

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

ANA CLAUDIA SCHLLEMER DOS SANTOS

TÉCNICAS PARA AVALIAR A VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Eucalyptus brassiana* E *Eucalyptus urophylla*.

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS

2016

ANA CLAUDIA SCHLLEMER DOS SANTOS

TÉCNICAS PARA AVALIAR A VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Eucalyptus brassiana* E *Eucalyptus urophylla*.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia Florestal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Neumann Wendt

Co-orientadora: Dr^a. Valderês Aparecida de Sousa

DOIS VIZINHOS

2016

S237t Santos, Ana Claudia Schllemer dos.
Técnicas para avaliar a viabilidade do pólen de
Eucalyptus brassiana e *Eucalyptus urophylla*. / Ana
Claudia Schllemer dos Santos – Dois Vizinhos: [s.n],
2016.
46f.:il.

Orientadora: Simone Neumann Wendt
Co-orientadora: Valderês Aparecida de Sousa
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de
Engenharia Florestal. Dois Vizinhos, 2016.
Bibliografia p.41-46

1.*Eucalyptus*. 2.Germinação *in vitro*. I.Wendt,
Simone Neumann, orient. II.Sousa, Valderês Aparecida
de, co-orient. III.Universidade Tecnológica Federal do
Paraná – Dois Vizinhos. IV.Título

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



TERMO DE APROVAÇÃO

Título

TÉCNICAS PARA AVALIAR A VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Eucalyptus brassiana* E *Eucalyptus urophylla*.

por

Ana Claudia Schllemer dos Santos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 07 de dezembro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dra. Simone Neumann Wendt
Orientador(a)

Prof. Dr. Américo Wagner Junior
Membro titular (UTFPR)

Prof. Dr. Mauricio Romero Gorenstein
Membro titular (UTFPR)

Prof. Dra. Daniela Aparecida Estevan
Membro titular (UTFPR)

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

RESUMO

SANTOS, Ana Claudia Schllemer dos. Técnicas para avaliar a viabilidade do pólen de *Eucalyptus brassiana* e *Eucalyptus urophylla*. 2016. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

O gênero *Eucalyptus* apresenta várias espécies com ampla utilização, como matéria prima para a indústria madeireira, de papel e celulose, fabricação de móveis e produção de energia. Os programas de melhoramento têm contribuído para aumentar a produtividade e qualidade dos produtos desta espécie. Esse sucesso deve-se principalmente a utilização da hibridação, empregando-se a polinização controlada. Essa técnica apresenta inúmeras vantagens na síntese de híbridos, pois, além de proporcionar o conhecimento da capacidade geral e/ou específica de combinação das matrizes, possibilita o cruzamento entre parentais com características específicas para o melhoramento florestal. Para que esse processo seja bem-sucedido é de extrema importância o uso de pólen viável, adequadamente manipulado, incluindo a coleta, extração, secagem, armazenamento e a análise da sua viabilidade. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer melhor técnica para indicar a viabilidade do pólen de *Eucalyptus brassiana* e *Eucalyptus urophylla*. O trabalho foi realizado no Laboratório de Pólen da Embrapa Florestas, no município de Colombo – Paraná. Neste estudo, foram utilizados os pólenes de duas espécies do gênero *Eucalyptus*: *E. brassiana* S.T. Blake, *E. urophylla* S.T. Blake. Para os testes de germinação *in vitro* foram utilizados diferentes meios de cultura considerando o meio de Brewbaker & Kwack, e diferentes tipos de açúcares: sacarose, frutose, lactose, galactose, glicose. Os ensaios de germinação foram realizados em blocos ao acaso, com quatro repetições e a contagem de 300 grãos de pólen por repetição. Foram considerados como germinados os grãos que apresentarem tubo polínico com comprimento maior que seu diâmetro maior. Para a análise da viabilidade utilizando corantes específicos, foram empregados o uso de diferentes corantes e concentrações: 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) com as concentrações 0,5 %, 1,0 % e 1,5 % e Azul de Lactofenol a 1 %. Com isso foi possível o aperfeiçoamento de técnicas adequadas para os testes de viabilidade do pólen de *E. urophylla* e *E. brassiana* empregadas no trabalho. O açúcar que se mostrou mais eficiente foi a sacarose proporcionando as maiores porcentagens de germinação, 79,17 % e 63,50 %, para *E. urophylla* e *E. brassiana*, respectivamente e o corante que melhor expressou a viabilidade polínica foi o 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio com a concentração de 1,5% por 60 minutos.

Palavras-chave: *Eucalyptus*. Corantes. Germinação *in vitro*.

ABSTRACT

SANTOS, Ana Claudia Schllemer dos. Techniques for evaluating the viability of *Eucalyptus brassiana* and *Eucalyptus urophylla* pollen. 2016. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso II (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

The genus *Eucalyptus* presents several species with wide use, as raw material for a wood industry, pulp and paper, furniture manufacturing and energy production. Breeding programs have contributed to increasing the productivity and quality of the products of this species. This success is mainly due to the use of hybridization, using a controlled pollination. This technique is useful for the advantages of a hybrid synthesis, besides providing knowledge of the general capacity and for the specific combination of the matrices, the possibility of crossing between relatives with specific characteristics for the forest improvement. For this well-being to be successful, there must be a matter of utmost importance for the use of a viable, properly manipulated, including collection, extraction, drying, storage and analysis of its viability. The present work had as objective to establish a better technique to indicate the viability of *Eucalyptus brassiana* and *Eucalyptus urophylla* pollen. The work was carried out in the Pollen Laboratory of Embrapa Florestas, in the municipality of Colombo - Paraná. In this study, the pollen of two species of the genus *Eucalyptus* was used: *E. brassiana* S.T. Blake, *E. urophylla* S.T. Blake. For the in vitro germination tests different culture media were used considering Brewbaker & Kwack medium, and different types of sugars: sucrose, fructose, lactose, galactose, glucose. The germination assays were performed in randomized blocks with four replicates and a 300 gram count. The grains that presented the pollen tube larger than its larger diameter were considered as germinated. Analysis of viability through specific dyes, using and using different dyes and concentrations: 2,3,5 Chloride Of triphenyltetrazolium (TTC) with concentrations of 0.5%, 1.0% and 1.5% and Lactophenol Blue the 1 %. With this, it was possible to improve adequate techniques for the feasibility tests of *E. urophylla* and *E. brassiana* pollen employed in the work. The sugar that was most efficient for a higher percentage of germination, 79.17% and 63.50% for *E. urophylla* and *E. brassiana*, respectively, and the dye that best expressed a pollen viability for 2,3,5 Chloride Of triphenyltetrazolium at a concentration of 1.5% for 60 minutes.

Keywords: *Eucalyptus*. Dyes. In vitro germination.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
AGRADECIMENTOS	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. JUSTIFICATIVA	14
5. REFERENCIAL TEÓRICO	15
5.1 Espécies do gênero <i>Eucalyptus</i>	15
5.2 Importância socioeconômica e ambiental.....	16
5.3 Hibridação nos programas de melhoramento.....	17
5.4 Fatores que afetam a viabilidade do pólen.....	18
5.4.1 Manejo do pólen.....	18
5.4.2 Testes para avaliar a viabilidade do pólen.....	20
5.4.2.1 Germinação do pólen <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	20
5.4.2.2 Corantes específicos.....	22
6. MATERIAL E MÉTODOS	24
6.1 Material vegetal.....	24
6.4 Testes de germinação <i>in vitro</i>	24
6.5 Corantes específicos.....	28
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
7.1. Testes de germinação <i>in vitro</i>	30
7.2. Corantes específicos.....	34
7.3 Comparação entre corantes específicos.....	37
8. CONCLUSÕES	39
APÊNDICE A	40
REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pesagem dos materiais utilizados, 0,8 g de ágar e 30 g de cada açúcar, para cada um dos cinco meios testados. Fonte: A autora, 2016.....	25
Figura 2 - Lâminas com o meio solidificado e com o pólen de <i>E. brassiana</i> e <i>E. urophylla</i> aplicado sobre as mesmas. Fonte: A autora, 2016.....	26
Figura 3 - Cubas de vidro representando os blocos, dentro da BOD, com umidade e temperatura controladas. Fonte: A autora, 2016.	27
Figura 4 - Lâminas contendo os tratamentos, onde foram aplicadas gotas de safranina 1%. Fonte: A autora, 2016.	27
Figura 5 - Pólen de <i>E. urophylla</i> germinado, representado por seu tubo polínico maior que seu maior diâmetro. Fonte: A autora, 2016.	31
Figura 6 - Lâminas com açúcar lactose, representadas pela seta, e com atividade fúngica sobre as mesmas. Fonte: A autora, 2016.	33
Figura 7 - Lâminas com açúcar frutose, que não solidificou e extravasou fora da lamina, como mostra a seta. Fonte: A autora, 2016.....	34
Figura 8 - Pólens viáveis são avermelhados (seta amarela), e pólenes incolores são inviáveis. Fonte: A autora, 2016.	35
Figura 9 - Pólens viáveis de <i>E. urophylla</i> , com o corante Azul de Lactofenol. Fonte: A autora, 2016.	36
Figura 10 - Pólens inviáveis de <i>E. urophylla</i> , com o corante Azul de Lactofenol. Fonte: A autora, 2016.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de variância para os dados de germinação, para todos os tratamentos.	30
Tabela 2 - Média da porcentagem de germinação para os diferentes tratamentos, letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a $P < 0,01$	31
Tabela 3 – Coloração pelo corante TTC, para os diferentes tempos, espécies e concentrações.	35
Tabela 4 – Coloração pelo corante azul de Lactofenol, para os diferentes períodos e espécies.	36
Tabela 5 – Porcentagem média de germinação e de coloração pelos corantes TTC e Azul de Lactofenol, mostrando a diferença entre os dois corantes.	38

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente quero agradecer a Deus, pois sem sua força não teria conseguido, agradeço pelo aprendizado, pelos dias de dificuldade, mas o Senhor sempre esteve ao meu lado, acalmando meu coração e dando solução para os meus problemas.

- Aos meus pais, Cirlene de Godoy dos Santos e Lauro Schillemer dos Santos, pela capacidade de acreditar e investir em mim. Seus cuidados, amor e dedicação foram que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir, vocês sempre significaram segurança e certeza de que não estava sozinha nessa caminhada e que nunca mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

- Agradeço a minha irmã Kelly, que sempre está pronta para me ouvir e aconselhar, agradeço pela amizade, carinho e compreensão.

- Agradeço ao meu irmão Lucas, pelos conselhos e apoio sempre em cada escolha.

