* no delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e seis tratamentos (A); grãos de pólen germinado e não germinado de *Eucalyptus urophylla* (B); avaliação da germinação (aumento de 400 x) do pólen de *E. urophylla* com 3 grãos germinados e os demais não germinados (C).

Além do açúcar, nutrientes, elementos como Ca, B, e Mg, enzimas (celulases e pectinases) e hormônios (auxinas e giberelinas) desempenham um papel fundamental na germinação de determinados pólenes (Bhojwani; Bhatnagar, 1974).

Dentre esses elementos principais, destacam-se B e Ca. De acordo com Bhojwani e Bhatnagar (1974), o B é o mais atuante na germinação e crescimento do tubo polínico. De acordo com esses autores, esse elemento existe na natureza, em nível comparativamente alto no estigma e estilete, suprindo o pólen durante a sua germinação. Dentre os inúmeros papéis que o boro pode desempenhar na germinação, alguns autores atribuem o seu envolvimento na absorção dos açúcares (Bhojwani; Bhatnagar, 1974; Stanley; Linskens, 1974).

O cálcio é outro elemento químico essencial na germinação do pólen e alongação do tubo polínico (Bhojwani; Batnagar, 1974; Snyder; Clausen, 1974; Stanley; Linskens 1974), sendo que o principal papel atribuído ao cálcio é referente às substâncias pécticas (Stanley; Linskens, 1974). Inúmeros são os trabalhos que incorporam o boro e cálcio, individualmente ou em combinação, para uma melhor germinação do pólen, com doses variadas, em função das espécies utilizadas (Miranda; Clement., 1990; Pio et al., 2007; Mortazavi et al., 2010; Imani et al., 2011; Sousa et al., 2016).

Para *Eucalyptus* spp., testes de germinação in vitro têm sido conduzidos há algum tempo, buscando-se o meio mais completo para a germinação adequada do pólen viável. Sousa (1988) definiu o meio de cultura baseado em diferentes espécies de eucalipto (*E. urophylla*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*), sendo a base de ágar (0,8%) e sacarose (30%). Essa concentração de sacarose havia sido indicada por Griffin et al. (1982) para uma solução específica à germinação de *E. grandis*. No entanto, Sousa (1988) adaptou o método inserindo o ágar como solidificante, propiciando a disponibilidade de oxigênio à superfície do meio de cultura, facilitando a germinação. Esse meio tem sido muito utilizado no Brasil, a partir de então. Ainda sobre a adição do boro ao meio de cultura, Sousa (1988) encontrou dificuldade em estabelecer o nível adequado, devido à influência de vários fatores. Para o cálcio, encontrou o melhor resultado de germinação com a aplicação de 220 ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O período de incubação dos testes foi de 24 horas sob temperatura de 25 °C e umidade relativa de 99%.

Visando tornar mais ágeis os testes de germinação in vitro, com uma concentração padrão, Sousa-Lang e Pinto Júnior (1997) adotaram a solução de Brewbaker e Kwack (1963) (100 mg L⁻¹ de H_3BO_3 , 300 mg L⁻¹ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 200 mg L⁻¹ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 100 mg L⁻¹ de KNO_3) nas concentrações de 8 g L⁻¹ e 300 g L⁻¹ para os testes de germinação de *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. robusta* e verificaram a melhor germinação para todas as espécies estudadas, mesmo havendo interação entre o meio de cultura e as espécies. Essa solução tem sido usada com sucesso nos meios de germinação adaptados para diversas plantas (Cohen et al., 1989; Mortazavi et al., 2010; Beck-Pay, 2012; Sousa et al., 2016; Jalca et al. 2019).

Assim, pode-se recomendar para o gênero *Eucalyptus* a germinação de pólen em meio de cultura composto com os seguintes elementos: ágar e sacarose nas concentrações de 8 g L⁻¹ e 300 g L⁻¹ e solução de Brewbaker e Kwack (1963).

Testes com corantes específicos

A determinação da viabilidade do pólen usando corantes específicos é muito atrativa, especialmente devido à rapidez do processo. Ao utilizar esse método, evita-se também o risco de contaminação que pode ocorrer nos testes de germinação de pólen, especialmente para as espécies que requerem um período acima de 24 horas para germinar, tais como *Pinus* spp. e *Araucaria angustifolia*. No entanto, deve-se considerar que os corantes vitais podem colorir o pólen imaturo e abortado, superestimando assim a viabilidade (Stanley; Linskens, 1974). Vários corantes são utilizados para essa finalidade, dentre eles: azul de algodão em lactofenol, anilina azul em lactofenol e tetrazólio nitro azul (Hauser; Morrison, 1964). Stanley e Linskens (1974) destacam, ainda, outros corantes específicos, como: iodeto de potássio, tendo especificidade para amido, carmim acético, que colore preferencialmente cromossomos, e metil floxina verde que colore citoplasma e celulose. Adicionalmente, Soares et al. (2013) empregaram o lugol em seus estudos de viabilidade de pólen de *Passiflora* spp e Sedgley e Harbard (1993) e Novara et al. (2017) empregaram o diacetato de fluoresceína. É importante destacar o cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio, por sua ampla utilização nos testes de viabilidade do pólen de diversas espécies, em diferentes concentrações (Sedgley; Harbard, 1993; Soares et al., 2013; Novara et al., 2017; Özcan et al., 2019). Esse corante reage com enzimas da respiração, produzindo um composto vermelho denominado formazan para pólenes viáveis (Viéitez Cortizo, 1952; Ferreira et al., 2007; Salazar; Delgado, 2018), possibilitando a estimativa da sua viabilidade.

Para evitar o problema da superestimativa dos corantes específicos, Munhoz et al. (2008) aconselham a comparação com testes de germinação *in vitro*.

Assim, a definição de protocolos para testes rápidos, comparados aos testes de germinação *in vitro* para aferição da concentração e tempo de exposição ao corante, é essencial para tornar os corantes específicos atraentes e de amplo uso para *Eucalyptus* spp..

Considerações importantes

A técnica para a produção de híbridos de eucaliptos já foi validada e estabelecida. Porém, a produção de híbridos deve ser melhor planejada, juntamente às empresas do setor florestal. As atividades devem ser baseadas nos resultados dos programas de melhoramento genético das populações puras (espécies) e híbridas, visando viabilizar o aumento contínuo de produção e a qualidade da madeira, a partir da técnica de hibridação.

