



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

MORFOLOGIA, GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE PÓLEN DE JENIPEIRO

GILMARA DA SILVA FREIRE

2025



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

GILMARA DA SILVA FREIRE

**MORFOLOGIA, GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE
PÓLEN DE JENIPEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

Orientadora
Profa. Dra. Ana da Silva Lédo

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2025

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

F866m Freire, Gilmara da Silva.
Morfologia, germinação e conservação *in vitro* de grãos de pólen de jenipapeiro / Gilmara da Silva Freire; orientadora Ana da Silva Ledo. – São Cristóvão, SE, 2025.
62 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2025.

1. Agrobiodiversidade. 2. Jenipapo - Pólen. 3. Germinação. 4. Jenipapo - Morfologia. I. Ledo, Ana da Silva, orient. II. Título.

CDU 582.936.1

GILMARA DA SILVA FREIRE

**MORFOLOGIA, GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE
PÓLEN DE JENIPEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2025.

| | |
|---|-----------------------|
| Dra. Ana Veruska Cruz da Silva | (PPGAGRI/UFS/Embrapa) |
| Dra. Itamara Bomfim Gois | (PPGAGRI/UFS) |
| Dr. Rodolfo de França Alves | (IFS) |
| Dra. Caroline de Araújo Machado Brandão | (SEMED) |

Profa. Dra. Ana da Silva Ledo
(PPGAGRI/UFS/Embrapa)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A todos que contribuíram para a minha
formação pessoal e profissional*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar sabedoria, força, saúde, capacidade e por ter me conduzido para a realização de mais uma etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Sergipe, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), e à Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela oportunidade de realização da minha tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

À minha orientadora, Dra. Ana Lédo, por todas as oportunidades oferecidas durante o período do doutorado. Muito obrigada pela oportunidade de ser sua orientanda durante esses quatro anos, pela paciência, ensinamento, orientação, confiança e motivação.

À Dra. Ana Veruska pelo carinho e por palavras de apoio que sempre são acompanhadas de um sorriso.

À Dra. Caroline Machado, por todo ensinamento, empenho e por ter compartilhado seu conhecimento.

Aos meus pais, Dogival e Givalda; meus irmãos, Jeferson, Jussara, Géssica, Quinor, Júnior, Kaique e Lanay; meus sobrinhos Karen e Miguel, por todo o apoio ao longo da minha trajetória.

Aos meus amigos Iuri, Mell, Gabi, José Paulo, Tamires e Rainan que me apoiaram mesmo que de longe, em mais uma etapa da minha vida e por estarem sempre dispostos a me ouvir e me incentivar da melhor maneira possível.

Aos meus amigos do PPGAGRI-UFS, Carlos, William, Jéssica Fontes, Vinícios, Ysabella e Itamara, pelas conversas e por sempre estarem disponíveis para ajudar, a Rose que é um anjo que Deus colocou em minha vida para partilhar as experiências, alegrias e desesperos que o doutorado proporciona.

Aos técnicos Inácio Roque e Silvio Gomes, pela atenção, paciência e ensinamentos no laboratório durante a execução dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros (LABCULT), Larissa Peixoto, Letícia Rocha, Rafaela Mota, Leila Albuquerque e Annie Oliveira por toda a ajuda, troca de experiência e em especial a Fernanda Santana por tantas conversas, conselhos, pela troca de experiência e principalmente a amizade.

A todos os familiares e amigos pela torcida e encorajamento.

A todos que foram fundamentais nessa etapa.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| LISTA DE TABELAS | iii |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | iv |
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vi |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Aspectos gerais do jenipapeiro | 3 |
| 2.2 Viabilidade do grão de pólen | 5 |
| 2.3 Meios de cultura para germinação <i>in vitro</i> | 6 |
| 2.4 Conservação de grãos de pólen | 7 |
| 2.5 Morfologia e característica polínica | 8 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 10 |
| 4. ARTIGO 1: <i>IN VITRO</i> VIABILITY OF GENIPAP POLLEN GRAINS IN DIFFERENT CULTURE MEDIA | 18 |
| Resumo | 18 |
| Abstract..... | 18 |
| 4.1. Introduction | 18 |
| 4.2. Materials and Methods..... | 19 |
| 4.3. Results and Discussion | 19 |
| 4.4. Conclusion | 20 |
| 4.5. References | 20 |
| 5. ARTIGO 2: VIABILITY AND CONSERVATION OF GENIPAP TREE POLLEN GRAINS | 23 |
| Resumo | 23 |
| Abstract | 23 |
| 5.1. Introduction | 23 |
| 5.2. Materials and Methods..... | 24 |
| 5.3. Results and Discussion | 26 |
| 5.4. Conclusion | 30 |
| 5.5. References | 30 |
| 6. ARTIGO 3: <i>IN VITRO</i> VIABILITY OF POLLEN GRAINS FROM GENIPAP ACCESSIONS | 33 |
| Resumo | 33 |
| Abstract | 33 |
| 6.1. Introduction | 34 |
| 6.2. Materials and Methods | 34 |
| 6.3. Results and Discussion | 36 |
| 6.4. Conclusions | 40 |
| 6.5. References | 40 |
| 7. ARTIGO 4: LOW AND ULTRA-LOW TEMPERATURE STORAGE OF POLLEN GRAINS AND <i>IN VITRO</i> POLLINATION OF <i>Genipa americana</i> L. ACCESSIONS... Abstract | 44 |
| 7.1. Introduction | 44 |
| 7.2. Materials and Methods..... | 45 |
| 7.3. Results | 46 |
| 7.4. Discussion | 46 |

| | |
|---|----|
| 7.5. References | 48 |
| 8. ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE GRÃOS DE PÓLEN EM ACESSOS DE JENIPAPEIRO..... | 56 |
| Resumo..... | 56 |
| Abstract..... | 56 |
| 8.1. Introdução..... | 56 |
| 8.2. Material e Métodos..... | 57 |
| 8.3. Resultados e discussão..... | 58 |
| 8.4. Conclusão | 60 |
| 8.5. Referências Bibliográficas..... | 60 |
| 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 62 |

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRIPT 2

| Figure | Página |
|---|--------|
| 1 Viability response of genipap pollen grains at different storage conditions and length of storage (days) determined using <i>in vitro</i> germination..... | 26 |
| 2 Viability of genipap (%) pollen grains after 180 and 365 days at different storage conditions determined using <i>in vitro</i> germination..... | 27 |
| 3 Viability response (%) determined by acetocarmine staining of genipap pollen grains under different storage conditions and lengths of storage (days)..... | 28 |
| 4 Viability test of pollen grains of <i>G. americana</i> , where A and B exhibit viability determined using 1% acetocarmine staining, and C and D exhibit viability determined using germination of the pollen tube. Symbols: A single arrow represents non-stained pollen, and a double arrow represents stained pollen..... | 29 |
| 5 Histological analysis of the pollen grains of <i>G. americana</i> under different storage conditions. A in a refrigerator (4°C), B in a freezer (-20°C), C in an ultra freezer (-80°C), and D in a drum with liquid nitrogen (-196°C). N nucleus, E exine, Pg pollen grains, and P pollenkitt..... | 30 |

MANUSCRIPT 3

| Figure | Página |
|--|--------|
| 1 Viability response of genipap pollen grains at different accessions as a function of <i>in vitro</i> culturing time..... | 36 |
| 2 A and B: emergence of the pollen tube in the medium of Lora et al. (2006) [24] stained with Evans blue dye, and structures of the pollen tube and pollen grains; Figures C and D: pollen grains stained with carmine acetic 1%. Figures A, B, and C at 20X – bar = 50 µm; Figure D at 10X – bar = 200 µm.... | 38 |
| 3 Response of viability by <i>in vitro</i> germination of genipap pollen grains as a function of the culture medium and <i>in vitro</i> cultivation time..... | 39 |