- Ao meu namorado Jean, pela paciência, pelo apoio incondicional, pelo carinho, amor e compreensão, pelo incentivo, por me confortar nos momentos difíceis, pelas alegrias e tristezas compartilhadas na convivência de cada semestre.

- A minha orientadora professora Dr^a Simone Neumann Wendt, pela paciência e compreensão na orientação e apoio sempre.

- A minha co-orientadora Dr^a Valderês Aparecida de Sousa, pela paciência e apoio, pela oportunidade, confiança e por toda a ajuda nos momentos difíceis, por ser tão compreensiva quando mais precisei, pela amizade, pelos conselhos e por me incentivar sempre.

- Aos meus amigos, que sempre estiveram comigo, em especial ao Cristian, Nivaldo e a Andresa que sempre me apoiaram e me incentivaram nas escolhas, em especial a Andresa, que foi minha amiga e confidente durante toda a faculdade e sempre me ajudou e aconselhou quando precisei.

- A Embrapa Florestas, pela oportunidade de participar da empresa por alguns meses, o que possibilitou a conclusão desse trabalho.

- As empresas Klabin, Rigesa, Duratex e Suzano Papel e Celulose, pelo material vegetal doado ao meu trabalho, sem o qual não seria possível o andamento e conclusão do mesmo.

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Eucalyptus* são exóticas no Brasil e historicamente possuem potencial de uso, pois se adaptaram bem as condições edafoclimáticas brasileiras, atingindo produtividade igual ao seu local de origem, a Austrália, em período de tempo menor. Isso se deve aos avanços dos programas de melhoramento genético no Brasil, que vem usando intensivamente cruzamentos controlados (hibridação), gerando híbridos com maior produtividade e resistentes à pragas e doenças e, com uma ótima qualidade da madeira. (IPEF, 2010; SFB, 2010; FILHO & SANTOS, 2011).

O melhoramento genético e, especialmente, os cruzamentos controlados são técnicas eficientes de se conseguir materiais genéticos com as características desejadas, como maior incremento anual, resistência a pragas, dentre outras (PEREIRA, 2002; FONSECA *et al.*, 2010).

Embora a hibridação seja muito importante, a polinização controlada de diferentes espécies muitas vezes é dificultada pela diferença entre o período de produção de pólen e do óvulo. Sob condições naturais, a viabilidade do pólen é muito curta, se restringindo a apenas alguns dias. Portanto, para que sejam efetuados os cruzamentos desejados há necessidade da manutenção da viabilidade do pólen em condições artificiais, para possibilitar o cruzamento no período de receptividade do estigma da planta receptora. Mesmo que ocorra o florescimento dos pares no mesmo período, existe ainda a defasagem natural do florescimento individual (baixa floração) que pode comprometer o procedimento. Portanto o desenvolvimento de técnicas de manejo do pólen para mantê-lo viável, bem como testes de viabilidade do pólen, precisos e confiáveis, são essenciais para a hibridação ser bem-sucedida (SOUSA, 1988; ASSIS, 1996; SOUSA, 1990; EINHARDT *et al.*, 2006).

A polinização controlada permite reunir características superiores desejadas, como maior produção de madeira, maior resistência a pragas e a fenômenos naturais, bem como, menor teor de lignina para a produção de celulose. Gera-se assim indivíduos com características superiores provenientes de diferentes indivíduos selecionados (SOUSA, 1988; ASSIS, 1996; PEREIRA, 2002).

Para o sucesso no manuseio do pólen devem ser coletados os materiais desejados (flores antes da abertura do botão floral), nas épocas adequadas, com a máxima viabilidade do pólen, e armazenados nas condições favoráveis à manutenção

da viabilidade. O ideal é o armazenamento do pólen sob condições que propiciem a viabilidade a médio e longo prazo. E por fim testes confiáveis de avaliação da viabilidade devem estar disponíveis para assegurar o uso de material viável e o sucesso da hibridação (SOUSA, 1988; ASSIS, 1996).

A avaliação da viabilidade para o monitoramento do pólen armazenado e do sucesso dos cruzamentos controlados podem ser feitas utilizando-se corantes específicos ou germinação do pólen. A germinação pode ser *in vivo* ou *in vitro*. Na germinação *in vivo*, há a necessidade de um sistema na própria planta para a avaliação da viabilidade. Já na germinação *in vitro*, tenta-se reproduzir as condições naturais do estigma e estilete adicionando os componentes necessários à germinação em um meio de cultura. (SOUSA-LANG & PINTO JUNIOR, 1997; FONSECA *et al.*, 2010).

Os carboidratos são essenciais nos meios de cultura no processo germinativo do pólen. Diversos meios de cultura, visando a germinação do pólen já foram testados, desde uma simples água destilada, até meios mais variados, envolvendo diferentes compostos e diferentes concentrações. A água teve escassos relatos de ser um bom meio de cultura para a germinação do pólen (SOUSA-LANG & PINTO JUNIOR, 1996).

Técnicas utilizando corantes específicos constituem-se na maneira mais rápida e prática de avaliar a viabilidade do pólen. No entanto, algumas ressalvas devem ser consideradas, como a possibilidade de superestimar-se a viabilidade, podendo haver a coloração de pólenes imaturos e inviáveis, em função do modo de ação de cada corante (MUNHOZ *et al.*, 2008).

Cada um dos diversos corantes age de maneira diferente com as atividades vitais dos grãos de pólen. O 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) atua na atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na respiração de tecidos vivos, estando associada à sua capacidade de germinação. Esse reage com o hidrogênio produzido pela respiração celular dá ao pólen uma coloração vermelha. Já o azul de Lactofenol baseia-se na coloração do citoplasma denso de células vivas, tornando os mesmos azuis, não colorindo aqueles que não possuem citoplasma ou o contém em baixa quantidade (RADFORD *et al.*, 1974; DERIN & ETI, 1999; HOEKSTRA & BRUINSMA, 1975; MULUGETA *et al.*, 1994, DOMINGUES *et al.*, 1999, RIGAMOTO & TYAGI, 2002; BAÉZ *et al.*, 2002; PLINE *et al.*, 2002; MUNHOZ *et al.*, 2008).

Para tanto, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas para o armazenamento do pólen, em condições artificiais, mas que ainda possibilitem o seu

uso e médio e longo prazo, bem como é fundamental o aperfeiçoamento de testes de viabilidade do pólen, para garantir que o pólen esteja viável e seus resultados sejam práticos, rápidos e confiáveis, para que os mesmos possam ser utilizados nos programas de melhoramento e conservação genética.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer melhor técnica para indicar a viabilidade do pólen de *Eucalyptus brassiana* e *Eucalyptus urophylla*.

2.2 Objetivos específicos

- I. Definir o melhor meio de cultura para a germinação do pólen de *Eucalyptus brassiana* e *Eucalyptus urophylla*;
- II. Identificar o melhor corante, a melhor concentração e o período de tempo de ação de corantes específicos para estimar a viabilidade do pólen de *Eucalyptus brassiana* e *Eucalyptus urophylla*;
- III. Comparar o resultado do teste de germinação *in vitro* com os diferentes corantes testados.

3. JUSTIFICATIVA

No setor florestal brasileiro, as espécies exóticas, comumente plantadas, são as de crescimento rápido como as do gênero *Eucalyptus* e *Pinus*, melhor adaptadas as condições climáticas das regiões tropicais e subtropicais, onde encontram condições favoráveis para o seu crescimento, possuindo ampla utilização dos seus produtos e grande contribuição para o país.

O investimento em pesquisas no melhoramento florestal e na silvicultura do gênero *Eucalyptus*, tem consolidado o seu uso em plantios comerciais. O Brasil, hoje, detém as melhores tecnologias na silvicultura desse gênero.

No melhoramento florestal de *Eucalyptus* a hibridação desempenhou e continuará desempenhando papel importante na obtenção de material genético altamente produtivo e resistente à pragas e doenças. Um exemplo bem conhecido é o *E. urograndis*, resultado do cruzamento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* que tem sido amplamente utilizado em diversas regiões do Brasil pelas suas características de produtividade interessantes especialmente para indústria de papel e celulose.

A possibilidade de obtenção de outros híbridos promissores é muito grande para esse gênero. No entanto, a hibridação só é bem sucedida com o adequado manejo do pólen.

Cuidados especiais devem ser tomados com o pólen, desde a coleta, extração, armazenamento e, testes viabilidade do pólen que tenham resultados confiáveis. Portanto, protocolos de manuseio visando o armazenamento a médio e longos prazos e testes que mostrem a real viabilidade do pólen devem ser desenvolvidos para as diferentes espécies visando o máximo aproveitamento do potencial do pólen e a produção de uma maior quantidade de híbridos.

5. REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 Espécies do gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, possuindo mais de 600 espécies catalogadas com base em diferenças morfológicas, sendo quase todas de origem australiana. Dentre essas, várias são importantes para o Brasil, apenas quatro ocorrem naturalmente fora da Austrália, sendo elas o *E. urophylla* S. T. Blake, *E. tereticornis* Smith, *E. pellita* F. Muell e *E. brassiana* S. T. Blake (FONSECA *et al.*, 2010).

O gênero *Eucalyptus* foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês Charles Louis L'Héritier de Brutelle, em 1788. “O nome do seu gênero faz referência à capa ou opérculo que cobre os órgãos reprodutores da flor, até que cai e os deixa a descoberto. Este opérculo é formado por pétalas modificadas. O poder atrativo das flores das espécies deste gênero deve-se à exuberante coleção de estames que cada uma apresenta, e não às pétalas, como acontece com muitas plantas. Os frutos são lenhosos, de forma vagamente cônica, contendo válvulas que se abrem para libertar as sementes” (CIFLORESTAS, 2015).

As principais espécies empregadas no Brasil, de acordo com Fonseca *et al.* (2010), são: do gênero *Corymbia*, segundo recente classificação: *C. citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. Johnson, *C. maculata* (Hook) K. D. Hill & L. A. Johnson, *C. torelliana* (F. Muell.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson; e as do gênero *Eucalyptus*: *E. benthamii* Maiden & Cabbage, *E. brassiana* S. T. Blake, *E. camaldulensis* Dehnh, *E. cloeziana* F. Muel, *E. dunnii* Maiden, *E. globulus* Labill, *E. grandis* W. Hill ex Maiden, *E. nitens* (Deane & Maiden) Maiden, *E. pellita* F. Muell, *E. pilularis* Smith, *E. pyrocarpa* L. Johnson & Blaxell, *E. saligna* Smith, *E. smithii* R. T. Baker, *E. tereticornis* Smith, *E. urophylla* S. T. Blake e *E. viminalis* Labill.