O manuseio do pólen de *Eucalyptus*, bem como de outras espécies florestais, embora aparentemente simples, requer o domínio de diferentes áreas, como a biologia da espécie, fisiologia e microbiologia, dentre outras. Além disso, o cuidado para a não contaminação com microrganismos e pólenes estranhos é imprescindível para o sucesso da produção de híbridos específicos. Embora a liofilização combinada com a criopreservação (armazenamento) seja mais efetiva para a conservação no longo prazo, com grande potencial futuro, é possível manter pólenes viáveis utilizando processo de secagem mais simples (dessecador, estufas) e armazenando-os em *freezers* (-20 °C), atendendo à demanda para cruzamentos controlados, no médio prazo. Novos protocolos visando otimizar a extração, para aproveitamento total do pólen, e armazenamento de longo prazo, além de testes de viabilidade mais práticos e rápidos, vêm sendo desenvolvidos e deverão tornar o processo mais acessível e rápido, considerando a manipulação de maiores quantidades de pólen.

Referências

- AHLGREN, C. E.; AHLGREN, I. F. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5: needle pine species. **Forest Science**, v. 24, n. 1, p. 100-102, 1978. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/forestscience/24.1.100>.
- AKOND, A. M.; POUNDERS, C. T.; BLYTHE, E. K.; WANG, X. Longevity of crapemyrtle pollen stored at different temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 18, p. 53-57, 2012.
- ALFENAS, R. F.; FREITAS, R. G.; PEREIRA, O. L.; COUTINHO, M. M.; ZARPELON, T. G.; CANDIDO, T. S.; ALFENAS, A. C. Screening of *Corymbia* and *Eucalyptus* species for resistance to *Calonectria pteridis* leaf blight. **Forest Pathology**, v. 46, n. 1, p. 76-81, 2016.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2009.
- ASHTON, D. H. Studies of flowering behaviour in *Eucalyptus regnans* F. Muell. **Australian Journal of Botany**, v. 23, p. 399-411, 1975.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2007. p. 93-121.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, p. 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F. Melhoramento para produtividade e qualidade de celulose de fibra curta. In: WORKSHOP SOBRE MELHORAMENTO DE ESPÉCIES FLORESTAIS E PALMÁCEAS NO BRASIL, Curitiba, 2001. **Anais** [...]. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. p. 193-214.
- ASSIS, T. F. Produção de híbridos interespecíficos em *Eucalyptus spp*. In: REUNIÃO SOBRE TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS, Piracicaba, 1987. **Anais** [...]. Piracicaba: IPEF, 1987. p. 2-5.

- ASSIS, T. F. Production and use of *Eucalyptus* hybrids for industrial purposes. In: QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM, 2000, Noosa, Queensland. **Hybrid breeding and genetics of forest trees: proceedings**. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 63-74. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.
- ASSIS, T. F.; RESENDE, M. D. V. Genetic improvement of forest tree species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 44-49, 2011.
- ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., Nova Prata, 1992. **Anais [...]**. Santa Maria, RS: UFSM, 1992, p. 824-836.
- ASSIS, T.; WARBURTON, P.; HARWOOD, C. Artificially induced protogyny: an advance in the controlled pollination of *Eucalyptus*. **Australian Forestry**, v. 68, n. 1, p. 27-33, 2005.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Associação de *Botryosphaeria dothidea* com a morte de árvores jovens de *Eucalyptus benthamii* no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 84, 2009a.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Doenças em eucaliptos destinados à produção de energia na região Sul do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 3, n. 68, p. 373, 2011.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Ocorrência de mancha de Kirramyces em *Eucalyptus benthamii* na região Sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 85, 2009b.
- AUER C. G.; SANTOS, A. F. Principais doenças em espécies de eucalipto utilizadas para a produção de energia na região sul do Brasil. Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE FLORESTAS ENERGÉTICAS, 1., Belo Horizonte, 2009. **Anais [...]**. Colombo: Embrapa Florestas, 2009c.
- BARNABÁS, B. Effect of water loss on germination ability of maize (*Zea mays* L.) pollen. **Annals of Botany**, v. 55, n. 2, p. 201-204, 1985.
- BATOS B.; MILJKOVIĆ, D. The vitality of the Serbian spruce (*Picea omorika*) pollen during the long-term cryopreservation. **Grana**, v. 58, n. 6, p. 433-46, 2019.
- BATOS, B. Z.; NIKOLIC, B. M. Variability of in vitro germination of *Picea omorika* pollen. **Dendrobiology**, v. 69, p. 13-19, 2013.
- BECK-PAY, S. L. Optimisation of pollen viability tests for *Acacia podalyriifolia* and two ploidys of *Acacia mearnsii*. **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 285-289, 2012.
- BHOJWANI, S. S.; BATNAGAR, S. P. **The Embryology of angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264 p.
- BODEN, R. W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. **Australian Forestry**, v. 12, n. 2, p. 73-81, 1958.
- BODEN, R. W. Hybridisanon in *Eucalyptus*. **Indian Forester**, v. 90, p. 581-586, 1964.
- BOMBEN C.; MALOSSINI C.; CIPRIANI, G.; TESTOLIN R.; RETAMALES, J. Long term storage of kiwifruit pollen. **Acta Horticulturae**, v. 498, p. 105-108, 1999.
- BORGES, C. P.; SILVA, A. A.; FERREIRA, M. Estudos preliminares sobre a conservação do pólen de *Eucalyptus* spp. **IPEF**, n. 6, p. 3-32, 1973.

BOUGHEDIRI, L.; CERCEAU-LARRIVAL, M. T.; DORÉ, J. C. Significance of freeze-drying in long term storage of date palm pollen. **Grana**, v. 34, n. 6, p. 408-12, 1995.

BOYLE, T. H. Environmental control of moisture content and viability in *Schlumbergera truncata* (Cactaceae) pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 126, n. 5, p. 625-630, 2001.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.

BREWBAKER, J. L. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 54, n. 9, p. 1069-1083, 1967.

CAMPINHOS, E.; IKEMORI, Y. K. Selection and management of the basic population *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* established at Aracruz for the long-term breeding program. In: PROCEEDINGS of a conference on breeding tropical trees: population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry. Oxford: Oxford Forestry Institute; Winrock International, 1989. p. 169-175. Edited by: G. L. Gibson; A. R. Griffin; A. C. Matheson of the IUFRO Conference, Pattaya, Thailand, November 1988.