MANUSCRIPT 4

| Figure | Página |
|---|--------|
| 1 Germinated genipap pollen grains, showing the protrusion of the pollen tube after a 24-h incubation period stored in liquid nitrogen (-196 °C) in Lora culture medium. Figures A, B and C show the well-developed pollen tube, accessions CA, AR2 and MS respectively, figure D shows accession CR5 with the pollen tube brittle. Bar = 200 µm..... | 52 |
| 2 Effects of storage times (days) on <i>in vitro</i> pollen grain germination (%) of genipap accessions. AR2- Arauá 2, CR5 - Lagarto 5, MS - Ilha Mem de Sá, and CA – Caueira accessions..... | 53 |
| 3 Effects of storage times (days) on <i>in vitro</i> pollen grain germination (%) of genipap under different storage temperatures..... | 53 |
| 4 Histological analysis of pollen grains from the accessions of the genipap BAG: A) AR2 at room temperature, B) AR2 stored in the refrigerator at 4 °C. C) AR2 in the freezer at -20 °C. D) AR2 in the ultra-freezer at -80 °C. E) AR2 liquid nitrogen at -196 °C. F) CA at room temperature. G) CA at 4 °C. H) CA at -20 °C. I) CA at -80 °C. J) CA at -196 °C. K) CR5 at room temperature. L) CR5 at 4 °C. M) CR5 at -20 °C. N) CR5 at -196 °C. O) MS at room temperature. P) MS at 4 °C. Q) MS -20 °C R) MS at -80 °C. Bar of 20 µm in | 55 |

images A, B, E, G, H, J, P, Q and R. Bar of 40 μm in images C, D, F, I, K, L, M, N and O. N = nucleus, E = exine, Pg = pollen grains.....

MANUSCRIPT 5

| Figure | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Grãos de pólen de <i>G. americana</i> evidenciando diferença entre si em relação ao tamanho, ornamentação e forma. A- seta indicando a presença da exina, B e E - setas indicando as aberturas polínicas, F - setas indicando a exina e o conteúdo celular extravasado. Figuras A e B - representam grãos de pólen do acesso CA, C - acesso CR5, D - acesso AR2, E e F - representam grãos de pólen do acesso MS. Barra de 100 μm | 58 |
| 2 | Análise de agrupamento de ligação única de acessos de <i>G. americana</i> estudadas com base em parâmetros quantitativos de grãos de pólen..... | 59 |

LISTA DE TABELAS

MANUSCRIPT 1

| Table | Página |
|--|--------|
| 1 <i>In vitro</i> pollen grain germination of genipap (<i>Genipa Americana</i> L.) at room temperature (27±2°C) as a function of culture media and incubation time at 24-hour intervals up to 288 hours after incubation ⁽¹⁾ | 20 |

MANUSCRIPT 2

| Table | Página |
|--|--------|
| 1 Mean values of viability of pollen grains (%) of the Siriri accession under different storage conditions determined using <i>in vitro</i> germination..... | 27 |

MANUSCRIPT 3

| Table | Página |
|---|--------|
| 1 Composition of the culture media tested for <i>in vitro</i> germination of pollen grains from different accessions. | 35 |
| 2 <i>In vitro</i> viability of pollen grains by germination of the pollen tube (%) in different accessions of the Genipap BAG as a function of <i>in vitro</i> culturing time... .. | 37 |
| 3 Pollen viability (%) by <i>in vitro</i> germination of the pollen tube of genipap accessions as a function of the culture medium..... | 37 |
| 4 Pollen viability (%) by <i>in vitro</i> germination of the pollen tube of genipap accessions as a function of the culture medium and <i>in vitro</i> culturing time.... | 38 |
| 5 Pollen viability (%) by carmine acetic 1% of genipap accessions as a function <i>in vitro</i> culturing time..... | 40 |

MANUSCRIPT 4

| Table | Página |
|---|--------|
| 1 Effects of genipap accessions on <i>in vitro</i> pollen grain germination (%) at different storage times (days)..... | 54 |
| 2 Effects of genipap accessions and different storage times (days) on <i>in vitro</i> pollen grain germination (%)..... | 54 |
| 3 Effects of storage temperature on <i>in vitro</i> pollen grain germination (%) at different storage times (days)..... | 54 |

MANUSCRIPT 5

| Table | Página |
|--|--------|
| 1 Medições de grãos de pólen em acessos do BAG Jenipapo..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----|----------------------------|
| BAG | Banco Ativo de Germoplasma |
| AR2 | Acesso Arauá 2 |
| AR4 | Acesso Arauá 4 |
| CA | Acesso Caueira |
| CV | Acesso Cascavel |
| CR3 | Acesso Lagarto/Silo |
| CR5 | Acesso Lagarto 5 |
| MS | Acesso Ilha Mem de Sá |

RESUMO

FREIRE, Gilmar da Silva. **Morfologia, germinação e conservação *in vitro* de grãos de pólen de jenipapeiro.** São Cristóvão: UFS, 2025. 62p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade)*

Genipa americana L. é uma espécie nativa, mas não endêmica do Brasil, sendo considerada uma frutífera de interesse econômico. Entretanto, mesmo diante de sua importância, faltam estudos sobre sua biologia floral e outras áreas de interesse. Esse trabalho foi dividido em cinco capítulos. O primeiro avaliou a viabilidade dos grãos de pólen do acesso Siriri à temperatura ambiente em diferentes meios de cultura. O número de grãos de polens germinados foi analisado em intervalos de 24 horas até 288 horas após a incubação. O meio de cultura com 100 mg L⁻¹ de H₃BO₃, 80 g L⁻¹ de sacarose e 1,0 g L⁻¹ de ágar resultou em porcentagem de germinação maior a intermediária, sendo o mais adequado para estudos de viabilidade polínica de jenipapo. No segundo capítulo foi testado o armazenamento de grãos de pólen em diferentes condições. A coleta de flores foi realizada no acesso Siriri. Após a extração, os grãos de polens foram acondicionados em criotubos e mantidos nas seguintes temperaturas: 4°C, -20°C, -80°C e -196°C. As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Após 180 dias, as porcentagens de germinação polínica foram superiores a 60% em todas as temperaturas. A menor porcentagem foi observada em temperatura de 4°C com 60,21%. As demais temperaturas são mais indicadas para conservação *ex situ* de grãos de pólen. O terceiro capítulo avaliou a viabilidade polínica *in vitro* em acessos de jenipapeiro (AR2, AR4, CA e CR3) em temperatura ambiente em diferentes meios de cultura e através do corante carmin acético. A maior viabilidade foi obtida pelo acesso CR3 em meio Lora por 96h de incubação (86,56%). Quanto à viabilidade por corante carmin acético, não houve diferença significativa do tempo de viabilidade para os acessos AR2 e CR3. O meio Lora é superior para estudos de viabilidade por germinação *in vitro* de grãos de pólen em acessos de jenipapeiro. O quarto capítulo analisou o efeito de temperaturas baixas e ultrabaixas (4°C, -20°C, -80°C e -196°C) e do tempo de armazenamento na germinação *in vitro* de grãos de pólen de acessos de jenipapeiro (AR2, CR5, CA e MS). Os acessos CA e CR5 apresentaram resposta quadrática em função do tempo de armazenamento, com a maior viabilidade germinativa estimada de 91,51 e 97,58%, aos 95,23 e 117,3 dias de conservação, respectivamente. Os acessos MS e AR2 não apresentaram ajuste de regressão. Considerando o tempo e a temperatura de armazenamento, aos 90 e 120 dias, todas as condições proporcionaram alta viabilidade, superior a 84%. A análise histológica em temperatura ambiente e sob diferentes condições de armazenamento não revelou alterações nas características estruturais celulares. O quinto capítulo caracterizou a morfologia polínica e identificou os grãos de pólen do jenipapeiro (acessos AR2, CR5, MS e CA) utilizando o método de acetólise. Os grãos de pólen são 3-colporados, com ornamentação reticulada a microreticulada. São considerados de tamanho pequeno a médio e apresentam forma oblata-esferoidal, com pequena área polar. As características apresentadas confirmam a variação existente dentro da espécie, ou seja, são euripolínicos.

Palavras-chave: Armazenamento, tubo polínico, meio de cultura, *Genipa americana* L., Carmin acético.

* Comitê Orientador: Ana da Silva Léo – UFS/Embrapa (Orientadora).