Segundo Fonseca *et al.* (2010) a reprodução do eucalipto é predominantemente por alogamia, ou seja, fecundação de uma flor de determinada planta pelo pólen de outra. As taxas de autofecundação ocorrem geralmente em torno de 10 %, podendo chegar a 35 %. As flores são hermafroditas e protândricas, isto é, possuem os dois sexos na mesma flor, no entanto o sexo masculino amadurece primeiro. A polinização é feita geralmente por insetos.

O *E. brassiana* S. T. Blake ocorre naturalmente em formações florestais fechadas ou abertas. A distribuição latitudinal vai de 13,5° E (lado ocidental) até próximo a 16,5° E (lado oriental) na Austrália. Encontra-se desde o nível do mar até cerca de 650 m de altitude. Tem porte pequeno, com altura variando de 7 a 15 m, e diâmetro de 0,3 a 0,5 m. A árvore pode apresentar ramificação a partir da parte baixa do tronco com múltiplos caules ascendentes. A casca é persistente até 2 m ou mais, espessa, tendendo para dura com fissuras longitudinais irregulares de cor cinza escura. Na parte superior a casca é lisa de cor clara, geralmente tomando uma coloração amarelada. O cerne de sua madeira é leve, de cor róseo amarronzado com anéis de crescimento estacional. Outras propriedades são desconhecidas. Cresce geralmente em encostas com solos pobres de estrutura rochosa, bem drenados e em regiões com topografia levemente ondulada. É encontrado também em várzeas inundáveis e em depressões (TURNBULL & BROOKER, 1978; MOURA *et al.*, 1995; MOURA, 2003; FONSECA *et al.*, 2010).

O *E. urophylla* S. T. Blake possui duas variedades diferentes, sendo uma de casca fibrosa e folhas lanceoladas, procedente de regiões com altitudes superiores a 1.000 m e outra de casca lisa em diferentes proporções do fuste e folhas com forma e tamanho variáveis. É mais resistente a seca, sua madeira também é utilizada para construção civil, mourões de cerca, estruturas que demandam alta resistência e, para celulose e carvão. Essa espécie é tolerante a ferrugem (MARTIN & COSSALTER, 1975; VIEIRA & BUCSAN, 1980, JUNIOR & GARCIA, 2003; FONSECA *et al.*, 2010).

5.2 Importância socioeconômica e ambiental

Devido a exploração indiscriminada das florestas nativas brasileiras com a consequente redução de área nos diferentes ecossistemas, a maior parte das espécies encontra-se ameaçada de extinção e proibida de exploração. Nesse sentido, o plantio de espécies exóticas que venham atender a demanda do mercado e reduzir a pressão sobre os remanescentes nativos é uma das soluções mais viáveis (SFB, 2015).

O gênero *Eucalyptus* foi introduzido no século passado, com uma história de sucesso no Brasil, que hoje é um dos maiores exportadores de fibras curtas do mundo. Além disso, o mesmo tem sido amplamente empregado para dormentes, postes, construção, laminados, compensados, entre outros. Com a silvicultura intensiva esse

gênero encontrou no Brasil condições de produtividade elevada em relação a região de origem, sendo muito atrativa tanto para grandes quanto pequenos produtores (SFB, 2015).

As florestas plantadas têm enorme importância para a sociedade por contribuir nos aspectos econômicos, sociais e ambientais, na geração de bens e serviços. No meio ambiente, além de gerar madeira como matéria-prima, ainda colaboram reduzindo a pressão sobre as florestas nativas, prestando importantes serviços ambientais para a sociedade, bem como protegendo áreas degradadas, ajudando no combate a mudanças climáticas, protegendo bacias hidrográficas e a biodiversidade (IPEF, 2010).

Em 2014, no Brasil a área de espécies florestais plantadas para fins industriais totalizou 7,74 milhões de hectares, com aumento de 1,8 % em relação a 2013. Deste total os plantios de espécies do gênero *Eucalyptus* correspondiam a 5,56 milhões de hectares da área plantada no país, representando 71,9 % do total, encontrando-se principalmente nos Estados de Minas Gerais (25,2 %), São Paulo (17,6 %) e Mato Grosso do Sul (14,5 %) (IBÁ, 2015).

O setor brasileiro de florestas plantadas vem aumentando sua produtividade (SFB, 2010). Os fatores ambientais favoráveis no Brasil beneficiam a silvicultura. Entretanto novas tecnologias são indispensáveis para incrementar a produtividade, tais como a utilização de sementes de boa qualidade, o melhoramento genético das espécies, a realização de cruzamentos controlados visando a obtenção de híbridos e a clonagem de espécies florestais por meio de diversas técnicas de propagação vegetativa. Esses fatores fazem com que o Brasil se destaque tanto no plantio de coníferas como folhosas.

5.3 Híbridação nos programas de melhoramento

A híbridação é um método importante quando se visa florestas com alta produtividade. Isso foi conseguido, no Brasil em diversos cruzamentos que aproveitavam a viabilidade comercial da heterose e posterior propagação clonal. A heterose positiva, significa que devem ser indivíduos dominantes, tendo média para superar a média dos seus genitores, além de possuir a garantia de que irão conter as características de interesse do melhor genitor utilizado (ASSIS *et al.*, 1993; FONSECA *et al.*, 2010).

Dentro dos programas de melhoramento genético do gênero *Eucalyptus*, a utilização de híbridos inter e intraespecíficos vem tendo importante incremento. Outro fator importante é a manifestação da heterose verificada em vários cruzamentos, fazendo com que através da hibridação, o ganho genético seja alcançado de forma mais rápida (ASSIS, 1996).

O eucalipto destinado à produção de papel e celulose é o setor que mais demanda madeira e vêm recebendo maiores investimentos das empresas para melhoramento genético, aplicando-se tecnologias para obtenção das características desejadas, incrementando os ganhos genéticos da espécie. O objetivo desse setor é a obtenção de indivíduos com madeira de menor teor de lignina não reativas no processo de polpação. Atualmente, o material genético que mais vem sendo estudado e usado é o híbrido de *Urograndis*, com a restrição de possuir grande quantidade de lignina. Desta forma, outros híbridos vêm sendo testados com estas e outras características de interesse industrial (PEREIRA, 2002; FILHO & SANTOS, 2011).

No entanto, deve-se atentar também aos novos desafios florestais que são o surgimento de novas pragas, insetos introduzidos que vêm causando preocupação, por ter rápida adaptação a novos materiais genéticos nas florestas de eucalipto (PEREIRA, 2002; ASSIS, 2014).

Os cruzamentos controlados com *Eucalyptus* spp. utilizando pólen armazenado são a melhor forma de se obter indivíduos superiores por meio do uso de genitores com assincronia de floração. Esse procedimento permite combinar características superiores de dois indivíduos de forma dirigida e bem assertiva. Contudo, os procedimentos realizados no manuseio do pólen a ser utilizado nos cruzamentos devem ser cautelosos, desde a coleta, transporte, extração até o armazenamento, essas etapas são fundamentais para a manutenção da viabilidade do pólen, fator determinante para o sucesso dos cruzamentos controlados (SOUSA, 1988; ASSIS, 1996).

5.4 Fatores que afetam a viabilidade do pólen

5.4.1 Manejo do pólen

O pólen apresenta viabilidade máxima quando coletado em adequado estágio de desenvolvimento, ou seja, na antese. Entretanto, na maioria das vezes não é possível realizar os cruzamentos imediatamente após a abertura floral. Muitas vezes a floração de algumas espécies não ocorre no mesmo período, sendo necessário o armazenamento do pólen até o próximo ano, ou os pólenes utilizados para os processos são advindos de outras regiões ou até mesmo de outros países, sendo assim imprescindível o armazenamento do pólen. Desta forma, se fazem necessários testes de viabilidade para a utilização deste pólen (EINHARDT *et al.*, 2006).

Em sua pesquisa Fonseca *et al.* (2010), afirmam que o pólen de *Eucalyptus* pode ser coletado diretamente, quando as flores apresentam-se em antese ou indiretamente, onde os ramos contendo com botões florais próximo a antese são cortados e suas bases imersas em recipientes com água, até que as flores atinjam a fase de antese. Caso as flores já estejam abertas, estas devem ser descartadas pois já podem estar contaminadas por outros pólenes não desejados. O controle do ambiente onde os ramos contendo as flores permanecerão, é importante e deve incluir o controle de umidade (alta) e temperatura (de 25 °C a 30 °C) para acelerar a antese. Após a fase desejada ter sido alcançada, as flores deverão ser secas, e em seguida armazenadas a baixas temperaturas. Após a secagem os grãos de pólen, podem ser armazenados em frascos criogênicos com temperaturas de -16 a -18 °C.

Para que seja possível o cruzamento de espécies em períodos diferentes de floração, é necessário que o pólen que será utilizado seja armazenado de maneira correta. E para que esse armazenamento tenha sucesso, a umidade e a temperatura devem ser controlados. Estes, tem relação direta com o metabolismo do pólen e a redução de tais atividades metabólicas tendem a aumentar a longevidade deste pólen armazenado (SOUSA, 1990).

Para que o armazenamento em médios e longos prazos seja bem-sucedido é necessário que o pólen seja coletado, secado, transportado e armazenado de forma correta, bem como, devem serem feitos testes de viabilidade antes de sua utilização. Frente a isso, protocolos devem ser desenvolvidos, tendo em vista que cada espécie tem comportamento diferente em cada uma dessas etapas, e isso pode vir a comprometer a viabilidade do pólen (ASSIS *et al.*, 1993; SOUSA-LANG & PINTO JUNIOR, 1997; SOUSA, 2010).

Diversos aspectos contribuem para o sucesso dos programas de melhoramento genético quando se pretende empregar a técnica de hibridação controlada, desde a

época ideal de coleta do pólen, o armazenamento correto deste e a verificação de sua viabilidade, antes de se efetuar as polinizações controladas. Embora o eucalipto seja amplamente empregado nos plantios florestais, ainda carece de estudos nestas áreas, para as diversas espécies do gênero.

5.4.2 Testes para avaliar a viabilidade do pólen

5.4.2.1 Germinação do pólen *in vitro* e *in vivo*

A germinação do pólen pode ser de duas formas *in vivo* ou *in vitro*. No entanto, na primeira há a necessidade de um sistema na própria planta para a avaliação da viabilidade. Já no segundo, tenta-se reproduzir as condições naturais do estigma e estilete adicionando-se os componentes necessários à germinação em um meio de cultura onde o pólen permanece por determinado período de tempo para o crescimento do tubo polínico (SOUSA-LANG & PINTO JUNIOR, 1997; FONSECA *et al.*, 2010).