CAMPINHOS JUNIOR, E.; IKEMORI, Y. K. Tree improvement program of *Eucalyptus* spp.: preliminary results. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3., 1977, Canberra. [Proceedings...] Canberra: CISRO, 1978. 22 p.

CANGIANI, S. M. Extração e armazenamento de polen de *Eucalyptus camaldulensis*. **IPEF**, n. 162, 5 p., 1988.

CARRIZO GARCIA, C.; GUARNIERI, M.; PACINI, E. Carbohydrate metabolism in late stages in the recalcitrant pollen of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). **Plant Biology**, v. 17, n. 3, p. 734-739, 2015.

CASTRO, C. A. D. O.; RESENDE, R. T.; BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Brief history of *Eucalyptus* breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9, p. 1585-1593, 2016.

CAUVIN, B. *Eucalyptus* hybridation contrôlée: premiers resultats. In: ANNALES DE RECHERCHES SYLVICOLES, Paris, 1983. Paris: Association Poret-Cellulose, 1983. p. 85-117.

CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; CHAGAS, P. C.; TIZATO, L. H.; BETTIOL NETO, J. E.; NEVES, A. A.; CARVALHO, A. S.; SCARPARE FILHO, J. A.; PIO, R.; PASQUAL, M. Cryopreservation of peach and nectarine pollen grains. In: INTERNATIONAL PEACH SYMPOSIUM, 7., 2009, Lleida, Espanha. **Symposium**. Lleida, 2009, p. 269-275.

CHANDER S.; RAJASEKHARAN, P. E.; KURIAN, R. M. Pollen storage studies in sugar apple (*Annona squamosa* L.) cv. Balanagar. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 66, n. 3-4, p. 196-202, 2019.

CHAPERON, H. Amélioration génétique des *Eucalyptus* hybrides au Congo Brazzaville. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3., 1977, Canberra. [Proceedings...] Canberra: CISRO, 1978. 16 p.

CHAUDHURY, R.; MALIK, S. K.; RAJAN, S. An improved pollen collection and cryopreservation method for highly recalcitrant tropical fruit species of mango (*Mangifera indica* L.) and litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **CryoLetters**, v. 3, n. 3, p. 268-78, 2010.

COHEN, E.; LAVI, U.; SPIEGEL-ROY, P. Papaya pollen viability and storage. **Scientia Horticulturae**, v. 40, n. 4, p. 317-324, 1989.

COMSTOCK, R. E.; ROBINSON, H. F.; HARVEY, P. H. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. **Agronomy Journal**, v. 41, p. 360-367, 1949.

CUCHIARA, C. C.; DOS ANJOS E SILVA, S. D.; BOBROWSKI, V. L. Conservation of castor bean pollen at low temperatures. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, p. 82-87, 2012.

DIETERS M. J.; DUNGEY H. S. Relationship between the relative importance of non-additive variance and the genetic correlation between hybrid and parental populations in some *Pinus* species. In: QFRI/ CRC-SPF SYMPOSIUM, 2000, Noosa, Queensland. **Hybrid breeding and genetics of forest trees: proceedings**. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 87-92. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.

DINATO, N. B.; SANTOS, I. R.; ZANOTTO, V.; BACCILI, B.; et al. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. **Cryoletters**, v. 41, n. 3, p. 115-127, 2020.

DORMAN, K. W. **The genetics and breeding of southern pines**. Washington: USDA. Forest Service, 1976. 407 p. (USDA. For. Serv. Agric. handbook, 471).

DUFFIELD, J. W.; SNOW, J. R.; ALBERT, G. Pollen longevity of *Pinus strobus* and *Pinus resinosa* as controlled by humidity and temperature. **American Journal of Botany**, v. 28, p. 175-177, 1941.

DUNGEY H. S.; POTTS B. M.; CARNEGIE A. J.; ADES P. K. Mycosphaerella leaf disease: genetic variation in damage to *Eucalyptus nitens*, *E. globulus* and their F1 hybrid. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 27, n. 5, p. 750-759, p. 14-26, 1997.

ELLIS M. F.; SEDGLEY M.; GARDNER, J. A. Interspecific pollen-pistil interaction in *Eucalyptus* L. Her. (Myrtaceae) the effect of taxonomic distance. **Annals of Botany**, v. 68, p. 185-194, 1991.

ESPEJO, J.; HARBARD, J.; GRIFFIN, A. R. Consideraciones operacionales de cruzamientos controlados masales (OSP) de *E. globulus* (Labill.) en cuatro temporadas en Forestal y Agrícola Monte Aguila S.A. In: DEVELOPING THE EUCALYPT OF THE FUTURE, Valdivia, 2001. **Symposium**. Valdivia: IUFRO, 2001.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Longman: Harlow. 1996. 360 p.

FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. V. D. R.; ALVIM P. D. O.; ANDRADE, V. de; SILVA, T. T. D. A.; CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, n. 2, 2007.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas no Brasil**. Mogi Guaçu: International Paper, 2002. 98 p.

FERREIRA, M.; SANTOS, P. E. T. dos. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT EUCALYPTS=CONFERÊNCIA IUFRO SOBRE SILVICULTURA E MELHORAMENTO DE EUCALIPTOS, 1997, Salvador. **Proceedings... = Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1997. v. 1. p. 14-34.

FLORENCE, R. G. A comparative study of flowering and seed production in six blackbutt (*Eucalyptus pilularis* Sm.) forest stands. **Australian Forestry**, v. 28, n. 1, p. 23-33, 1964.

FONSECA, S. M.; RESENDE, M. D. V.; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ASSIS, T. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2010. 200 p.

FRANKEL, R.; GALUN, E. **Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. 281 p.

GABRIELLI, A. C.; CUNHA, R. A.; MAULE, V. Conservação do pólen de diversas espécies de *Eucalyptus* para fins de cruzamento. **Revista de Agricultura**, v. 40, n. 2, p. 51-57, 1965.

GANESHAN, S.; ALEXANDER, M. P. Cryogenic preservation of lemon (*Citrus limon* Burm.) pollen. **Gartenbauwissenschaft**, v. 56, n. 5, p. 228-230, 1991.