ABSTRACT

FREIRE, Gilmara da Silva. **Morphology, germination and in vitro conservation of genipap pollen grains.** São Cristóvão: UFS, 2025. 62p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity)*

Genipa americana L. is a native species, but not endemic to Brazil, and is considered a fruit tree of economic interest. However, despite its importance, there is a lack of studies on its floral biology and other areas of interest. This work was divided into five chapters. The first evaluated the viability of pollen grains of the Siriri accession at room temperature in different culture media. The number of germinated pollen grains was analyzed at 24-hour intervals, up to 288 hours after incubation. The culture medium with 100 mg L⁻¹ of H₃BO₃, 80 g L⁻¹ of sucrose and 1.0 g L⁻¹ of agar results in a higher to intermediate germination percentage, being the most suitable for studies of pollen viability of genipap. In the second chapter, the storage of pollen grains under different conditions was tested. The flowers were collected at the Siriri accession, and after extraction, the pollen grains were kept in cryovials at the following temperatures: 4°C, -20°C, -80°C and -196°C. Evaluations were performed at 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days. After 180 days, the pollen germination percentages were higher than 60% for all temperatures. The lowest percentage was observed at a temperature of 4°C, with 60.21%. The other temperatures are more suitable for *ex situ* conservation of pollen grains. The third chapter evaluated the *in vitro* pollen viability in genipap accessions (AR2, AR4, CA and CR3) at room temperature in different culture media and through acetic carmine dye. The highest viability was obtained by accession CR3 in Lora medium for 96h of incubation (86.56%). Regarding viability by acetic carmine dye, there was no significant difference in the viability time for accessions AR2 and CR3. Lora medium is superior for viability studies by *in vitro* germination of pollen grains in genipap accessions. The fourth chapter analyzed the effect of low and ultra-low temperatures (4°C, -20°C, -80°C and -196°C) and storage time on the *in vitro* germination of pollen grains of genipap accessions (AR2, CR5, CA and MS). The CA and CR5 accessions showed a quadratic response as a function of storage time, with the highest estimated germination viability of 91.51 and 97.58%, at 95.23 and 117.3 days of conservation, respectively; the MS and AR2 accessions did not show regression adjustment. Considering the storage time and temperature, at 90 and 120 days, all conditions provided high viability, greater than 84%. Histological analysis at room temperature and under different storage conditions did not reveal changes in cellular structural characteristics. The fifth chapter characterized the pollen morphology and identified the pollen grains of the genipap tree (accessions AR2, CR5, MS and CA) using the acetolysis method. The pollen grains are 3-colporate, with reticulate to microreticulate ornamentation. They are considered small to medium in size, and have an oblate-spheroidal shape, with a small polar area. The characteristics presented confirm the variation within the species, that is, they are eurypollin.

Key-words: Storage, pollen tube, culture medium, *Genipa americana* L., acetic carmine.

* Guidance Committee: Ana da Silva Léo – UFS/Embrapa (Advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Genipa americana* L., conhecida popularmente como jenipapeiro, é uma espécie nativa, mas não endêmica do Brasil. Pertence à família Rubiaceae e ocorre nas cinco regiões do país, geralmente nas formações florestais mais úmidas (Gomes, 2025). É uma planta frutífera de grande interesse econômico e selecionada entre as dez de altíssima prioridade pelo programa Plantas do Futuro do CNPq/Banco Mundial/Global Environment Facility/Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Probio coordenado pelo MMA, com maior potencial de uso imediato entre as frutíferas nativas (Coradin *et al.*, 2018). A espécie foi selecionada entre outras 100 (cem) espécies de frutas nativas. Os principais critérios adotados para a seleção das espécies de alta prioridade envolveram a questão mercadológica, em que foi avaliado se a espécie tinha demanda comercial contínua ou periódica em, pelo menos, parte da região onde ela é mais abundante; o valor de mercado quando disponível, e a possibilidade de agregação de valor ao produto quando processado (Coradin *et al.*, 2018).

Atualmente, o uso mais expressivo do jenipapo ocorre na fabricação de doces, geleias, compotas, licores e vinhos, a partir do uso dos seus frutos, que são coletados de forma extrativista de populações naturais, e contribuem para a renda familiar de populações rurais e ribeirinhas. Os frutos dificilmente são consumidos *in natura*, sendo mais apropriados para o cozimento ou outras formas de processamento. Os frutos também são matéria-prima para a produção do corante azul de genipina (Silva *et al.*, 2018).

Além disso, a espécie é empregada na indústria têxtil, na exploração de madeira e medicina popular para tratamento de enfermidades. Os frutos, as folhas e as cascas são indicados em casos de tosse, anemia, contusões, luxações, bem como atividade purgativa, diurética e depurativa, pelo fato de ser encontradas nas folhas e frutos quantidades satisfatórias de iridoides, taninos, ácido geniposídico e genipacetol (Souza *et al.*, 2013).

Em trabalho realizado por Jesus *et al.* (2020), foi observado que compostos iridoides de *G. americana* desempenham um papel importante na toxicidade, com alta repelência e baixa persistência a *Aceria guerreronis*, e no qual os principais iridoides para o combate ao ácaro do coco foram a genipina e o geniposídeo. A *G. americana* também é muito utilizada na arborização urbana, recuperação de áreas degradadas, composição de áreas de preservação permanente e em sistemas agroflorestais (Sá *et al.*, 2015).

A técnica de cultura de tecidos de plantas tem sido empregada com sucesso na propagação e conservação do jenipapeiro (Sá *et al.*, 2015; 2016; Nascimento *et al.*, 2020). Entretanto, estudos de viabilidade e conservação *in vitro* de grãos de pólen são escassos. A conservação do grão de pólen é uma importante ferramenta no manejo dos recursos genéticos vegetais (Dinato *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de métodos confiáveis para determinar a qualidade funcional do grão de pólen ajuda a monitorar sua viabilidade durante o armazenamento e inclui estudos de interação do grão de pólen com o estigma, otimização dos meios de cultura, e de incompatibilidade e fertilidade (Shivanna e Rangaswamy, 1992). O armazenamento de grão de pólen é um método de conservação *in vitro* útil aos programas de melhoramento genético, em cruzamentos controlados de plantas com defasagem de floração e relevância socioeconômica (Assis *et al.*, 1993), funciona como um meio de manutenção da viabilidade do grão de pólen.

O sucesso da germinação *in vitro* do grão de pólen depende de vários fatores, como espécie vegetal, estado nutricional das plantas, época do ano e horário de coleta, fotoperíodo, temperatura, método de coleta, período de incubação e presença de micro e macronutrientes no meio de cultura (Soares *et al.*, 2008), além de ajustes da composição dos meios de cultura para cada espécie (Chagas *et al.*, 2010; Sinimbu Neto *et al.*, 2011).

G. americana é uma espécie que ainda necessita de muitos estudos, principalmente relacionados à biologia floral, conservação *ex situ* e criopreservação. Tendo em vista que a viabilidade polínica é modificada quando exposta a diferentes condições de armazenamento.

Diante do exposto, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar meios de cultura mais adequados para estudos de viabilidade por germinação *in vitro* de grãos de pólen de jenipapeiro, bem como a determinação das condições de conservação de grãos de pólen e tempo de armazenamento. Além disso, foram realizados estudos sobre anatomia vegetal por meio da histologia e caracterização morfológica polínica. Todas essas questões foram avaliadas em diferentes acessos a fim de verificar a influência do genótipo na elaboração de protocolos de conservação *ex situ*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do jenipapeiro

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, tem origem no norte da América do Sul, com ampla distribuição na América do Sul e Central (Souza *et al.*, 1996; Gomes, 2025). Rubiaceae Juss. é a quarta maior família de angiospermas e está posicionada em Gentianales. Apresenta distribuição cosmopolita, compreende cerca de 611 gêneros e 13.100 espécies, sendo que no Brasil ocorrem cerca de 130 gêneros e 1.425 espécies (APG IV, 2016; BFG, 2024). Em Sergipe, ocorre dentro de pequenas propriedades agrícolas, podendo também ser encontrada em fragmentos naturais de vegetação remanescente e em matas ciliares (Silva *et al.*, 2009).