Desta forma, a germinação *in vitro* consiste na germinação de uma pequena amostra de pólen em meio de cultura apropriado para a espécie. O pólen fica germinando por período que dependerá das exigências de cada espécie e, posteriormente, pode ser observado no microscópio, o número de grãos que produziram tubo polínico. Desta forma o meio de cultura afeta diretamente o processo de germinação (DUTRA *et al.*, 2000; FRANÇA *et al.*, 2006; SALLES *et al.*, 2006).

É o teste mais simples e seguro, e pode ser feito em meio semi sólido ou líquido, ambos devem conter fonte de açúcar (comumente a sacarose) e o agente solidificante (normalmente o ágar). A porcentagem de germinação do grão de pólen é acessada com a contagem dos tubos polínicos que se desenvolveram, em relação aos números de grãos de pólen totais (FONSECA *et al.*, 2010).

Para que haja máxima germinação desejada, existe a necessidade de se determinar, a qualidade e também a quantidade de componentes necessários no meio de cultura. Mas esse meio normalmente terá carboidratos e elementos estimulantes, como Ácido Bórico, Ácido Cítrico, Nitrato de Cálcio e reguladores de crescimento, dentre outros (SOUSA, 1988).

Uma das principais substâncias do meio de cultura que permite a emissão do tubo polínico é qual o tipo de açúcar e sua concentração, o mais utilizado é a sacarose.

Fornecendo assim o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de cultura contendo a solução de germinação, bem como fornece energia para o desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY & LINSKENS, 1974; FRANÇA *et al.*, 2006; SALLES *et al.*, 2006).

De acordo com Stanley & Linskens (1974), além de solidificar o meio de cultura o ágar ou gelatina também atua na incorporação do açúcar e sobre as condições aeróbicas adequadas para o processo germinativo.

As substâncias mais utilizadas do meio de cultura são os carboidratos, os micronutrientes e os hormônios. Dorman (1976), considerou os carboidratos simplesmente para o crescimento do tubo polínico, como fonte de energia. Contudo, Bhojwani & Bhatnagar (1974), o consideram como o principal fator de controle da pressão osmótica.

Em seus estudos Stanley & Linskens (1974) afirmaram que os açúcares podem dar repostas diferenciadas, tendo o emprego de carboidratos como a lactose, permite ao pólen metabolizar mais rapidamente, facilitando o crescimento do tubo polínico. Dessa forma, é essencial estudar os diferentes açúcares, para se testar qual é o melhor para cada espécie.

Apesar de a sacarose ser o açúcar mais indicado para germinação de pólen para muitas espécies, Marchant *et al.*, (1993) instigam o estudo de outros tipos de açúcares, como a lactose animal, a frutose, entre outros (FAULL, 1955; STANLEY & LINSKENS, 1974). E após o surgimento da solução de Brewbaker & Kwack (1963), a qual poderia induzir a um resultado diferente dos açúcares, se houvesse interação entre açúcares e nutrientes, torna-se muito importante testar se há ou não essa interação.

Segundo Sousa-Lang & Pinto Junior (1997), a manutenção da viabilidade do pólen é primordial para os programas de melhoramento genético, estando sujeita aos fatores intrínsecos a espécie ou às condições de armazenamento. E para se obter resultados confiáveis da viabilidade do armazenamento do pólen, deve ser determinado o meio de cultura que possibilite o desenvolvimento do mesmo, para isso tem de haver a formação do tubo polínico, e este deve ter o comprimento maior que o seu diâmetro.

5.4.2.2 Corantes específicos

Outro método utilizado para avaliar a viabilidade do pólen é por meio de indicadores de coloração, usando corantes específicos. Esse método é mais rápido e simples que o da germinação *in vitro*. Porém, alguns autores relatam que não é adequado pois alguns corantes podem superestimar a viabilidade polínica. O que indica realizar estudos comparando-se os dois métodos para identificar quais os corantes estimam com maior fidelidade a viabilidade do pólen (MUNHOZ, *et al.* 2008), de forma que haja correlação entre os métodos.

Para Alvim (2008), tanto quanto a importância da germinação, a coloração dos pólenes viáveis é indispensável. Utilizando-se de corantes esse processo se torna rápido, simples e barato, mas o corante utilizado não deve mascarar o valor real da germinação. Existem vários corantes, com ação diferente nas diversas espécies aplicadas, dentre ele, tem-se destaque para: carmim acético, azul de Lactofenol, azul de algodão, iodeto de potássio, Cloreto de 2,3,5 de trifeniltetrazólio (TTC), tetrazólio nitro-azul (STANLEY & LINSKENS, 1974) e verde malaquita com fucsina ácida (ALEXANDER, 1980).

Cada corante terá ação diferenciada na atividade do grão de pólen. O 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazóil (TTC) age na atividade das enzimas desidrogenases, as quais, catalisam, as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o Ciclo de Krebs, atuado na respiração dos tecidos vivos, ao ser inserido, pela respiração do tecido, na cadeia transportadora de elétrons mitocondriais. Essa atividade enzimática tem relação com a sua capacidade de germinação. Quando com o hidrogênio, no momento da respiração celular, este corante, dá ao grão de pólen uma coloração avermelhada, podendo assim, verificar-se sua viabilidade. Quando o pólen é imerso na solução de TTC, a solução se espalha pelos tecidos, mas nas células vivas ocorre uma reação de redução, resultando na formação de um composto vermelho, conhecido como formazan, que exercerá a função do último acceptor de elétrons, substituindo o oxigênio, dentro da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial. (DERIN & ETI, 1999; FRANÇA NETO *et al.*, 1998; HOEKSTRA & BRUINSMA, 1975; MOORE, 1973; VERLEYSSEN *et al.*, 2004; AMUTHA *et al.*, 2007).

Quando o formazan é formado, há indicativo da atividade respiratória e por conseguinte da viabilidade celular. Nesse sentido, tecidos não viáveis, ou seja, que

não respiram, não reagem e, portanto, não são coloridos. Enquanto as células que respiram apresentam coloração avermelhada (FRANÇA NETO *et al.*, 1998).

Assim como o TTC, o azul de lactofenol também é bastante utilizado para avaliar a viabilidade do pólen, porém este tem ação diferenciada do TTC, agindo no citoplasma denso das células vivas, não colorindo aqueles que não possuem citoplasma ou o contém em baixa quantidade (RADFORD *et al.*, 1974; MULUGETA *et al.* 1994; DOMINGUES *et al.* 1999; RIGAMOTO & TYAGI, 2002; BAÉZ *et al.* 2002; PLINE *et al.* 2002).

6. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Pólen, de Biologia Molecular e de Cultura de Tecidos da Embrapa Florestas, no município de Colombo – Paraná.

6.1 Material vegetal

Neste estudo, foram utilizados os pólenes de duas espécies do gênero *Eucalyptus*, *E. brassiana* S.T. Blake, *E. urophylla* S.T. Blake, que foram fornecidos pela empresa Suzano Papel e Celulose parceira da Embrapa Florestas.

Os materiais chegaram em eppendorfs, os quais continham pólenes que já haviam sido manuseados, ou seja, passaram pelos processos de extração, secagem e armazenamento, pois já estavam armazenados a mais de um ano.

6.4 Testes de germinação *in vitro*

O teste de germinação *in vitro* foi feito utilizando-se a solução sugerida por Brewbaker & Kwack (1963), com 100 mg.L⁻¹ de H₃BO₃, 300 mg.L⁻¹ de Ca (NO₃)₂. 4H₂O, 200 mg.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 100 mg.L⁻¹ de KNO₃. Todos os meios utilizados continham a concentração de 8 g.L⁻¹ de ágar e de 300 g.L⁻¹ de açúcar, variando para diferentes tipos de açúcares.

Foram empregados cinco meios de cultura, considerando-se as variações no tipo açúcar:

- 1) Meio Brewbaker & Kwack com 300 g.L⁻¹ de sacarose (testemunha);
- 2) Meio Brewbaker & Kwack com 300 g.L⁻¹ de frutose;
- 3) Meio Brewbaker & Kwack com 300 g.L⁻¹ de lactose;
- 4) Meio Brewbaker & Kwack com 300 g.L⁻¹ de galactose;
- 5) Meio Brewbaker & Kwack com 300 g.L⁻¹ de glicose.

Primeiramente, preparou-se as soluções estoques para serem utilizadas nos meios de cultura, sendo armazenadas em frascos âmbar e estes cobertos com papel alumínio, para evitar a luminosidade, e estas foram armazenadas em geladeira.

No dia anterior a montagem do teste de germinação preparou-se todo o material a ser utilizado (vidrarias, papéis de filtro, pipetas, suportes para as lâminas, pincéis,

lâminas, placas de petri) lavou-se com água destilada, secou-se em estufa a 30 °C e esterilizou-se em autoclave a 120 °C por 20 minutos, após esse material retornou a estufa a 30 °C.

Para o preparo de meio, pesou-se todos os materiais que seriam utilizados para o preparo do meio, ou seja, 0,8 g de ágar para 100 ml de meio (0,8 %) e 30 g de cada açúcar para 100 ml de meio (30 %), para os cinco meios testados (figura 1). A partir da solução estoque foi preparada a solução de Brewbaker & Kwack.



Figura 1 - Pesagem dos materiais utilizados, 0,8 g de ágar e 30 g de cada açúcar, para cada um dos cinco meios testados. Fonte: A autora, 2016.

O pólen utilizado foi colocado para hidratação na BOD a fim de que o seu metabolismo fosse ativado e assim pudesse germinar melhor e expressar o seu potencial máximo de viabilidade, permanecendo na BOD por 24h a 25 °C com umidade de 99%. Para o processo de hidratação, o pólen foi colocado em placa de petri acondicionada em gerbóx com papel filtro umedecido com água destilada, para propiciar ambiente saturado.

Os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Após o processo de esterilização, o meio foi retirado e colocado em um Becker em banho maria, para que não ocorresse a solidificação, permitindo a aplicação desse meio sobre as lâminas. Verteu-se 4 mL do meio sobre cada lâmina do teste, e assim que o

mesmo solidificou-se e resfriou-se, o pólen de cada espécie foi espalhado o mais homogêneo possível, com o auxílio de um pincel (figura 2).