GIOVANNINI, A.; MACOVEI, A.; DONÀ, M.; VALASSI, A.; CASER, M.; MANSUINO, A.; GHIONE, G. G.; CARBONERA, D.; SCARIOT, V.; BALESTRAZZI, A. Pollen grain preservation at low temperatures in valuable commercial rose cultivars. **Acta Horticulturae**, v. 1064, p. 63-69, 2015.

GODDARD, R.; MATTHEWS, F. Pollen testing. In: FRANKLIN, E.C. (ed.). **Pollen management handbook**. Washington: USDA. Forest Service, 1981. p. 40-43. (USDA. Forest Service Handbook, 587).

GOMES, P. R.; RASEIRA, M. D.; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 14-7, 2003.

GONÇALVES, A. N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in cell and tissue culture system. In: IUFRO EM MELHORAMENTO GENETICO E PRODUTIVIDADE, 1980, Águas de São Pedro. **Anais [...]**. IUFRO: Águas de São Pedro, 1980.

GORE, P. L.; POTTS B. M.; VOLKER P. W.; MEGALOS J. Unilateral cross-incompatibility in *Eucalyptus*: the case of hybridisation between *E. globulus* and *E. nitens*. **Australian Journal of Botany**, v. 38, n. 4, p. 383-394, 1990.

GRAÇA, M. E. C. Avaliação do florescimento e do potencial de produção de sementes de *Eucalyptus dunnii* Maid. no Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 14, p. 1-11, 1987.

GRATTAPAGLIA, D.; RESENDE, M. D. V. Genomic selection in forest tree breeding. **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, n. 2, p. 241-255, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0328-4>.

GRIFFIN, A. R.; CHING, K. K.; JOHNSON, K. W.; HAND, F. C.; BURGESS, I. P. Processing *Eucalyptus* pollen for use in controlled pollination. **Silvae Genetica**, v. 31, n. 5-6, p. 198-203, 1982.

GRIFFIN, A. R. Floral phenology of a stand of mountain ash (*Eucalyptus regnans* F. Muell) in Gippsland, Victoria. **Australian Journal of Botany**, v. 28, p. 393-404, 1980.

GRIFFIN, A. R.; HAND, F. C. Post-anthesis development of flowers of *Eucalyptus regnans* F. Muell. and the timing of artificial pollination. **Australian Forest Research**, v. 9, n. 1, p. 9-15, 1979.

GRIFFIN, A. R.; HARBAR, J. L.; CENTURION, C.; SANTINI P. Breeding *Eucalyptus grandis globulus* and other inter-specific hybrids with high in viability: problem analysis and experience with Shell Forestry projects in Uruguay and Chile. In: In: QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM, 2000, Noosa, Queensland. **Hybrid breeding and genetics of forest trees: proceedings**. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 1-13. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.

- GRIFFIN, A. R.; WHITEMAN, P.; RUDGE, T.; BURGESS, I. P.; MONCUR, M. Effect of paclobutrazol on flower-bud production and vegetative growth in two species of *Eucalyptus*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 23, n. 4, p. 640-647, 1993.
- GRIFFING, B. Concept and general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 463-493, 1956.
- GUARNIERI, M.; SPERANZA, A.; NEPI, M.; ARTESE, D.; PACINI, E. Ripe pollen carbohydrate changes in *Trachycarpus fortunei*: the effect of relative humidity. **Sexual Plant Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 117, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00497-006-0027-3>.
- GWAZE, D. P.; BRIDGWATER, F. E.; LOWE, W. J. Performance of interspecific F1 Eucalypt hybrids in Zimbabwe. **Forest Genetics**, v. 7, p. 295-303, 2000.
- HARBARD, J. L.; GRIFFIN, A. R.; ESPEJO, J. Mass controlled pollination of *Eucalyptus globulus*: a practical reality. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 29, n. 10, p. 1457-1463, 1999.
- HAUSER, E. J.; MORRISON, J. H. The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. **American Journal of Botany**, v. 51, n. 7, p. 748-752, 1964.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K. R. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, n. 4, p. 367-375, 1984.
- HIGA, A. R.; CARVALHO, P. E. R. Sobrevivência e crescimento de doze espécies de eucalipto em Dois Vizinhos, Paraná. **Silvicultura**, v. 3, n. 42, 1990.
- HIGA, R. C. V. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 38, p. 121-123, 1999.
- HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Evolução do jardim clonal de eucalipto para a produção de mudas. **IPEF Notícias**, v. 24, p. 4-6, 2000a.
- HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Monitoramento nutricional e fertilização em macro, mini e microjardim clonal de *Eucalyptus*. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. (ed.) **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000b. p. 191-217.
- HODGE, G. R.; DVORAK, W. S. Provenance variation and within-provenance genetic parameters in *Eucalyptus urophylla* across 125 test sites in Brazil, Colombia, Mexico, South Africa and Venezuela. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, n. 3, p. 57, 2015.
- HODGSON, L. M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station (Formerly Zomerkomst Forest Research Station). **South African Forestry Journal**, n. 97, p. 18-28, 1976.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H.; BUITINK, J.; WALTERS, C.; HOEKSTRA, F. A.; CRANE, J. A model of the effect of temperature and moisture on pollen longevity in air-dry storage environments. **Annals of Botany**, v. 83, n. 2, p. 167-73, 1999.
- IANNELLI, E.; XAVIER, A.; COMERIO, J. Micropropagação do de *Eucalyptus* spp. na Champion. **Silvicultura**, v. 17, p. 33-35, 1996.
- IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório anual da Ibá 2019**. Brasília, DF, 2019. 80 p.