O jenipapeiro é uma árvore perene, apresenta de 5 a 30 m de altura e 20 a 90 cm de diâmetro do fuste na idade adulta. Seu tronco é reto e cilíndrico, copa estreita e arredondada, os frutos são do tipo baga globosa e possui folhas simples (Figura 1) (Lorenzi, 2008). As sementes são classificadas como intermediárias, por apresentarem certa tolerância à dessecação em função do método de secagem e não suportarem longos períodos de armazenamento (Magistrali *et al.*, 2013).



Figura 1: Árvores perenes presentes nos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo (BAG Jenipapo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Em um trabalho realizado por Gurgel-Garrido *et al.* (1997), foi verificado que as flores são funcionalmente dioicas, com antese diurna, antecipada e rápida na flor masculina e lenta na flor feminina. Os polinizadores efetivos são abelhas grandes, como *Bombus morio* e *Epicharis rustica flava*. Ao observar o comportamento dos polinizadores, foi confirmada a função estratégica do comportamento fenológico, tendo sido observado que os polinizadores visitam primeiro as árvores masculinas, e só depois visitam as árvores femininas (Gurgel-Garrido *et al.*, 1997).

O sistema de reprodução é apomítico e alogâmico, o padrão fenológico é sazonal, influenciado pela temperatura e umidade, há sincronismo entre os períodos de florescimento das árvores femininas e masculinas (Gurgel-Garrido *et al.*, 1997). No entanto, nas flores femininas, os estames não são funcionais (estaminódios), da mesma forma, nas flores masculinas, os ovários não são funcionais (Figura 2) (Ruzza *et al.*, 2020). Bawa *et al.* (1985) citam o jenipapeiro como uma espécie dioica, porém esse termo não é correto para definir esta espécie, pois as flores apresentam todas as estruturas masculinas e femininas, havendo indivíduos que desenvolvem o ovário e outros indivíduos que não o desenvolvem.



Figura 2: Flores de *Genipa americana*. (A) flores masculinas; (B) botão floral masculino; (C) flor e botões florais femininos em diferentes estádios.

As árvores masculinas apresentam antecipação do horário de antese, com maior duração do período de floração e, em alguns casos, maior frequência de florescimento, em comparação com as femininas. Esses fenômenos, combinados ao sincronismo ou assincronismo floral, são vistos como mecanismos para otimizar a eficiência da polinização (Crestana, 1995).

Além disso, os indivíduos têm, em casos raros, flores bissexuais ou flores do sexo oposto presentes em pequena quantidade. E, segundo a autora, a menos que a viabilidade de grãos de pólen e óvulos e a frequência relativa de flores com diferente expressão sexual sejam também examinadas, as conclusões sobre a sexualidade poderiam ser errôneas (Crestana, 1995).

Já em relação à fenologia, em um trabalho realizado na região Sudeste por Crestana (1996), foram observados botões florais a partir de meados do mês de outubro. Nesse período,

atingem 25% da carga total, aumentando rapidamente no mês de novembro e apresentando-se completa no início de dezembro. A abertura de novas flores se superpõe à queda das flores maduras, senescentes e decíduas a partir do quinto ou sexto dia de aberta (Crestana, 1996).

Além disso, *G. americana* é indicada na medicina popular e culinária, em construções civis e fabricação moveleira, e forragem para animais como bovinos, caprinos e suínos (Gomes, 1983; Carvalho, 2003; Oliveira, 2011). As espécies pertencentes à família Rubiaceae apresentam alcaloides que são importantes na elucidação de efeitos farmacológicos, sendo essa família muito importante para a obtenção destes compostos (Mendonça, 2013).

G. americana possui diversos compostos químicos (iridoides e compostos fenólicos). Um deles é a genipina, que é obtida com o fruto verde e é responsável pela coloração azul do fruto, com a oxidação (Bentes e Mercadante, 2014; Bentes *et al.*, 2015), do qual resulta a tintura utilizada por indígenas para pintura do corpo (Jesus *et al.*, 2015). A genipina também possui propriedades anti-inflamatórias e antiangiogênicas que foram demonstradas em trabalhos realizados por Ueda e Iwahashi (1991) e Koo *et al.* (2004).

Em estudos realizados com jenipapeiro, foi observada a sua capacidade como fitorremediador, sobretudo como planta fitoestabilizadora e rizofiltradora do cromo, um metal pesado, prejudicial aos organismos vivos (Barbosa *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2012). A madeira é considerada de primeira qualidade por apresentar características de elasticidade e flexibilidade, excelente para a fabricação de laminados, móveis, cabo de ferramentas, escadas métricas, além de ser utilizada na construção civil e naval (Cordeiro e Félix, 2014).

2.2 Viabilidade do grão de pólen

Para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen, são utilizadas técnicas como germinação de tubo polínico *in vitro*, *in vivo* e testes colorimétricos. Os testes *in vitro* são realizados com preparo de meio de cultura; *in vivo* são feitos com a avaliação da fecundação dos grãos de pólen depositados manualmente nas flores; e os testes colorimétricos são indicados para análise da constituição e integridade celular utilizando corantes (Einhardt *et al.*, 2006).

A viabilidade polínica é um fator que pode interferir na distribuição de espécies, podendo estar relacionada à formação dos gametófitos masculinos (grãos de pólen) durante a meiose (Mascarenhas, 1992; Horner e Palmer, 1995). Diante disto, testes colorimétricos com os corantes reativos de Alexander, carmim acético, lugol e o sudan IV, são indicados para análise da constituição e integridade celular (Dafni, 1992; Einhardt *et al.*, 2006; Munhoz *et al.*, 2008).

Em algumas espécies, a pouca disponibilidade de grãos de pólen viáveis pode resultar na menor produção de frutos e, conseqüentemente, menor produção de sementes (Nascimento *et al.*, 2011). No caso de *G. americana*, caracterizada por Salomão e Allem (2001) como apomítica, a pouca disponibilidade dos grãos de pólen, somada à baixa reprodução cruzada por redução de polinizadores (Giannini *et al.*, 2012), pode resultar em uma diminuição na diversidade genética da espécie.

A viabilidade polínica está associada à receptividade do estigma, que, por sua vez, é fator fundamental para determinar o melhor período de deposição do grão de pólen na flor (Brito *et al.*, 2010). Podem se agrupar os métodos de testar a viabilidade polínica em quatro tipos: (1) por meio de corantes; (2) germinação *in vitro*; (3) germinação *in vivo*; e (4) porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do grão de pólen em teste (Galletta, 1983). A germinação *in vitro* possui resultados rápidos, que podem ser realizados em campo, utilizando as condições e composição do meio de cultivo da espécie (Einhardt *et al.*, 2006).

Dentre as várias metodologias empregadas de avaliação de viabilidade polínica, destaca-se a germinação *in vitro*, capaz de distinguir os grãos de pólen viáveis dos inviáveis. Esse tipo de teste busca reproduzir as condições naturais do estilete e estigma, onde o grão de pólen germina e se desenvolve (Sousa *et al.*, 2010).

Portanto, um dos métodos para verificar a fertilidade de grãos de pólen é a germinação *in vitro* (Nogueira *et al.*, 2015). Uma vez que a germinação do grão de pólen e o desenvolvimento do tubo polínico são importantes para a fertilização (Kuroki *et al.*, 2017). Taxas de germinação de grão de pólen extremamente baixas podem causar falha no crescimento dos frutos devido à degradação do óvulo antes que o tubo polínico alcance o ovário (Vasilakakis e Porlingis, 1985). A germinação do grão de pólen é afetada por múltiplos estresses bióticos e abióticos, incluindo baixa temperatura (Ohnishi *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2010).

Estudos da viabilidade também podem ser conduzidos por meio de uso de corantes, também denominado teste histoquímico, sendo realizado com auxílio de uma lâmina e acrescentando uma amostra do grão de pólen e uma gota de corante e homogeneizando-a. Existem vários corantes com diferentes ações nas diversas espécies aplicadas. No entanto, os mais utilizados para os testes de viabilidade polínica são: carmim acético, solução de Alexander, azul de lactofenol, azul de algodão, iodeto de potássio, cloreto de 2,3,5 de trifeniltetrazólio (TTC), tetrazólio nitro-azul e verde malaquita com fucsina ácida.