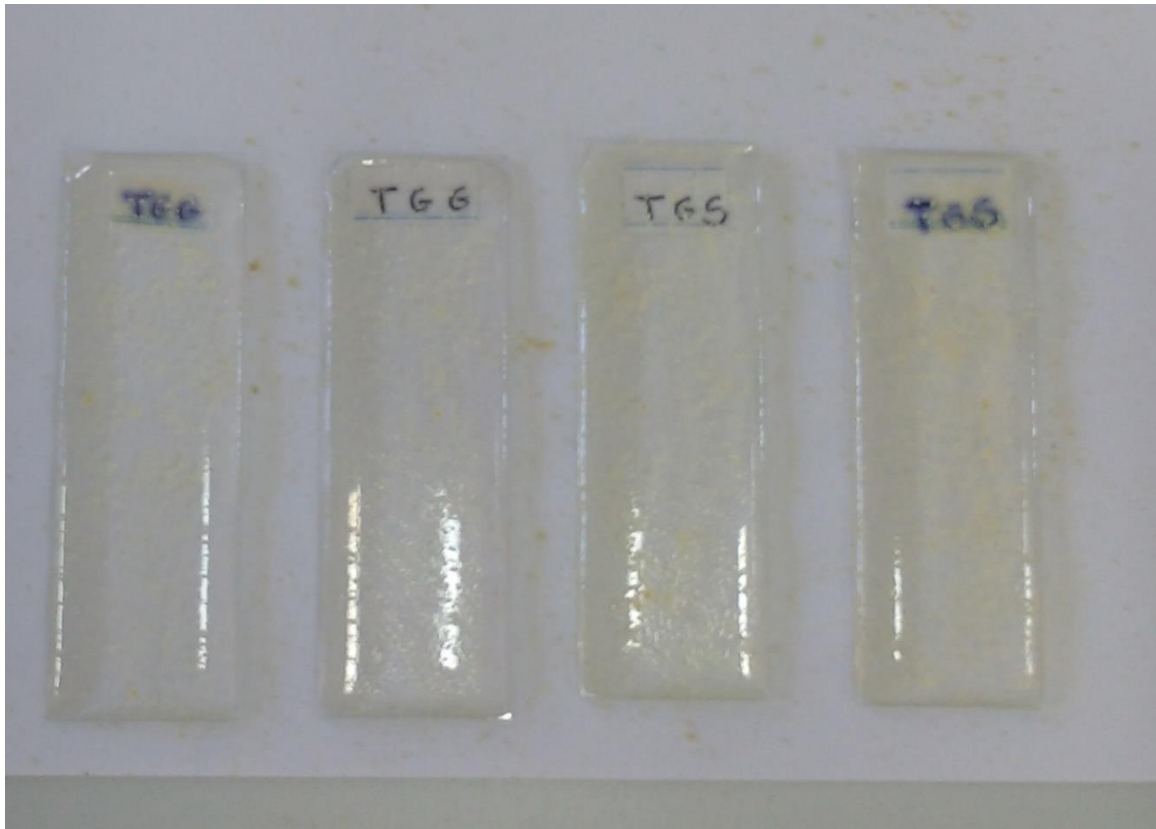


Figura 2 - Lâminas com o meio solidificado e com o pólen de *E. brassiana* e *E. urophylla* aplicado sobre as mesmas. Fonte: A autora, 2016.

O ensaio de germinação foi estabelecido em blocos ao acaso com 4 repetições.

Os blocos foram representados por uma cuba de vidro contendo os tratamentos, com papel filtro umedecido e um suporte de vidro para que a lâmina não entrasse diretamente em contato com a água. Essa iniciativa foi tomada para que a umidade relativa dentro do bloco permanecesse elevada. Os blocos e lâminas foram devidamente identificados, representado cada tratamento. Em seguida, as cubas (blocos) foram levadas para a BOD, para a germinação. Na BOD, o teste permaneceu por 24 h para germinação, conforme Cook & Stanley (1960) determinaram como sendo o período de tempo como o ideal, para o processo germinativo, com umidade relativa de 99 % e temperatura de 25 °C (figura 3).



Figura 3 - Cubas de vidro representando os blocos, dentro da BOD, com umidade e temperatura controladas. Fonte: A autora, 2016.

Após 24 h, o pólen foi retirado da BOD e sobre as lâminas foram pingadas, gotas de safranina 1 %, para inibir a germinação que ainda pudesse existir e também colorir o meio, ajudando a visualização e contagem dos grãos no microscópio (figura 4).



Figura 4 - Lâminas contendo os tratamentos, onde foram aplicadas gotas de safranina 1%. Fonte: A autora, 2016.

A seguir as lâminas foram armazenadas em freezer (- 20 °C) para a contagem posterior dos grãos de pólen uma vez que se o experimento permanecesse na geladeira os microrganismos que viessem a se desenvolver poderiam comprometer a contagem.

Foram avaliados 300 grãos de pólen totais de cada lâmina, germinados e não germinados por repetição, seguindo critério de Goddard e Matthews (1981). Sendo considerados como germinados os grãos de pólen em que o seu tubo polínico atingiu comprimento do seu maior diâmetro, conforme a metodologia sugerida por Cook e Stanley (1960), citados por Sprague (1977).

Para a contagem dos grãos de pólen utilizou-se um microscópio óptico com 400X de aumento (10 da ocular e 40 da objetiva).

Os dados de germinação (%) obtidos para cada repetição foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio da aplicação do teste de Tukey ao nível de 1 % de probabilidade. Os dados apresentaram natureza binomial e para estes dados foi feita transformação em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$.

6.5 Corantes específicos

Para a observação dos pólen viáveis pelo método da coloração foram utilizados diferentes corantes e concentrações de 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (0,5 %, 1,0 % e 1,5 %) e de azul de Lactofenol Maneval (1936).

O pólen foi distribuído sobre as lâminas sobre as quais foram aplicadas três gotas do corante a ser testado, cobrindo-se com lamínula. Aguardou-se os períodos testados e então foram avaliados 300 pólen totais por repetição em microscópio óptico com aumento de 400 X. Quatro lâminas foram avaliadas por tratamento. Esse procedimento foi feito para ambos os corantes.

Para o corante azul de Lactofenol 1 % foram testados os períodos de tempo para que se pudesse estipular qual deles seria o ideal. Os períodos testados foram 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos, seguindo a metodologia de Vianna *et al.* (2006), porém com o acréscimo de novos períodos.

Para o corante TTC foram testados diferentes períodos de tempo e concentrações do corante para que se pudesse determinar qual deles seria o ideal. Os períodos testados foram de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, conforme

metodologia de Vianna *et al.* (2006), com o acréscimo de novos períodos para se ter melhores resultados. As concentrações testadas foram de 0,5 %, 1,0 % e 1,5 %.

Os dados de viabilidade (%) obtidos também foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 1 % de probabilidade. Como os dados apresentam natureza binomial, foi feita transformação em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Testes de germinação *in vitro*

Os dados de germinação (%) obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 1 % de probabilidade. Como os dados apresentam natureza binomial, ou seja, apresentam duas classes, germinados e não germinados, e eles precisam estar dentro de uma distribuição normal, foi feita transformação em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$.

De acordo com a análise de variância (tabela 1) verificou-se efeito significativo ao nível de 1 % de probabilidade entre os tratamentos, com relação as diferentes espécies e açúcares o que mostra que houveram tratamentos que se saíram melhores que outros. A tabela 1 mostra ainda que não houve diferença significativa para os blocos, demonstrando que os blocos não tiveram interferência da luz entre si, e nem efeitos de borda.

Tabela 1 – Análise de variância para os dados de germinação, para todos os tratamentos.

Causas da Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Tratamentos	5	3640.86667	1297.8375 **
Blocos	3	1.64000	0.5846 NS
Resíduo	15	2.80533	
Total	23		

** Significativo ao nível de 1 % de probabilidade.

Fonte: A autora, 2016.

Pode-se verificar que o meio padrão (testemunha) com o açúcar sacarose (30 %) e Brewbaker & Kwack, destacou-se dentre os demais tratamentos, para *E. urophylla*, proporcionando a maior porcentagem de germinação, 79,17 %, respectivamente (tabela 2), foram considerados como germinados os pólenes que apresentaram o tubo polínico atingiu comprimento maior que seu diâmetro, conforme a metodologia sugerida por Cook e Stanley (1960), citados por Sprague (1977) (figura 5). Para os tratamentos com glicose e galactose, para ambas as espécies, houve um decréscimo na germinação, diferindo estatisticamente das anteriores. Para a espécie *E. brassiana* os açúcares glicose e galactose não apresentaram diferença estatística significativa, apresentando os menores resultados de germinação. Tendo em vista que

o pólen de *E. brassiana* já apresentava uma germinação inferior ao de *E. urophylla*, de acordo com o resultado da testemunha, essa redução apresentada foi potencializada no caso dos outros açúcares.

Tabela 2 - Média da porcentagem de germinação para os diferentes tratamentos, letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a $P < 0,01$.

TRATAMENTOS	MÉDIA %
<i>E. urophylla</i> - sacarose (testemunha)	79,17 a
<i>E. brassiana</i> - sacarose (testemunha)	63,50 b
<i>E. urophylla</i> – glicose	43,83 c
<i>E. urophylla</i> – galactose	32,67 d
<i>E. brassiana</i> – glicose	6,50 e
<i>E. brassiana</i> – galactose	4,83 e

Fonte: A autora, 2016.

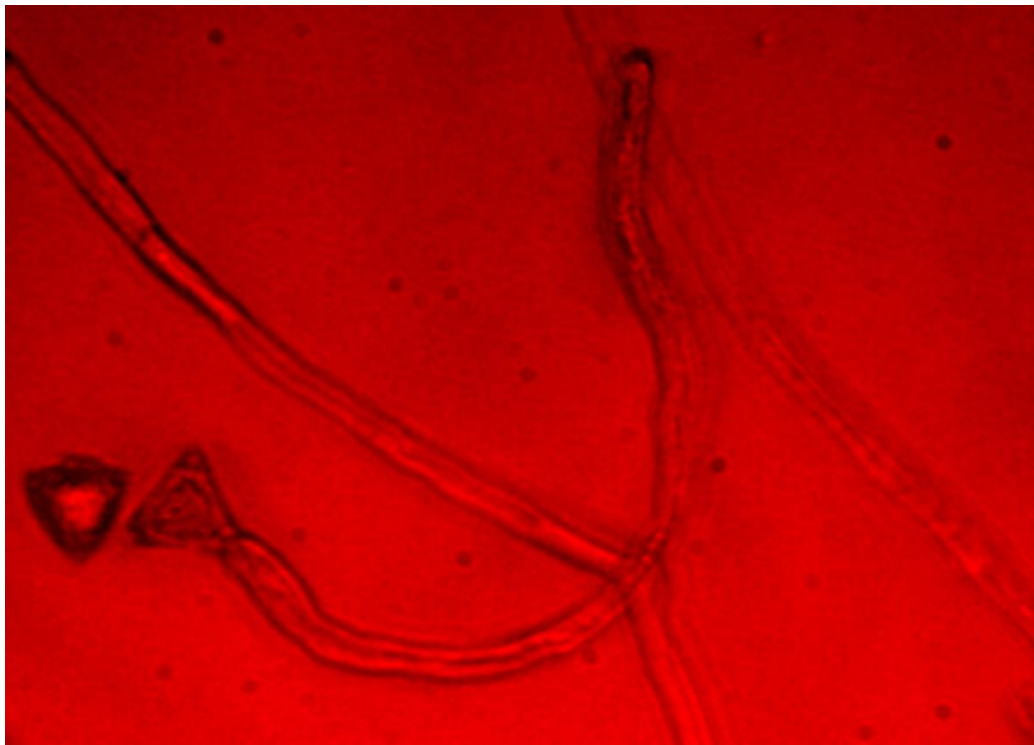


Figura 5 - Pólen de *E. urophylla* germinado, representado por seu tubo polínico maior que seu maior diâmetro. Fonte: A autora, 2016.