- IMANI, A.; BARZEGAR, K.; PIRIPIREIVATLOU, S.; MASOMI, S. H.; Storage of apple pollen and in vitro germination. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 2, p. 624-9, 2011.
- IMPE, D.; REITZ, J.; KÖPNICK, C.; ROLLETSCHEK, H.; BÖRNER, A.; SENULA, A.; NAGEL, M. Assessment of pollen viability for wheat. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1588, 2019.
- IWANAMI, Y. Absolute dormancy of pollen induced by soaking in organic solvents. **Protoplasma**, v. 84, n. 1-2, p.181-4, 1975.
- IWANAMI, Y. Retaining the viability of *Camellia japonica* pollen in various organic solvents. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1139-41, 1972.
- IWANAMI, Y. The viability of pollen grains of a lily (*Lilium auratum*) and the eggs of the brine-shrimp (*Artemia salina*) soaked in organic solvents for 10 years. **Experientia**, v. 40, n. 6, p. 568-9, 1984.
- JAIN, A.; SHIVANNA, K. R. Storage of pollen grains in organic solvents: effect of organic solvents on leaching of phospholipids and its relationship to pollen viability. **Annals of Botany**, v. 61, n. 3, p. 325-30, 1988.
- JALCA ZAMBRANO, I.; GARCIA CRUZATTY, L. C.; CASTRO OLAYA, J.; VILLAMAR TORRES, R.; GUACHAMBALA CANDO, M. Optimal conditions for pollen storage of *Ochroma pyramidale*. **Bosque**, v. 40, n. 2, p. 227-33, 2019.
- JENSEN, C. J. Some factors influencing survival of pollen on storage procedures. In: FAO-IUFRO, Sec. 22, WORKING GROUP MEETING ON THE SEXUAL REPRODUCTION OF FOREST TREES, Varparanta, Finland. 1970. 18p.
- JIA, M. X.; SHI, Y.; DI, W.; JIANG, X. R.; XU, J.; LIU, Y. ROS-induced oxidative stress is closely related to pollen deterioration following cryopreservation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 4, p. 433-439, 2017.
- KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Variação genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* Hill Maiden. **IPEF**, v. 24, p. 9-26, 1983.
- KARTHA, K. K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. 276 p.
- KARUN, A.; SAJINI, K. K.; NIRAL, V.; AMARNATH, C. H.; REMYA, P.; RAJESH, M. K.; ENGELMANN, F. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation. **CryoLetters**, v. 35, n. 5, p. 407-417, 2014.
- KEATLEY, M. R.; HUDSON, I. L. A comparison of long-term flowering patterns of box-ironbark species in Havelock and Rushworth forests. **Environmental Modeling & Assessment**, v. 12, p. 279-292, 2007.
- KERR, R. J.; DIETERS, M. J.; TIER, B.; DUNGEY, H. S. Simulation of comparative gains from four different hybrid tree breeding strategies. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 34, p. 209-220, 2004b.
- KERR, R. J.; DIETERS, M. J.; TIER, B.; DUNGEY, H. S. Simulation of hybrid forest tree breeding strategies. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 34, p. 195-208, 2004a.
- KHAN, S. A.; PERVEEN, A. N.; SARWAR, G. R. Germination capacity and viability in pollen of *Prunus amygdalus* Batsch (Rosaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 4, p. 1383-5, 2013.

- KHAN, S. A.; PERVEEN, A. N. Germination capacity of stored pollen of *Solanum melongena* L., (Solanaceae) and their maintenance. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 4, p. 921- 930, 2006.
- KHANDURI, V. P.; SHARMA, E. C. M.; SINGH, E. S. P The effects of climate change on plant phenology. **Environmentalist**, v. 28, p. 143-147, 2008.
- KHURANA, D. K.; KHOSLA P. K. Hybrids in forest tree improvement. In: MANDAL, A. K. GIBSON, G. L. (ed.). **Forest genetics and tree breeding**. New Delhi: CBS Publishers and distributors, 1998. p. 86–102.
- KIRBY, E. G.; SMITH, J. E. Elutable substances of pollen grain walls. In: LINSKENS, H. F. (ed.). **Fertilization in higher plants**. North-Holland, Amsterdam, 1974. p. 127–130.
- KLAEHN, F. U.; NEU, R. L. Hardwood pollen study. **Silvae Genetica**, v. 9, n. 2, p. 44-8, 1960.
- KOPP, R. F.; MAYNARD, C. A.; ROCHA DE NIELLA, P.; SMART, L. B.; ABRAHAMSON, L. P. Collection and storage of pollen from *Salix* (Salicaceae). **American journal of Botany**, v. 89, n. 2, p. 248-52, 2002.
- KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. **The Botanical Review**, v. 68, n. 2, p. 270-334, 2002.
- KULUS, D. Managing plant genetic resources using low and ultra-low temperature storage: a case study of tomato. **Biodiversity and Conservation**, v. 28, n. 5, p. 1003-27, 2019.
- LEE, C. W.; THOMAS, J. C.; BUCHMANN, S. L. Factors affecting in vitro germination and storage of jojoba pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, n. 5, p. 671–676, 1985.
- LEI, Y.; WANG, L.; HUANG, F.; DUAN, J.; LUO, Y.; KANG, Y.; YANG, H.; LI, S. Studies on pollen storage and vitality difference of tea plan varieties. **Pakistan Journal of Botany**, v. 52, n. 1, p. 305-309, 2020.
- LIMA, E. A.; SILVA, H. D.; MAGALHÃES, W. L. E.; LAVORANTI, O. J. Caracterização individual de árvores de *Eucalyptus benthamii* para uso energético. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, p. 26, 2007.
- LIVINGSTON, G.K.; CHING, K. K. The longevity and fertility of freeze-dried Douglas-fir pollen. **Silvae Genetica**, v. 16, n. 3, p. 98-101, 1967.
- LUZA, J. G.; POLITO, V. S. Cryopreservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen. **Euphytica**, v. 37, n. 2, p. 141-148, 1988.
- MACHADO, C. D.; MOURA, C. R.; LEMOS, E. E.; RAMOS, S. R.; RIBEIRO, F. E.; LÉDO, A. D. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 36, 2, p. 227-232, 2014.
- MADHIBHA, T.; MUREPA, R.; MUSOKONYI, C.; GAPARE, W. Genetic parameter estimates for interspecific Eucalyptus hybrids and implications for hybrid breeding strategy. **New Forests**, v. 44, n. 1, p. 63-84, 2013.
- MARCAR, N.; BUSH, D.; STEWART, L.; FALKINER, R.; CRAWFORD, D.; LARMOUR, J.; MYERS, B. Eucalypt taxa for low: to medium-rainfall farm forestry in south-eastern Australia. **Australian Forestry**, v. 74, n. 2, p. 112-119, 2011.