O carmim acético é um método simples para verificar a presença do citoplasma e determinar a quantidade de grãos de pólen normalmente desenvolvidos e maduros, distinguindo-os dos subdesenvolvidos. Indica também a presença de elementos estruturais e a integridade dos grãos de pólen. Segundo Mendes (1994), carmim acético é o corante mais utilizado, cuja vantagem está na praticidade e eficiência comprovada em várias espécies, necessitando de ajustes de protocolo a depender da espécie. Os testes de coloração estão associados apenas à detecção de substâncias constituintes dos grãos de pólen, como amido e lipídios, que podem estar presentes tanto em grãos de pólen maduros quanto nos abortados (King, 1960; Beyhaut, 1988; Rodriguez-Riano e Dafni, 2000).

O carmim acético é utilizado como indicativo de viabilidade polínica e funciona indicando a integridade dos cromossomos, sendo indicado para observação da integridade da cromatina (Pagliarini e Pozzobon, 2004), reagindo com componentes celulares presentes em grãos de pólen maduros. Grãos de pólen corados com vermelho são considerados viáveis, e os não corados e/ou malformados, inviáveis (Kearns e Inouye, 1993). A intensa coloração vermelha ocorre devido à reação com o material genético existente no citoplasma, como o DNA (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Contudo, caso o DNA esteja danificado, essa coloração pode resultar em um falso-positivo.

Entretanto, a análise histoquímica com o uso de materiais de coloração para certas espécies pode produzir resultados falso-positivos quando comparados aos testes de germinação *in vitro*. Os testes de viabilidade polínica realizados com a utilização de corantes são amplamente aplicados devido à sua simplicidade e rapidez. No entanto, os resultados tendem a superestimar a viabilidade em comparação com os resultados obtidos por germinação do tubo polínico *in vitro* (Alexander, 2019; Impe *et al.*, 2020).

O teste de viabilidade por corante é muito importante, mas a utilização de apenas uma técnica para se estimar a viabilidade do grão de pólen pode superestimar ou subestimar os resultados. Assim, é fundamental adotar diferentes métodos para obter resultados mais confiáveis na determinação de viabilidade polínica, uma técnica importante é o teste de viabilidade por germinação *in vitro* utilizando um meio de cultivo.

2.3 Meios de cultura para germinação *in vitro*

Os meios de cultura podem ser líquidos ou semissólidos, para o líquido pode-se utilizar o meio estacionário ou com agitação, sendo esse último utilizado para fornecer oxigênio para respiração do material vegetal (Siqueira *et al.*, 2013). A utilização do meio líquido possibilita resultados similares ou até superiores do que o meio semissólido para várias espécies vegetais. Os meios líquidos são rapidamente preparados, mais baratos devido à redução do custo pela eliminação do ágar e promovem maior homogeneidade, visto que a difusão dos componentes do meio é facilitada (Siqueira *et al.*, 2013).

Vários meios de cultura são usados para a germinação de grãos de pólen *in vitro* e o meio Brewbaker e Kwack (Brewbaker e Kwack, 1963) é amplamente aplicado. No entanto, mudanças nas concentrações de boro e sacarose são necessárias para a germinação ideal (Towill e Walters, 2000).

A sacarose, como outros açúcares exógenos, é essencial para auxiliar o processo osmótico entre ambiente de cultivo e nutrição para germinação *in vitro* (Kwack, 1965; Malik *et al.*, 1982; Li *et al.*, 2020). Em um trabalho realizado por Ferreira *et al.* (2021), foram testadas diferentes concentrações de sacarose na germinação de grãos de pólen de *Passiflora* spp., os autores observaram que a suplementação exógena de diferentes concentrações de sacarose afetou significativamente a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico das espécies do gênero *Passiflora* estudadas. O comportamento dessas espécies também foi diferente com cada nível de sacarose.

Já a adição de boro e cálcio ao meio de germinação aumenta a porcentagem de germinação e o comprimento do crescimento do tubo polínico em muitas espécies frutíferas (Kwack, 1965; Galleta, 1983). Gradientes de boro também podem ser importantes para o crescimento do tubo polínico em direção aos ovários (Blevins e Lukaszewski, 1998).

Em geral, cada espécie tem seus próprios requisitos quanto à composição do meio de cultura devido às variações genéticas entre as espécies e à pressão osmótica do grão de pólen (Lin *et al.*, 2017).

Considerando a alta especificidade da resposta de germinação aos meios de cultura do grão de pólen de diferentes espécies, é importante ajustar/otimizar o meio para cada espécie (Ferreira *et al.*, 2021). Esta estratégia permite melhorar a eficiência da germinação do grão de pólen *in vitro*, assim como proporcionar maior precisão na identificação de indivíduos promissores para uso em programas de melhoramento genético e subsidiar futuros estudos de criopreservação do grão de pólen (Ferreira *et al.*, 2021), pois simula condições *in vivo*, indicando a capacidade dos grãos de pólen emitirem tubos polínicos e concluírem a fertilização (Pereira *et al.*, 2018).

2.4 Conservação de grãos de pólen

A conservação do grão de pólen é uma ferramenta importante na gestão dos recursos genéticos vegetais, sendo que existem diversos métodos de conservação (Dinato *et al.*, 2020). O sucesso do armazenamento de grãos de pólen para fins de conservação genética depende de muitos fatores, sendo imprescindível que o procedimento escolhido garanta a manutenção de elevados percentuais de integridade genética, vigor e germinação (Wang, 1975). O grão de pólen conservado também pode ser usado para apoiar a reprodução em espécies com agentes polinizadores ineficientes, ineficazes ou inexistentes (Tighe, 2004). Assim, os testes de viabilidade replicáveis são cruciais para o desenvolvimento contínuo de protocolos de polinização artificial e armazenamento de grão de pólen (Conner, 2011).

Todavia, para o sucesso do armazenamento a médio e longo prazos, é necessário o domínio de técnicas de coleta, secagem, armazenamento e testes de viabilidade. A avaliação da viabilidade de grãos de pólen antes, durante e após a conservação em longo prazo é essencial para este fim (Einhardt *et al.*, 2006). Uma vez que seja liberado das anteras, ele atua como uma unidade funcional independente (Reddy e Kakani, 2007) E, a criopreservação é um método alternativo simples e muito eficaz para o armazenamento prolongado. O grão de pólen pode ser mantido no nitrogênio líquido por muitos anos, sem perda de suas capacidades essenciais de polinização, fertilização e frutificação. A capacidade de poder armazenar pólen é útil para o melhoramento de plantas, podendo ser utilizado para polinização controlada e para a conservação de recursos genéticos de plantas (Akihama *et al.*, 1979; Towill, 1985; Assis *et al.*, 1993; Dinato *et al.*, 2020).

A criopreservação é uma técnica que permite manter o material biológico em nitrogênio líquido (-196°C) ou em sua fase de vapor (-150°C) por longos períodos, uma vez que, a essas temperaturas ultrabaixas, processos como respiração e atividades enzimáticas são

inativados (Kartha, 1985; Withers e Williams, 1998), paralisando completamente o metabolismo celular (Brison *et al.*, 1995).

Este método é considerado o meio mais promissor para a preservação de longo prazo de várias partes da planta, como sementes, embriões somáticos e zigóticos, material vegetativo (por exemplo, raízes, bulbos, tubérculos, botões, ápices meristemáticos), grãos de pólen e outros sistemas celulares (por exemplo, culturas em suspensão, calos) (Dinato *et al.*, 2020). O sucesso depende da interrupção do metabolismo celular e da manutenção da estabilidade genética e das características fenotípicas das amostras (Dinato *et al.*, 2020).

Yates e Sparks (1990) relataram que o grão de pólen armazenado por até 3 anos e conservados em temperatura de -80 ou -196°C produziram frutos iguais ao pólen fresco. Para armazenamento de longo prazo (ou seja, várias décadas ou mais), o armazenamento criogênico é necessário. A longevidade do armazenamento será essencialmente infinita em nitrogênio líquido (Bredemann *et al.*, 1947).