Gonçalves *et al.* (1982) utilizaram várias concentrações de sacarose, glicose, galactose, lactose e manitol, com e sem ácido bórico, para germinar pólen de *Hevea camargoana*, encontrando também em seu meio, sem a adição de ácido bórico, uma

maior germinação para a sacarose, uma segunda maior germinação para glicose e uma germinação inferior para o açúcar galactose.

Paiva *et al.* (1983) avaliaram a viabilidade do pólen de cinco clones de seringueira, usando diferentes concentrações de sacarose, galactose, glicose e lactose, concluindo que o melhor meio para quatro clones foi o que continha sacarose e o segundo melhor meio o que continha glicose.

Gabrielli *et al.* (1965, apud Borges *et al.* 1973) concluíram em seus estudos que a melhor germinação polínica de eucalipto foi alcançada utilizando-se de uma solução contendo 1,5 % de gelatina e dependendo da espécie, 30 a 40 % de sacarose.

Trabalhando também com testes de germinação *in vitro* para avaliar a viabilidade do pólen de algumas espécies do gênero *Eucalyptus*, Borges *et al.* (1973) utilizaram várias concentrações de sacarose (entre 20 % e 40 %). Os autores afirmaram que todos os testes de germinação conhecidos para *Eucalyptus* envolvem o uso da sacarose. Recomendaram ainda determinada dose do açúcar para avaliar o pólen fresco e armazenado por diferentes períodos.

Bhojwani & Bhatnagar (1974), afirmam que dos açúcares testados para o processo de germinação e desenvolvimento do tubo polínico, a sacarose, açúcar este presente na maioria dos pólenes, é o mais efetivo.

De acordo com Souza (2002), valores de viabilidade polínica acima de 70 % são considerados como alta viabilidade do pólen, de 31 a 69 % como média e até 30 %, baixa. Com base nessa afirmação, e de acordo com os resultados obtidos, as duas espécies avaliadas apresentaram viabilidade alta e média, para *E. urophylla* e *E. brassiana*, respectivamente, utilizando a sacarose como açúcar.

A avaliação do tratamento com o açúcar lactose, para as duas espécies de eucalipto, foi impossibilitada pelo desenvolvimento de fungos sobre o meio. Pode-se visualizar as lâminas na figura 6.

Em seu estudo com várias concentrações e diferentes açúcares, com e sem ácido bórico, para germinar pólen de *Hevea camargoana*, Gonçalves *et al.* (1982) encontraram em suas lâminas com e sem ácido bórico, uma germinação média de 9,52 % para o açúcar lactose, a uma concentração de 15 %. Antonio (2004) testou a viabilidade do pólen de *Theobroma grandiflorum*, usando também diferentes açúcares em diferentes concentrações, e concluiu que o melhor meio para a espécie em estudo foi a com o açúcar lactose com uma concentração de 5 %.

Como a lactose, segundo Stanley & Linskens (1974) é um açúcar que permite uma metabolização mais rápida, tem-se a possibilidade de além de o pólen metabolizar mais rapidamente, pode também a atividade fúngica aumentar o seu metabolismo.

Outra causa possível, podem ser as próprias espécies de eucalipto, que podem ser pré dispostas a contaminação por fungos, quando adicionado esse açúcar. Mas estudos devem ser realizados com diferentes concentrações de lactose, para se possa encontrar qual é a melhor, ou se o mesmo é inviável para testes de germinação *in vitro*.



Figura 6 - Lâminas com açúcar lactose, representadas pela seta, e com atividade fúngica sobre as mesmas. Fonte: A autora, 2016.

Outro problema apresentado foi com relação ao açúcar frutose, meio este que não solidificou (figura 7), mesmo na presença de ágar 0,8 %. Pelo resultado obtido sugere-se que deve-se reduzir a quantidade desse açúcar ou aumentar a quantidade de ágar. Trabalhos futuros devem considerar esses fatores.

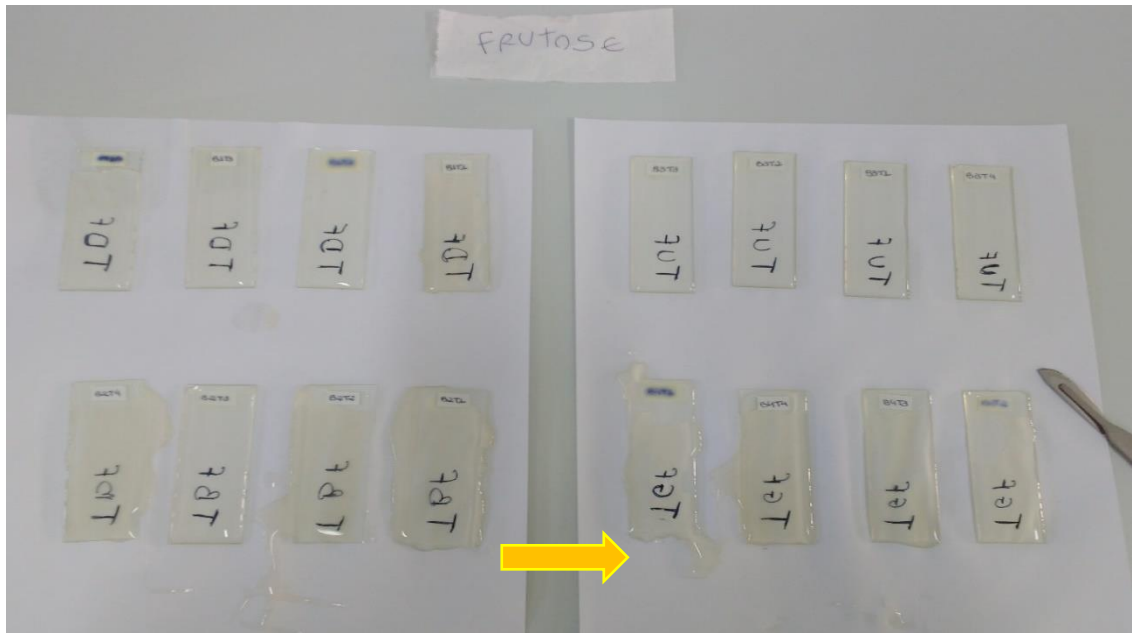


Figura 7 - Lâminas com açúcar frutose, que não solidificou e extravasou fora da lamina, como mostra a seta. Fonte: A autora, 2016.

7.2. Corantes específicos

De acordo com a análise da tabela 3 o melhor período para a coloração com 2,3,5 - Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) é 60 minutos e uma concentração de 1,5 %, para ambas as espécies. Com os períodos de 15 e 30 minutos em todas as concentrações, nenhum grão de pólen coloriu, mostrando a ineficácia para o pólen das espécies estudadas, ou que essa concentração necessite de mais tempo para que possa colorir os grãos de pólen. No período de 45 minutos a porcentagem de coloração foi por volta de 20 %, se mostrando pouco eficiente. Já nos períodos de 90 e 120 minutos, a porcentagem foi praticamente a mesma que aos 60 minutos, isso mostra que, já que a porcentagem se mantém a mesma para os três períodos, opta-se pelo período menor, que já obtém o resultado ideal (figura 8).

Tabela 3 – Coloração pelo corante TTC, para os diferentes tempos, espécies e concentrações.

Período (min)		15	30	45	60	90	120
		Espécie/Concen. (%)					
<i>E. urophylla</i>	0,5	0	0	6	17	18	18
	1,0	0	0	17	40	43	41
	1,5	0	0	26	76	76	77
<i>E. brassiana</i>	0,5	0	0	5	14	13	13
	1,0	0	0	15	37	39	37
	1,5	0	0	22	61	60	63

Fonte: A autora, 2016.

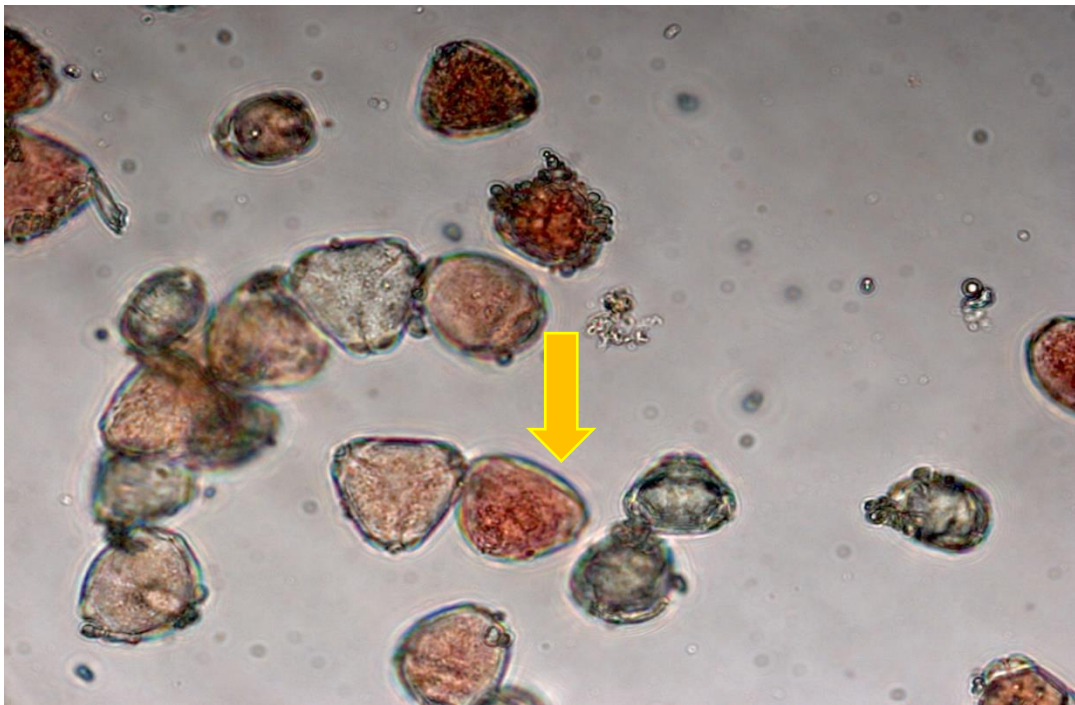


Figura 8 - Pólenes viáveis são avermelhados (seta amarela), e pólenes incolor são inviáveis. Fonte: A autora, 2016.