- MARCHANT, R.; POWER, J. B.; DAVEY M. R.; CHARTIER-HOLLIS, J. M.; LYNCH, P. T. Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. **Euphytica**, v. 66, n. 3, p. 235-41, 1992.
- MARTIN, B. The benefits of hybridization. How do you breed for them? In: PROCEEDINGS of a conference on breeding tropical trees: population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry. Oxford: Oxford Forestry Institute; Winrock International, 1989. p. 79-92. Edited by: G. L. Gibson; A. R. Griffin; A. C. Matheson of the IUFRO Conference, Pattaya, Thailand, November 1988.
- MARTINS, F. G.; IKEMORI, Y. K. Produção de híbridos de eucalipto na Aracruz. In: REUNIÃO SOBRE TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS, 1987, Piracicaba. **Anais [...]**. Piracicaba: IPEF, 1987, p. 15-16.
- MASSARO, R. A. M.; BONINE, C. A. V.; SCARPINATI, E. A.; PAULA, R. C. D. Viabilidade de aplicação da seleção precoce em testes clonais de *Eucalyptus* spp. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 597-609, 2010.
- MATTHEWS, F. R.; KAUS, J. Pollen storage. In: USDA FOREST SERVICE. **Pollen management handbook**. Washington, 1981. p. 37-39.
- MAYER, E.; GOTTSBERGER, G. Pollen viability in the genus *Silene* (Caryophyllaceae) and its evaluation by means of different test procedures. **Flora**, v. 195, n. 4, p. 349-353, 2000.
- MENCK, A. L.; ODA, S.; MARCHI, E. L.; KOVALSKI, M. E. Influence of the collection system of floral buds on the pollen viability of *Eucalyptus* spp. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v. 43-44, p. 20-3, 1990.
- MIRANDA, I. D. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of the pejibaye pollen (*Bactris gasipaes* HBK, Palmae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.
- MISHRA, R.; SHIVANNA, K. R. Efficacy of organic solvents for storing pollen grains of some leguminous taxa. **Euphytica**, v. 31, n. 3, p. 991-5, 1982.
- MORAN, G. F.; GRIFFIN, A. R. Recent breeding systems. **Silvicultura**, v. 8, n. 31, p. 552-555, 1983.
- MORTAZAVI, S. M. H.; ARZANI, K.; E MOEINI, A. Optimizing storage and in vitro germination of date palm (*Phoenix dactylifera*) pollen, **Journal of Agriculture, Science and Technology**, v. 12, p. 181-189, 2010.
- MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P. da.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. viabilidade polínica de *Carya papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, 2008.
- NATH, J.; ANDERSON, J. O. Effect of freezing and freeze-drying on the viability and storage of *Lilium longiflorum* L. and *Zea mays* L. pollen. **Cryobiology**, v. 12, n. 1, p. 81-8, 1975.
- NIKLES, D. G.; GRIFFIN, A. R. Breeding hybrids of forest trees: definitions, theory, some practical examples and guidelines on strategy with tropical acacias. **ACIAR Proceedings**, n. 37, p. 101-109, 1992.
- NIKLES, D. G.; GRIFFIN, A. R. Breeding hybrids of forest trees: definitions, theory, some practical examples, and guidelines on strategy with tropical acacias. In: BREEDING TECHNOLOGIES FOR TROPICAL ACACIAS: proceedings of an international workshop held in Tawau, Sabah, Malaysia, 1-4 July 1991. **ACIAR Proceedings**, n. 37, 101-109, 1991. Edited by: L. T. CARON; K. M. AKEN.

- NIKLES D. G.; NEWTON R. S. Correlations of breeding values in pure and hybrid populations of hoop pine and some southern pines in Queensland and relevance to breeding strategies. In: PROCEEDINGS of the 12th Meeting of the Research Working Group 1 of the Australian Forestry Council, 1991, Coonawarra. South Australia, 1991, p. 1-5.
- NOGUEIRA, G. F.; CARVALHO, M. A. F.; DA SILVA, D. P. C.; VARGAS, D. P.; PAIVA, R.; NERY, F. C.; DA SILVA, G. A. Effect of glycerol as a cryoprotectant for castor bean pollen for different storage periods. **ISHS Acta Horticulturæ**, n. 908, p. 97-100, 2011. Proceedings of the International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, 1., Leuven, Belgium 2009.
- NOVARA, C.; ASCARI, L.; LA MORGIA, V.; REALE, L.; GENRE, A.; SINISCALCO, C. Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. **Scientia Horticulturæ**, v. 214, p. 295-303, 2017.
- ODA, S.; FERREIRA, M. Produção de híbridos interespecíficos de eucaliptos por polinização aberta. **Silvicultura**, v. 8, n. 28, p. 407-408, 1983. Edição dos anais do Congresso Florestal Brasileiro, 4., 1982, Belo Horizonte.
- OLIVER, A. E.; FISK, E.; CROWE, L. M.; DE ARAUJO, P. S.; CROWE, J. H. Evidence of phospholipase activity in phospholipid bilayers under conditions of low hydration. **Journal of Plant Physiology**, v. 150, n. 6, p. 661-7, 1997.
- ÖZCAN, A. Effect of Low-temperature Storage on Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Pollen Quality. **HortScience**, v. 55, n. 2, p. 258-60, 2020.
- ÖZCAN, A.; SUTYEMEZ, M.; BUKUCU, S. B.; ERGUN, M. Pollen viability and germinability of walnut: a comparison between storage at cold and room temperatures. **Feb-Fresenius Environmental Bulletin**, p. 1-111, 2019.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Considerações sobre o plantio de *Eucalyptus dunnii* no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 7 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 141).
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T.; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. (Embrapa Florestas. Documentos, 129).
- PARTON, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. Cryostorage of *Aechmea fasciata* pollen. **Cryo-letters**, v. 19, n. 6, p. 355-60, 1998.
- PERVEEN, A.; ALIKHAN, R. A.; ABID, R. Maintenance of pollen germination capacity of *Carica papaya* L. (Caricaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 5, p. 403-6, 2007.
- PERVEEN, A. N.; KHAN, S. A. Maintenance of pollen germination capacity of *Glycine max* (L.) Merr., (Papilionaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 2083-6, 2009.
- PERVEEN, A. N.; SARWAR, G. R. Pollen germination capacity of two cultivated species *Jasminum sambac* (L.) Ait and *Nycanthes arbor-tristis* L. of family Oleaceae. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 4, p. 2109-12, 2011.
- PIO, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

POTTS, B. M.; DUNGEY, H. S. Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. **New Forest**, v. 27, p. 115–138, 2004.