A conservação dos grãos de pólen é, portanto, de grande importância para a preservação da variabilidade genética além de facilitar o intercâmbio de germoplasma, contribuir significativamente na geração de variabilidade obtida por meio de cruzamentos artificiais e aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (Hanna, 1994; Gomes *et al.*, 2003).

Para que seja possível o cruzamento de espécies em períodos diferentes de floração, é necessário que o grão de pólen que será utilizado seja armazenado de maneira correta. E, para que esse armazenamento tenha sucesso, as variáveis umidade e temperatura devem ser controladas. Estes têm relação direta com o metabolismo dos grãos de pólen e a redução de tais atividades metabólicas tende a aumentar a longevidade deste grão de pólen armazenado (Sousa, 1990). Para possibilitar tais cruzamentos, há a necessidade de se dispor, prontamente, de grão de pólen viável armazenado (Sousa-Lang e Pinto Junior, 1997).

Para que o armazenamento em médio e longo prazo seja bem-sucedido, é necessário que o grão de pólen seja coletado, secado, transportado e armazenado de forma correta, bem como devem ser 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 polínica (Assis *et al.*, 1993; Sousa-Lang e Pinto Junior, 1997; Sousa, 2010).

2.5 Morfologia e característica polínica

O estudo da morfologia polínica é necessário para caracterização dos grãos de pólen e identificação das espécies correspondentes (Ruzza *et al.*, 2023). Para a análise morfológica, o conteúdo celular deve ser extraído para facilitar a visualização da exina e das aberturas polínicas. Para tanto, utiliza-se o método de acetólise proposto por Erdtman (1952), que envolve a utilização de compostos químicos como anidrido acético e ácido sulfúrico, na proporção 9:1.

Vários autores têm utilizado a morfologia polínica para desvendar a filogenia das angiospermas (Dessein *et al.*, 2005). A morfologia é analisada usando a microscopia, uma vez que a microscopia eletrônica (ML) é usada para analisar grãos de pólen acetolisados e a microscopia de varredura (MEV) é utilizada para observar maiores detalhes da ornamentação dos grãos de pólen não acetolisados (Dutra *et al.*, 2020). Para inferir a filogenia através da morfologia polínica é necessária a utilização de análises realizadas com o uso do MEV para que sejam observadas estruturas sinapomórficas como ornamentações (ex.: parede columeladas) (Dessein *et al.*, 2005).

Em Rubiaceae, a morfologia dos grãos de pólen é um dos caracteres mais importantes para a delimitação de gêneros e espécies, e é informativo para a elucidação das relações evolutivas (Silveira Júnior *et al.*, 2012). Um dos primeiros registros morfológicos dos grãos de pólen para a família Rubiaceae é de Vermoesen (1922), que enfatizou a importância taxonômica das características polínicas para a classificação da tribo Gardenieae. Outro autor

que descreveu a morfologia dos grãos de pólen de diferentes espécies de Rubiaceae foi Erdtman (1952).

Trabalhos mais recentes que descreveram a morfologia polínica de espécies de Rubiaceae foram publicados por Dutra *et al.* (2014, 2020). Recentemente foi publicado por Ruzza *et al.* (2023) um trabalho com análises morfológicas de grãos de pólen de *G. americana*, contudo, as propriedades dos grãos de pólen de diferentes genótipos ainda não foram avaliadas detalhadamente, bem como, o trabalho citado acima foi realizado na região Centro-Oeste, podendo haver diferenças morfológicas entre as regiões.

Estudos polínicos realizados em espécies nativas indicam variações no formato, abertura, âmbito, ornamentação e tamanho do grão de pólen (Figura 3) (Souza e Gasparino, 2014; Belonsi e Gasparino, 2015). A Rubiaceae é euripolínica, ou seja, a família apresenta uma grande variação nas características morfológicas dos seus grãos de pólen (Dutra e Gasparino, 2017).

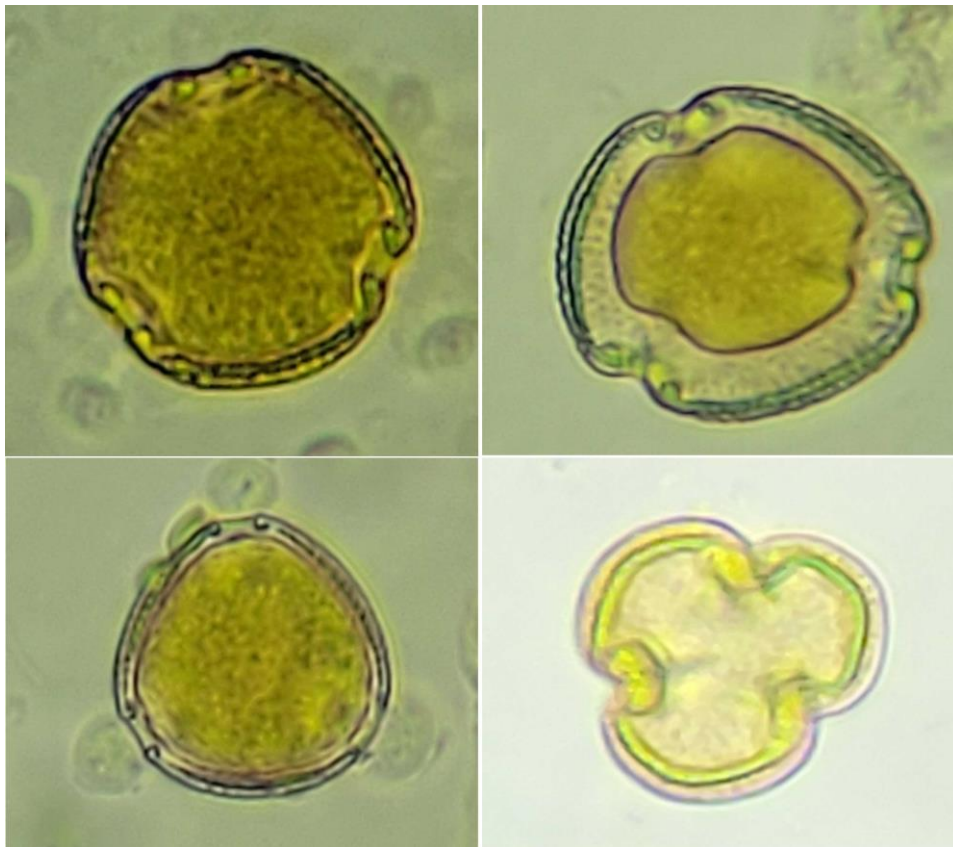


Figura 3: Grãos de pólen de *G. americana* indicando aberturas e variações no formato.

Os estudos filogenéticos raramente são complementados por uma investigação palinológica cuidadosa. As características morfológicas usadas para classificação dos grãos de pólen são geralmente as “clássicas” retiradas da literatura (como número de aberturas, tipo de pólen e padrão da exina) e não necessariamente aqueles que mostram uma variação cladisticamente útil dentro do grupo de estudo (Huysmans *et al.*, 1999).

Entretanto, características que mudam dependendo da morfologia floral, como o número e o tipo de abertura, a ornamentação da exina e o tamanho, são importantes na delimitação dos tipos de grãos de pólen em estudos ecológicos e palinotaxonômicos (Salgado-Labouriau, 1973; Lorscheitter, 2006). Estudos realizados por Thakur e Thakur (1970) e Stanley e Linskens (1974) enfatizam que as estruturas presentes nos grãos de pólen, a morfologia, a morfometria e o padrão de exina são geneticamente estáveis, fornecendo um importante descritor taxonômico.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**, v.13, n. 4, p. 238-241, 1979.

ALEXANDER, L.W. Optimizing pollen germination and pollen viability estimates for *Hydrangea macrophylla*, *Dichroa febrifuga*, and their hybrids. **Scientia Horticulturae**, v. 246, n. 27, p. 244–250, 2019.

Angiosperm Phylogeny Group (APG IV). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. The Linnean Society of London, **Bot. J. Linn. Soc.**, n. 181, p. 1-20, 2016.