Já para o corante azul, a melhor porcentagem de coloração é aos 10 minutos (tabela 4), quando o corante atinge 97 % e 88 %, para o *E. urophylla* e *E. brassiana*, respectivamente (figura 9). Após esse período, os grãos de pólen começam a perder a coloração, até ficarem totalmente sem coloração após algum tempo (figura 10).

Tabela 4 – Coloração pelo corante azul de Lactofenol, para os diferentes períodos e espécies.

Espécie \ Período (min)	Período (min)					
	5	10	15	30	45	60
<i>E. urophylla</i>	18	97	56	10	0	0
<i>E. brassiana</i>	12	88	33	4	0	0

Fonte: A autora, 2016.

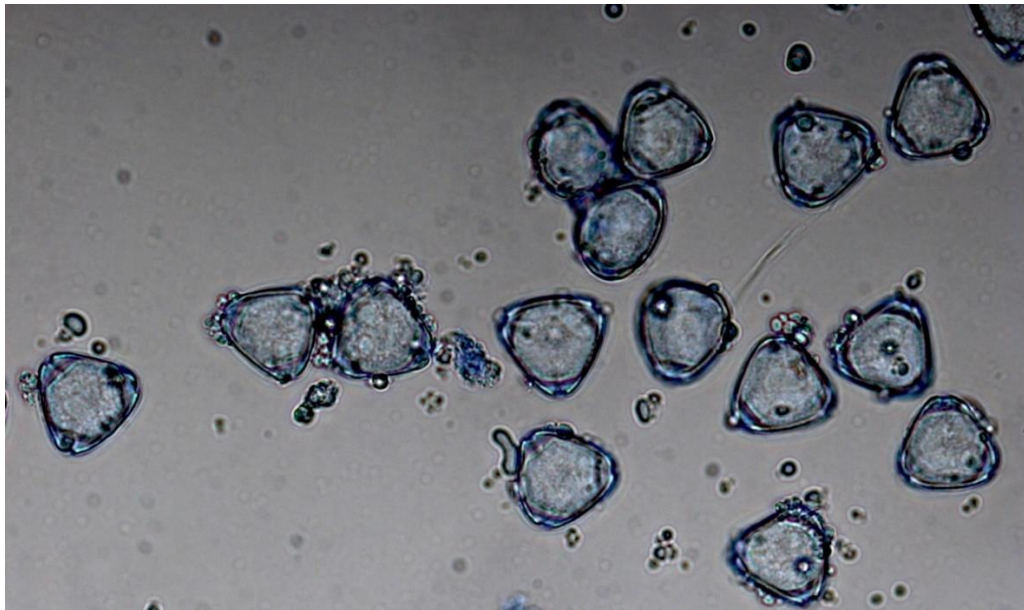


Figura 9 - Pólen viáveis de *E. urophylla*, com o corante Azul de Lactofenol. Fonte: A autora, 2016.

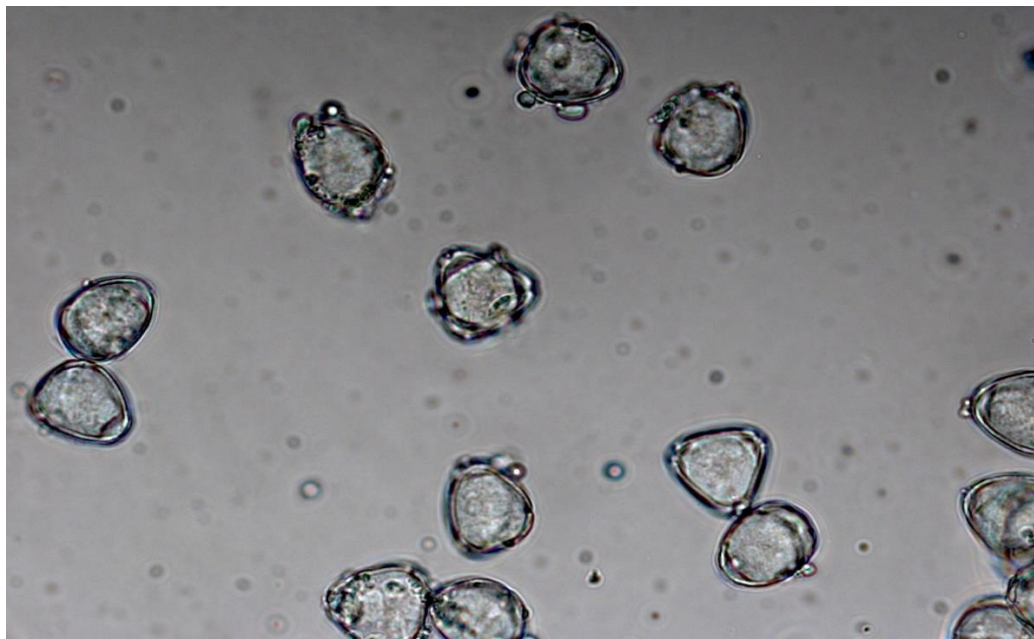


Figura 10 - Pólen inviáveis de *E. urophylla*, com o corante Azul de Lactofenol. Fonte: A autora, 2016.

Não foram encontradas referências na literatura sobre as mesmas concentrações e períodos utilizando o azul de Lactofenol, para que se pudesse comparar com o presente trabalho. A maioria dos trabalhos encontrados usa menor concentração com maior tempo, com 12, 18 e até 24 horas, como apresentou França (2008), em seu trabalho com pólen de berinjela. No entanto, estamos procurando um teste rápido e não um teste tão demorado quanto o de germinação de 24h. Portanto a espera por um período tão longo não se justifica, no nosso caso. Concentrações maiores devem ser estudadas, pois há a possibilidade de resultados mais rápidos.

7.3 Comparação entre corantes específicos

A tabela 5, mostra a diferença entre os dois corantes analisados, comparativamente com a porcentagem do teste de germinação utilizando sacarose, mostrando que o teste de coloração com o corante 2,3,5 - Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC), apresentou uma porcentagem de coloração inferior, mas bem semelhante à encontrada no teste de germinação, e que o teste Azul de lactofenol superestima a viabilidade, apresentando uma porcentagem de coloração bem superior a encontrada no teste de germinação, o que não é desejado. Enquanto o TTC (76 %), apresenta coloração levemente inferior ao teste de germinação (79 %), mas ainda assim bem mais semelhante ao teste de germinação, mostrando-se mais eficiente.

O resultado encontrado é semelhante ao encontrado por Munhoz *et al.* (2008), analisando a viabilidade polínica de *Carica papaya*, testara cinco corantes, 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), Alexander, carmim acético, lugol e Sudan IV. Seu teste de coloração com TTC forneceu estimativa de viabilidade (67,5%) equivalente ao teste de germinação *in vitro* e, portanto, se mostrando confiável para viabilidade polínica daquela espécie estudada. Os demais corantes testados superestimaram a viabilidade do grão de pólen (> 90%).

Vianna *et al.* (2006), em seu estudo avaliando diferentes corantes como indicadores de viabilidade do pólen de mamona, utilizando Aceto carmim 2%, Azul de tripan e TTC, concluíram que o corante 2,3,5 - Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) foi o mais indicado para avaliar a viabilidade polínica em mamona.

Testando o uso de diferentes corantes na determinação da viabilidade de grãos de pólen de bananeira, usando Carmim Acético, Orceína, Lugol, Alexander e TTC, Lins *et al.* (2010), também encontrara que o TTC foi o que apresentou os menores

valores de porcentagem de viabilidade polínica, indicado pela coloração vermelha do pólen.

Tabela 5 – Porcentagem média de germinação e de coloração pelos corantes TTC e Azul de Lactofenol, mostrando a diferença entre os dois corantes.

Pólen germinado		
Espécie		% de pólen germinados
<i>E. urophylla</i>		79%
<i>E. brassiana</i>		63%

Pólen corado		
Espécie	Corantes	% de pólen corados
<i>E. urophylla</i>	TTC	76%
	Azul de Lactofenol	97%
<i>E. brassiana</i>	TTC	61%
	Azul de Lactofenol	88%

Fonte: A autora, 2016.

Vários autores afirmam que o teste do TTC fornece uma estimativa confiável da viabilidade do pólen, tendo o resultado próximo àquele fornecido pelos testes de germinação *in vitro* (Huang *et al.*, 2004), além de ser muito utilizado por ser um método relativamente rápido e simples.

8. CONCLUSÕES

A sacarose continua sendo o melhor açúcar para indicar a real viabilidade do pólen germinado *in vitro* para as espécies: *E. urophylla* e *E. brassiana*.

O corante que apresentou resultado semelhante ao teste de germinação *in vitro* é o 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) sendo assim, o mais indicado para testar a viabilidade do pólen com uma concentração de 1,5 % durante o período de 60 minutos para as espécies *E. urophylla* e *E. brassiana*.

A comparação do teste de germinação *in vitro* com os diferentes corantes testados mostrou que o corante TTC na concentração de 1,5 % por 60 minutos é o que mais se aproxima do teste de germinação *in vitro*, podendo ser usado para substituí-lo.

Novos açúcares e novas concentrações de TTC devem ainda ser testados visando a obtenção de protocolos rápidos de viabilidade.

APÊNDICE A

Receitas das soluções utilizadas como corantes no trabalho.

Solução:

1) 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio – 0,5, 1,0, e 1,5%, respetivamente:

- 0,5 g de 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio – 100 mL de álcool etílico.
- 1,0 g de 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio – 100 mL de álcool etílico.
- 1,5 g de 2,3,5 Cloreto de trifeniltetrazólio – 100 mL de álcool etílico.

Solução:

2) Azul de Lactofenol 1 %

- 20 mL de fenol
- 40 mL de glicerina
- 20 mL de água
- 20 mL de ácido láctico
- 5 mL de solução aquosa de 1 % de azul de anilina

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, Michael P. 1969 e 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**. Vol. 55. Pág. 13-18.

ALVIM, Patrícia de O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho** 2008. 54 págs. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

AMUTHA, R.; MUTHULAKSMI, S.; RANI, W.B; INDIRA, K.; MAREESWARI, P. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annus* L.) genotypes for high temperature stress, **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**. Egypt. v.3 n.4 p. 245-251. 2007.

ANTONIO, Isaac C. In vitro germination of cupuassu [*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann] pollen grain. **Científica**, Jaboticabal, v.32, n.2, p.101-106, 2004.