POTTS, B. M.; POTTS W. C.; CAUVIN, B. Inbreeding and interspecific hybridisation in *Eucalyptus gunnii*. **Silvae Genetica**, v. 36, p. 194–198, 1987.

POTTS B. M.; VOLKER, P. W.; DUNGEY H. S. Barriers to the production of interspecific hybrids in *Eucalyptus*. In: MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST-GROWING FOREST TREE SPECIES, 1992, Bordeaux, France. **Symposium**. Bordeaux, Nangis: AFOCELIUFRO, 1992, p. 193–204.

PRYOR, L. D. Controlled pollination of *Eucalyptus*. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 76, p. 135–139, 1951.

PRYOR, L. D.; JOHNSON, L. A. S. A Classification of the *Eucalypts*. **Taxon**, v. 21, n. 1, p. 192, 1971.

PRYOR, L. D. The inheritance of some characters in *Eucalyptus*, **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 77, p. 147–155, 1957.

PRYOR, L. D. An F1 hybrid between *Eucalyptus cinerea* F. Muell and *Eucalyptus robusta* Smith. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, n. 5/6, 1954.

RESENDE, M. D. V. **Análise estatística de modelos mistos via REML/BLUP na experimentação em melhoramento de plantas perenes**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 101 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 47).

RESENDE, M. D. V.; ASSIS T. F. Seleção recorrente recíproca entre populações sintéticas multi-espécies (SRR-PSME) de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 57, p. 57–60, 2008.

RESENDE, M. D. V. de; BARBOSA, M. H. P. **Melhoramento genético de plantas de propagação assexuada**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 130 p.

RESENDE, M. D. V.; BARBOSA, M. H. P.; REZENDE, G. D. S.; AGUIAR, A. M.; DIAS, L. D. S.; STURION, J. A. Métodos e estratégias de melhoramento de espécies perenes: estado da arte e perspectivas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais [...]**. Passo Fundo: Embrapa Trigo: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2005.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2002. 975 p.

RESENDE, M. D. V.; HIGA, A. R. Estratégias de melhoramento para eucaliptos visando a seleção de híbridos. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 21, p. 49–60, 1990.

RESENDE, M. D. V.; LOPES P. S.; SILVA R. L.; PIRES I. E. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 56, p. 63–78, 2008.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 435 p.

RESENDE, M. D. V.; OLIVEIRA, E. B.; HIGA A. R. Utilização de índices de seleção no melhoramento de eucalipto. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 21, p.1–13, 1990.

- RETIF, E. C. L.; STANGER, T. K. Genetic parameters of pure and hybrid populations of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* and implications for hybrid breeding strategy. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, v. 71, p. 133–140, 2009.
- REZENDE, G. D. S. P.; RESENDE M. D. V. Dominance effects in *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* and hybrids. In: QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM, 2000, Noosa, Queensland. Hybrid breeding and genetics of forest trees: proceedings. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 93-100. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.
- RODRIGUES, É. D. A. C.; SILVA ROSADO, S. C.; TRUGILHO, P. F.; SANTOS, A. M. Seleção de clones de *Eucalyptus* para as propriedades físicas da madeira avaliadas em árvores no campo. **Cerne**, v. 14, n. 2, p. 147-152, 2008.
- ROSADO, A. M.; ROSADO, T. B.; RESENDE JÚNIOR, M. F. R.; BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Ganhos genéticos preditos por diferentes métodos de seleção em progênies de *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1653-1659, 2009.
- SALAZAR, S. A.; DELGADO, E. A. B. Viabilidad de semillas de *Glycine max* (L.) utilizando la prueba de tetrazólio. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 89-98, 2018.
- SANTOS, A. P.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M. L.; REIS, G. G. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, n. 68, p. 29-38, 2005.
- SEDGLEY, M.; HARBARD, J. Pollen storage and breeding system in relation to controlled pollination of four species of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). **Australian Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 601-9, 1993.
- SENULA, A.; KELLER, E. R. J. Pollen cryopreservation to support maintenance of a wild species collection of the genus *Allium*. **Acta Horticulturae**, n. 1039, 289-296, 2014.
- SHEN, X. Hybridisation of forest tree species in China. In: QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM, 2000, Noosa, Queensland. **Hybrid breeding and genetics of forest trees: proceedings**. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 491-499. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.
- SILVA, L. **Melhoramento genético de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage visando a produção de madeira serrada em áreas de ocorrência de geadas severas**. 2008. 275 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SIREGAR, I. Z.; SWEET, G. B. The impact of extraction and storage conditions on the viability of radiata pine pollen. **Silvae Genetica**, v. 49, n. 1, p. 10-4, 2000.
- SNYDER, E. B. **Extracting, processing, and storing southern pine pollen**. New Orleans: U.S. Forest Service. Southern Forest Experiment Station, 1961. 14 p. (Occasional paper, Southern Forest Experiment Station, 191).
- SNYDER, E. B.; CLAUSEN, K. E. Pollen handling. In: USDA FOREST SERVICE. **Seeds of woody plants in the United States**. Washington, 1974. p. 75-97.
- SOARES, I. D.; AUER C. G.; SANTOS, A. F.; TAMBARUSSI, E. V.; REZENDE, E. H.; COELHO, T. D. V.; DUIN, I. M. Fungos associados à mancha foliar em *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage na Região Sul do Brasil. **Biofix Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p. 32-37, 2017.