ASSIS, T.F.; BAUER, J.F.; TAFAREL, G. Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, v. 3, n. 1, p. 161-170, 1993.

BARBOSA, R.M.T.; ALMEIDA, A.A.F.; MIELKE, M.S.; LOGUERCIO, L.L.; MANGABEIRA, P.A.O.; GOMES, F.P. A physiological analysis of *Genipa americana* L.: a potential phytoremediator tree for chromium polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 264-271, 2007.

BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, v. 72, n. 3, p. 331-345, 1985.

BELONSI, T.K.; GASPARINO, E.C. Pollen morphology of Malpighiaceae from Brazilian forest fragments. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 379–393, 2015.

BENTES, A.S.; MERCADANTE, A.Z. Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa americana* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p.10800–10808, 2014.

BENTES, A.S.; SOUZA, H.A.L.; AMAYA-FARFAN, J.; LOPES, A.S.; FARIA, L.J.G. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3919–3924, 2015.

BEYHAUT, R. **Estúdio comparado de dos técnicas para viabilidade de polen en *Vitis vinifera***. Notas Técnicas, 5. Facultad de Agronomía, Montevideo, 1988.

BFG - Flora e Funga do Brasil – *Rubiaceae* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB210>. Acesso em: 12 dez. 2024.

BLEVINS, J.; LUKASZEWSKI, K. Boron in plant structure and function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 49, p. 481–500, 1998.

BREDEMANN, G.; GARBER, K.; HARTECK, P.; SUHR, K.A. Die Tbhängigkeit der Lebensdauer von Blütenpollen. **Naturwissenschaften**, v. 34, p. 279-280, 1947.

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

- BRISON, M.; BOUCAUD, M.T.; DOSBA, F. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interespecific *Prunus* rootstocks. **Plant Science**, v. 105, n. 2, p. 235-242, 1995.
- BRITO, A. C.; SOUZA, J. D.; REBOUCAS, T. N. H.; AMARAL, C. L. F. Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 208-214, 2010.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**: Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, vol. 1. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.
- CHAGAS, E.A.; PIO, R.; CHAGAS, P.C.; PASQUAL, M.; NETO, J.E.B. Composição de meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 231-236, 2010.
- CONNER, P.J. Optimization of *in vitro* pecan pollen germination. **HortScience**, v. 46, n. 4, p. 571–576, 2011.
- CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F.G.C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial**: plantas para o futuro: região Nordeste. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade; 51)
- CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 685-692, 2014.
- CRESTANA, C.S.M. Ecologia da polinização de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) na Estação Ecológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v. 7, n. 2, p. 169-195, 1995.
- CRESTANA, C.S.M. Fenologia de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar da estação ecológica de Moji-Guaçu – SP. **Revista do Instituto Florestal**, v. 8, n. 2, p. 109-121, 1996.
- DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 1992. 250p.
- DESSEIN, S.; HARWOOD, R.; SMETS, E.; ROBBRECHT, E. Pollen of the *Spermacoce* (Rubiaceae) species from the Northern Territory of Australia: morphology and taxonomic significance. **Austral. Syst. Bot.**, v. 18, p. 367–382, 2005.
- DINATO, N.B.; SANTOS, I.R.I.; VIGNA, B.B.Z.; PAULA, A.F.; FAVERO, A.P. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. **CryoLetters**, v. 41, n. 3, p.115-127, 2020.
- DUTRA, F.V.; DORETO, H.S.; RIBEIRO, P.C.; GASPARINO, E.C. Morfologia Polínica em Espécies Ornamentais de Asteraceae, Ericaceae, Fabaceae, Malpighiaceae, Malvaceae e Rubiaceae. **Nucleus**, v. 11, p. 7–17, 2014.
- DUTRA, F. V.; GASPARINO, E. C. Pollen morphology of Rutaceae from Brazilian forest fragments. **Palynology**, v. 42, n. 1, p.43-54, 2017.

DUTRA, F. V.; BELLONZI, T. K.; SOUZA, C. N.; GASPARINO, E. D. Pollen morphology of Rubiaceae from Cerrado forest fragments: Pollen unit, polarity and diversity of the types of apertures. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 2020.

EINHARDT, P.M.; CORREA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy Angiosperms**. Stockholm: Almqvist e Wiksell, 1952.

FERREIRA, M.S.; SOARES, T.L.; COSTA, E.M.R.; SILVA, R.L.; JESUS, O.N.; JUNHANS, T.L.; SOUZA, F.V.D. Optimization of culture medium for the *in vitro* germination and histochemical analysis of *Passiflora* spp. pollen grains. **Scientia Horticulturae**, v. 288, p. 01-10, 2021.

GALETTA, G. J. Pollen and seed management. *In*: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.

GIANNINI, T.C.; ACOSTA, A.L.; SAIVA, A.; SANTOS, I.A.; JÚNIOR, P.M. Construção de cenários futuros para o uso e conservação de polinizadores. *In*: IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; CANHOS, D.A.L.; ALVES, D.A.; SARAIVA, A.M. (Org.). **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012. pp. 301-313.

GOMES, R.P. **Fruticultura Brasileira**. 9. ed. São Paulo: Nobel, 1983. p.278-281.

GOMES, P.R.; RASEIRA, M.C.B.; 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. 14-17, 2003.

GOMES, M. *Genipa in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14045>. Acesso em: 18 fev. 2025.

GURGEL-GARRIDO, L.M.A.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; CRUZ, S.F.; ROMANELLI, R.C.; ETTORI, L.G.; CRESTANA, C.S.M.; SILVA, A.A.; MORAIS, E.; SCATENA ZANATTO, A.C.S.; SATO, A.S. **Programa de Melhoramento Genético Florestal do Instituto Florestal**. IF Série Registros, n.18, p.1-53, 1997.

HANNA, W.N. Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. **Crop Science**, v. 34, p. 1681-1682, 1994.

HORNER, H. T.; PALMER, R. G. Mechanisms of genetic male sterility. **Crop Science**, v. 35, p.1527-1535, 1995.

HUYSMANS, S.; ROBBRECHT, E.; DELPRETE, P.; SMETS, E. Pollen morphological support for the Catesbaeeae-*Chiococceae*-*Exostema*-complex (Rubiaceae). **Grana**, 1999.

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. 1–18, 2020.

- JESUS, Y.L.; LOPES, E.T.; COSTA, E.V. Descobrimo as Ciências na Cultura Indígena: Pinturas Corporais. **Revista Curiá: Múltiplos Saberes**, v. 1, p. 01- 06, 2015.
- JESUS, A.S.; FILHO, J.G.S.; COELHO, C.R.; TEODORO, A.V.; SILVA, A.V.C.; JUMBO, V.L. Bioactividad de iridoides de *Genipa americana* contra el ácaro del cocotero *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae). **Revista de Protección Vegetal**, v. 35, n. 1, p. 1-8, 2020.
- KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Florida: CRC Press Inc, 1985. pp. 115-134.
- KEARNS, C.A.; INOUE, D.W. **Techniques for pollination biologists**. University Press of Colorado, 1993.
- KING, J.R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. **Stain Technology**, v. 35, p. 225-27, 1960.
- KOO, H.J.; SONG, Y.S.; KIM, H.J.; LEE, Y.H.; HONG, S.M.; KIM, S.J.; KIM, B.C.; JIM, C.; LIM, C.J.; PARK, E.H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, n.2, p.201-208, 2004.
- KUROKI, K.; TAKEMURA, Y.; MINGFENG, J.; MARUMORI, H.; TERATANI, N.; MATSUMOTO, K.; MATSUMOTO, T.; TAMURA, F. Pear pollen selection using higher germination properties at low temperatures and the effect on the fruit set and quality of Japanese pear cultivars. **Scientia Horticulturae**, v.216, p. 200-204, 2017.
- KWACK, B.H. The effect of calcium on pollen germination. **Proceeding American Society Horticultural Science**, v. 86, p.818–823, 1965.
- LI, C.; MENG, D.; PIÑEROS, M.I.A.; MAO, Y.; DANDEKAR, A.M.; CHENGA, L. A sugar transporter takes up both hexose and sucrose for sorbitol-modulated *in vitro* pollen tube growth in apple. **Plant Cell**, v. 32, p. 449–469, 2020.
- LIN, Y.; WANG, Y.; IQBAL, A.; SHI, P.; LI, J.; YANG, Y.; LEI, X. Optimization of culture medium and temperature for the *in vitro* germination of oil palm pollen. **Scientia Horticulturae**, v. 220, p.134-138, 2017.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 368.
- LORSCHUITTER, M. L. **Contribuição da palinologia aos estudos filogenéticos das Angiospermas**. In: J.E.A. Mariath & R.P. Santos (org.). Os avanços da botânica no início do século XXI. Porto Alegre, 2006, pp. 43-48.
- MAGISTRALI, P.R.; JOSÉ, A.C.; FARIA, J. M. R.; GASPARIN, E. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.
- MALIK, C.P.; CHAWLA, J.; GILL, P.K. Exogenous utilization of ¹⁴C sugars and ¹⁴C proline as carbon source for lipid biosynthesis in the germinating *Crotalaria juncea* L. pollen. **Journal of Botany**, v. 116, p. 211-215, 1982.