ASSIS, Teotônio F. de; BAUER, João F. dos S.; TAFAREL, Geraldo. Sintetização de híbridos de Eucalyptus por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.3, n.1, 1993. Disponível em: <<http://coral.ufsm.br/cienciaflorestal/artigos/v3n1/art10v3n1.pdf>> Acesso em: 02 de outubro de 2015.

ASSIS, Teotônio F. de. 3º Encontro Brasileiro de Silvicultura: **Melhoramento genético de Eucalyptus: desafios e perspectivas**. 2014. Disponível em: <<http://www.expoforest.com.br/silvicultura/wp-content/uploads/2013/09/encontro-silvicultura-2014-bloco-2-pdf-artigo-pag-127.pdf>> Acesso em: 25 de setembro de 2015.

_____. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.18, n.185, p.32-51, 1996a.

BAÉZ, Paola, RIVEROS, Magali & LEHNEBACH, Carlos. 2002. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. **New Zealand Journal of Botany** Vol.40. pág. 671- 678.

BHOJWANI, Sant S; BHATNAGAR, S. P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264p.

BORGES, Cacilda P., SILVA, Araci A., FERREIRA, Mário. **Estudos preliminares sobre a conservação do pólen de Eucalyptus spp**. IPEF, Piracicaba, v.6, p.3-32, 1973.

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

CIFLORESTAS. Disponível em:

<<http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto> > Acesso em: 31 de outubro de 2015.

COOK, Stanton A. & STANLEY, Robert G. Tetrazolium chloride as an indicator of Pine pollen germinability. **Silvae Genetica**, Frankfurt. Vol. 9. Pág.134-136.1960.

DERIN, Kubilay & ETI, Sinan. 1999. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. Vol. 25. Pág.169-173.

DOMINGUES, Edson T., NETO, Augusto T. & SOBRINHO, Joaquim T. 1999. Viabilidade do pólen em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**. Vol. 56. Pág. 265-272.

DORMAN, Keith W. **The genetics and breeding of southern pines**. Washington: USDA. Forest Service, 1976. 407 p.

DUTRA, G. A. P.; SOUSA, M. M; RODRIGUES, R.; SUDE, C.P.; PEREIRA, T. N. S. **Viabilidade em grãos de pólen fresco e armazenado em acessos de pimenta**. Horticultura Brasileira, Brasília, v.18, p.729-730, 2000. Suplemento.

EINHARDT, Patrícia M.; CORREA, Elísia R.; RASEIRA, Maria do C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 5-7, Abril 2006. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v28n1/29678.pdf>> Acesso em 03 de outubro de 2015.

FAULL, A.F. Some factors in pollen germination on calcium salts, dextrose, drying. **Journal of The Arnold Arboretum**, Cambridge, v.36, p.171-188, 1955.

FILHO, Estefano P.; SANTOS, Paulo E. T. Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas. 2011, **Documentos 214**, ISSN 1980-3958 Paraná, Brasil.

FONSECA, Sebastião. M. da; RESENDE, Marcos D. V. de; ALFENAS, Acelino C.; GUIMARÃES, Lúcio, M. da S.; ASSIS, Teotônio F. de; GRATTAPAGLIA, Dario. (2010). **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV. Pág. 13-114.

FRANÇA, Leomara V. **Secagem e conservação dos grãos de pólen de berinjela**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, 2008. 93 p.

FRANÇA, Leomara V.; NASCIMENTO, Warley M.; TORRES, Antonio C. **Níveis de sacarose para a germinação in vitro de grãos de pólen de berinjela “Ciça”**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 24, n. 1, jul. 2006. Suplemento 1.

FRANÇA NETO, José B.; KRZYZANOWSKI, Francisco C.; COSTA, Nilton P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72 p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 116).

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

GODDARD, R. E.; MATTHEWS, F. R. Pollen testing. In: FRANKLIN, C. (Ed.) **Pollen management handbook**. Washington: USDA Forest Service, 1981. 98p. Agriculture Handbook, 587.

GONÇALVES, Paulo de S.; PAIVA, João R. de; REBELLO, Antônio P. “**In vitro**” pollen germination of *Hevea camargoana*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.17, n.2, p.287-291, 1982.

HUANG, Zehao; ZHU, Jinmao; MU, Xijin; LIN, Jinxing. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, v. 93, p. 295-301, 2004.

HOEKSTRA, Folkert A. & BRUINSMA, J. 1975. **Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen**. Plant Physiology. Vol. 34. Pág. 221-225.

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Ibá 2015**. Disponível em: <http://www.iba.org/images/shared/iba_2015.pdf> Acesso em: 23 de setembro de 2015. Pag. 15

IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **Anuário estatístico do ABRAF, ano base 2009**. Disponível em:< <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-ABRAF-2010-BR.pdf>> Acesso em: 24 de setembro de 2015.

JUNIOR, Laerte S.; GARCIA, José N. Potencial de melhoramento genético em *Eucalyptus urophylla* procedente da Ilha Flores. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 23-32, dez. 2003.

LINS, Leila C. R.; SOARES, Taliane L.; COSTA, Maria A. P. C.; SEREJO-SANTOS, Janay A.; SILVA, Sebastião O. Uso de diferentes corantes na determinação da viabilidade de grãos de pólen de bananeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: **Anais...** Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010. 2011

MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, N. R.; CHARTIER-HOLLIS, J.M.; LYNCH, P.T. Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v.66, p.235-241, 1993.

MARTIN B, COSSALTER C. Les Eucalyptus des Iles de la Sonda. **Bois et Forêts des Tropiques**. 1975; 163:3-25.

MELLONI, Maria L. G. **Fisiologia do florescimento e viabilidade do grão-de-pólen da cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*)**. 2012. vii, 64 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012.

MOORE, R. P. 1973. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: W. Heydecker (ed.). **Seed Ecology**. Londres, Butterworths. P. 347-366.

MOURA, Vicente P. G. O germoplasma de *Eucalyptus brassiana* S. T. Blake no Brasil. **Comunicado Técnico 103**. ISSN: 9192-0099. Brasília, 2003.

MOURA, Vicente P. G.; OLIVEIRA, Jeselito B.; VIEIRA, Valdemirde M. Avaliação de procedências de *Eucalyptus brassiana* S. T. Blake em Planaltina, Distrito Federal, área de cerrado. **Trabalho de Pesquisa / Research Paper**. IPEF n.48/49, p.87-97, jan./dez.1995.

MULUGETA, Dawit; MAXWELL, Bruce D.; FAY, Peter K. and DYER, William E. 1994. *Kochia* (*Kochia scoparia*) pollen dispersion, viability and germination. **Weed Science**. Vol. 42. Pag. 548-552.

MUNHOZ, Márcia; LUZ, Cynthia F. P. da.; MEISSNER FILHO, Paulo E.; BARTH, Orthud M.; REINERT, Fernanda. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, 2008.

PAIVA, João R. de; GONÇALVES, Paulo de S.; REBELLO, Antonio P. **Germinação de pólen in vitro de alguns clones de seringueira**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. v.18, n.9, p.1021-1029, 1983.

PEREIRA, Roselaine C.; DAVIDE, Lisete C.; RAMALHO, Magno A. P.; ANDRADE, Helder B. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. **CERNE**, V. 8, N.2, p.060-069, 2002.

PLINE, Wendy A.; EDMISTEN Keith L.; OLIVER, Tim; WILCUT, John W.; WELLS, Randy and ALLEN, Nina S. 2002. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**. Vol. 42. Pág. 2193-2200.

RADFORD, A.E, DICKISON, W.C, MASSEY, J.R., BELL, C.R. 1974. **Vascular Plant Systematics**. Harper & Row Publishers, New York. 891pp.

RIGAMOTO, Reijjeli R. and TYAGI, Anand P. 2002. Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma Island. **The South Pacific Journal Natural Science**. Vol. 20. Pág. 30-33.

SALLES L.A.; RAMOS J.D.; PASQUAL M.; JUNQUEIRA K.P.; Silva A.B. (2006) Sacarose e pH na germinação in vitro de grãos de pólen de citros. **Ciências e Agrotecnologia** 30: 170-174.

SFB. Serviço Florestal Brasileiro. **Florestas do Brasil em resumo 2010**. Disponível em: <www.florestal.gov.br/index.php?option=com_k2&view=item&task=download&id=98> Acesso em: 23 de setembro de 2015.

SFB. Serviço Florestal Brasileiro. Recursos Florestais: **As Florestas Plantadas**. Disponível em:< <http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/as-florestas-plantadas>> Acesso em: 24 de setembro de 2015.

SOUSA, Valderês A. de. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp.** 1988. 155 pág. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo. São Paulo.

_____. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 21, p. 15-19, 1990. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/sousaID-4ZZkYEfldy.pdf>> Acesso em 02 de outubro de 2015.

SOUSA-LANG, Valderês A. de; PINTO JUNIOR, José E. Influência do meio de cultura na germinação do pólen de três espécies de *Eucalyptus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.34, p.45-54, 1997.

_____. **Efeitos de diferentes açúcares na germinação do pólen de *Araucaria angustifolia*.** Colombo, PR: Embrapa-CNPQ, 1996.

_____. **Efeito de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp.** **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 24/25, p. 9-17. 1992.

SOUSA, Valderês A. de; SCHEMBERG, Eduardo A. AGUIAR, Ananda V. de. Germinação in vitro de pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 86, p. 147-151, jun. 2010.

SOUZA, Margarete M.; PEREIRA, Telma N. S.; MARTINS, Ernete R. Microsporogênese associada ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras. V. 26, p.1209-1217, 2002.

SPRAGUE, J. R. **Seed and pollen handling.** In: TREE IMPROVEMENT SHORT COURSE, 1977, Raleigh. Raleigh: Carolina State University, 1977. Pág. 90 -102.

STANLEY, Robert G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management.** Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307p.

TURNBULL, J.; BROOKER, I. Cape York red gum. **Forest tree series.** CSIRO, Melbourne (213) 1978.

VERLEYSSEN, Hans; SAMYN, G; BOCKSTAELE, Erik V.; DEBERGH, Pierre, 2004: Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant cell tissue and organ culture**, Dordrecht V. 77 n.1 p.11-21. 2004

VIANNA, Rita A. P.; BOBROWSKI, Vera L.; SILVA, Daniela S. DA; SILVA, Sérgio D. A. Avaliação de diferentes corantes como indicadores de viabilidade do pólen de mamona. In: Congresso Brasileiro de Mamona. 2. 2006. Aracaju. **Anais eletrônicos...** Aracaju, 2006.

VIEIRA, F.S.; BUCSAN, B. Ocorrência naturais de *Eucalyptus urophylla* na Indonésia. **Silvicultura**, p.359-361, 1980.