- SOARES, T. L.; JESUS, O. N.; SANTOS-SEREJO, J. A.; OLIVEIRA, E. J. In vitro pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1116-26, 2013.
- SOUSA, A. S.; SANTOS, M. G.; PELACANI, C. R.; SANTOS, F. D. Testing culture media for pollen germination of *Elaeis guineensis* Jacq. (oil palm, Arecaceae). **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 182, n. 2, p. 536-42, 2016.
- SOUSA, V. A.; HIGA, R. C. Fenologia de florescimento e frutificação de *Eucalyptus dunnii*. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 22/23, p. 9-19, 1991.
- SOUSA, V. A. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 21, p. 15-19, 1990.
- SOUSA, V. A. de. **Manejo e viabilidade de pólen de Eucalyptus spp.** 1988. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SOUSA, V. A.; PINTO JÚNIOR, J. E. Efeito de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 24/25, p. 9-17, 1992.
- SOUSA, V. A. **Relatório do Convênio ESALQ/IPEF e Champion Papel e Celulose S.A.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1982. 50 p. Apresentado à área de melhoramento florestal.
- SOUSA-LANG, V. A.; PINTO JÚNIOR, J. E. Influência do meio de cultura na germinação do pólen de três espécies de *Eucalyptus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 34, p. 45-54, 1997.
- SOUZA, V. A.; GONÇALVES, A. N. Efeitos de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 5.;1986, Olinda. **Anais [...]**. São Paulo: SBS, 1986. p.76, 1986.
- SPRAGUE, J. R.; JOHNSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14, Gainesville, 1977. **Proceedings [...]**. Macon, Eastern Tree Seed, 1977. p.20-7.
- STANLEY, R. G; LINSKENS, H. F. Pollen: **Biology, Biochemistry, Management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.
- TIBBITS, W. N. Controlled Pollination Studies with Shining Gum (*Eucalyptus nitens*, Deane and Maiden). **Forestry**, v. 62, p. 111-126. 1989.
- TRINDADE, H.; BOAVIDA, L. C.; BORRALHO, N.; FEIJO, J. A. Successful fertilization and seed set from pollination on immature non-dehisced flowers of *Eucalyptus globulus*. **Annals of Botany**, v. 87, n. 4, p. 469-475, 2001.
- TYAGI, A.; CONSIDINE, J. A.; MCCOMB J. Germination of verticordia pollen after storage at different temperatures. **Australian Journal of Botany**, v. 40, n. 2, p. 151-5, 1992.
- VALE, E. D.; MOREIRA, S. O.; VASCONCELOS, L. F.; GUIMARÃES, A. R.; COSTA, M. D. Conservation and degreasing of bacury pollen grains. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 2, p. 192-5, 2016.
- VAN WYK, G. Pollen handling, controlled pollination and grafting of *Eucalyptus grandis*/ Stuifmeelhantering, Beheerde Bestuwing En Ent Van *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v. 101, n. 1, p. 47-53, 1977.

- VARGAS, D. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, G. F.; CARVALHO, M. A. F.; SILVA, D. P. C. da; NERY, F. C.; DA SILVA, G. A. Effect of glycerol as a cryoprotectant for castor bean pollen for different storage periods. **Acta Horticulturae**, v. 908, p. 97-100, 2011.
- VENKARESH, C. S.; SHARMA, V. K. Hybrid vigour in controlled interspecific crosses of *Eucalyptus tereticomis* x *E. camaldulensis*. **Silvae Genetica**, v. 26, p. 121-124, 1977b.
- VENKATESH C. S.; SHARMA U. K. Rapid growth rate and higher yield potential of heterotic *Eucalyptus* species hybrid". **Indian Forester**, v. 13, p. 795-802, 1977b..
- VERRYN, S. D. *Eucalyptus* breeding in South Africa. In: QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM, 2000, Noosa, Queensland. **Hybrid breeding and genetics of forest trees**: proceedings. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 191-199. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.
- VERRYN, S. D.; FAIRBANKS, D.; PIERCE B.; DYER C. Understanding the deployment of various eucalypt species and hybrids on a range of sites in southern Africa using fuzzy set logic. In: QFRI-IUFRO, 1996, Caloundra, Queensland. **Conference tree improvement for sustainable tropical forestry**: Proceedings. Queensland Forestry Research Institute, Gympie, Australia, 1996, v. 2, p. 347-350. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.
- VIÉITEZ CORTIZO, E. El uso del cloruro 2, 3, 5-trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen. **Annals of Plant Edaphology and Physiology**, v. 12, n. 12, p. 1033-1044, 1952.
- VIGNERON, P.; BOUVET, J. M.; BOUVET, J. M.; GOUMA R.; SAYA, A.; GION J.M.; VERHAEGEN D. Eucalypt hybrids breeding in Congo. In: QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM, 2000, Noosa, Queensland. **Hybrid breeding and genetics of forest trees**: proceedings. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 14-26. Compiled by: H. S. Dungey; M. J. Dieters; D. Nikles.
- VOLKER, P. Quantitative genetics of *Eucalyptus globulus*, *E. nitens* and their F1 hybrid. 2002, 189 p. Thesis PhD-University of Tasmania, Hobart.
- VOLKER, P. W.; BADCOCK, K.; GORE, P. L. Flowering patterns in a multi-provenance seed orchard of *Eucalyptus globulus*. In: RESEARCH WORKING GROUP N° 1 OF THE AUSTRALIAN FORESTRY COUNCIL, FOREST GENETICS, 1988, Canberra. **Proceedings of Tenth Meeting**. Gympie: Australian Forestry Council. Canberra, 1988, p. 239-241.
- WANG, B. S. P. The seeds and pollen storage for genetic conservation. Possibilities and limitation In: FAO. **The methodology of conservation of Forest Genetic Resources**. Rome, 1975, p. 93-103.
- WANG, G.; YANG, M. Traits for indirect selection of wind-firmness in *E. grandis*, *E. urophylla* and hybrid clones. In: QFRI-IUFRO, 1996, Caloundra, Queensland. Conference tree improvement for sustainable tropical forestry: **Proceedings**. Queensland Forestry Research Institute, Gympie, Australia, 1996, v. 1, p. 173-177. Compiled by: M. Dieters; A. Matheson.; D. Nikles; C. Harwood; S. Walker.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; MOKOTEDI, M. E. O.; JAIN, S. M. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2012. p. 217-244.
- WHITE, T. L.; ADAMS, W. T.; NEALE, D. B. (ed.). **Forest genetics**. [S.l.]: Cabi, 2007. 702 p.
- WILLIAMS, D.; POTTS, B. M.; BLACK, P. O. Testing single visit pollination procedures for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. **Australian Forestry**, v. 62, v. 4, p. 346-352, 1999.

XAVIER A.; COMÉRIO J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, p. 9-16, 1996.

XU, J.; LI, B.; LIU, Q.; SHI, Y.; PENG, J.; JIA, M.; LIU, Y. Wide-scale pollen banking of ornamental plants through cryopreservation. **CryoLetters**, v. 35, n. 4, p. 312-319, 2014.

YABUYA, T. Pollen storage of *Iris ensata* Thunb. in organic solvents and dry air under freezing. **Japanese Journal of Breeding**, v. 33, n. 3, p. 269-74, 1983.