MASCARENHAS, J.P. Pollen gene expression: Molecular evidence. **International Review of Cytology**, v. 140, p. 3-18, 1992.

MENDONÇA, A.C.A.M.; SILVA, M.A.P.; SEIXAS, E.N.C.; SANTOS, M.A.F. Rubiaceae: aspectos ecológicos e reprodutivos. **Caderno de Cultura e Ciência**, v.12, n. 2, p. 8-20, 2013.

MENDES, M.S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum* spp.** 1994.75 f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 1994.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER FILHO, P.E.; BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

NASCIMENTO, W.M.; LIMA, G.P.; CARMONA, R. Influência da quantidade de pólen na produção e qualidade de sementes híbridas de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 21-25, 2011.

NASCIMENTO, C. M.; OLIVEIRA, L.A.R.; SILVA, A.V.C.; CASTRO, E.M.; LEDO, A.S. Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. **Scientia Plena**, v. 16, p. 1-11, 2020.

NOGUEIRA, P.V.; SILVA, D.F.; PIO, R.; SILVA, P.A.O.; BISI, R.B.; BALBI, R.V. Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 9-15, 2015.

OHNISHI, S.; MIYOSHI, T.; SHIRAI, S. Low temperature stress at different flower developmental stages affects pollen development, pollination, and pod set in soybean. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, p. 56–62, 2010.

OLIVEIRA, D.L. Viabilidade econômica de algumas espécies medicinais nativas do cerrado. **Estudos**, v. 38, n. 2, p. 301-332, 2011.

PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON, M.T. **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF. 2004.

PEREIRA, M.R.; RIBEIRO, H.; CUNHA, M.; ABREU, I. Comparison of pollen quality in *Vitis vinifera* L. cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 112–116, 2018.

REDDY, K.R.; KAKANI, V.G. Screening Capsicum species of different origins for high temperature tolerance by *in vitro* pollen germination and pollen tube length. **Scientia Horticultura**, v.112, p. 130–135, 2007.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, v. 12, p. 241-244, 2000.

RUZZA, D.A.C.; ROSSI, A.B.; FERNANDES, J.M.; PEDRI, E.C.M.; TIAGO, A.V.; BISPO, R.B.; MARTINS, K.C. Etnobotânica do jenipapo (*Genipa americana* L., Rubiaceae) entre agricultores no município de Carlinda, Mato Grosso, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61161-61184, 2020.

RUZZA, D.A.C.; BISPO, R.B.; PEDRI, E.C.M.; MARTINS, K.C.; ZORTÉA, K.E.M.; SOUZA, S.A.M.; PEREIRA, T.N.S.; ROSSI, A.A.B. Palynology and meiotic behavior of *Genipa americana* L., a species native to the Amazon. **Bioscience Journal**, v. 39, p. e39070, 2023.

SÁ, F.P.; SOUZA, V.F.D.; SILVA, V.C.; LÉDO, S.A. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v.45, n.11, p.1939-1945, 2015.

SÁ, F.P.; LEDO, A.S.; SILVA, A.V.C.; AMORIM, J.A.E.; PASQUAL, M. *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, p.155-163, 2016.

SALGADO-LABOURIAU, M.L. **Contribuição à palinologia dos Cerrados**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1973.

SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. Polyembryony in angiosperm trees of the Brazilian cerrado and Caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, p. 369-378, 2001.

SANTANA, K.B.; ALMEIDA, A-A.F.; SOUZA, V.L.; MANGABEIRA, P.A.O.; SILVA, D.C.; GOMES, F.P.; DUTRUCH, L.; LOGUERCIO, L.L. Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**, v. 80, p. 35-42, 2012.

SHIVANNA, R.K.; RANGASWAMY, S.N. **Pollen Biology**. New Delhi: Laboratory Manual, 1992. p.23-31.

SILVA, A.V.C.; YAGUIU, P.; ALMEIDA, C.S.; FEITOSA, R.B. **Caracterização físico-química de jenipapo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 4 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado técnico, 99)

SILVA A.V.C.; LEDO, A.S.; MELO, M.F.V. Jenipapeiro (*Genipa americana* L.). In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; GERMAIN, F.; PAREVN, C. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018. p. 169-176.

SILVEIRA JÚNIOR, C. E. A.; SABA, M. D.; JARDIM, J. G. Pollen morphology of Rubiaceae Juss. species occurring in an area of caatinga (dryland) vegetation in Bahia State, Brazil. **Act. Bot. Bras**, v. 26, n. 2, p. 444-455, 2012.

SINIMBU NETO, F.A.; MARTINS, A.B.G. BARBOSA, J.C. Viabilidade “*in vitro*” de grãos de pólen de bacurizeiro - Clusiaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 593-600, 2011.

SIQUEIRA, D.L.; SANTOS, D.; SALOMÃO, L.C.C.; SILVA, F.F.; BARROS, Z.J. Micropropagação da bananeira ‘Maçã’, cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, v. 60, n. 6, p. 745-751, 2013.

SOARES, T.L.; SILVA, S.O.; COSTA, M.A.P.C.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, A.S.; LINO, L.S.M.; SOUZA, E.H.; JESUS, O.N. *In vitro* germination and viability of pollen

- grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p.111-118, 2008.
- SOUSA-LANG, V.A.; PINTO JUNIOR, J.E. Efeito da concentração de ágar na germinação *in vitro* do pólen de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. KTZE. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 34, p. 55-63, 1997.
- SOUSA, V.A. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 21, p. 15-19, 1990.
- SOUSA, V.A.; SCHEMBERG, E.A.; AGUIAR, A.V. Germinação *in vitro* do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 86, p.147-151, 2010.
- SOUZA, A.G.C.; SOUZA, N.R.; SILVA, S.E.L.; NUNES, C.D.M.; CANTO, A.C.; CRUZ, L.A. **Fruteiras da Amazônia**. Manaus: Embrapa-CPAA (Biblioteca Botânica Brasileira 1), 1996. 204 p.
- SOUZA, R.K.D.; MENDONÇA, A.C.A.M.; SILVA, M.A.P.S. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.1, p.140-156, 2013.
- SOUZA, C.N.; GASPARINO, E.C. Pollen morphology of *Fridericia* Mart. (Bignoniaceae) from Brazilian forest fragments. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, p. 83–94, 2014.
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: Biology, Biochemistry Management**. Springer-Verlag, Berlin and New York, 1974.
- THAKUR, D. R.; THAKUR, S. S. Pollen Morphology and Germination in Some Temperate Drupe Plants. **J. Palynol**, v. 6, p. 96-100, 1970.
- THAKUR, P.; KUMAR, S.; MALIK, J.A.; BERGER, J.D.; NAYYAR, H. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. **Environ. Exp. Bot.**, v. 67, p. 429–443, 2010.
- TIGHE, M.E. **Manual of collection and management of tropical and subtropical pinus pollen from natural stands**. 1. ed. CAMOCORE, Carolina do Norte, 2004. 20 p.
- TOWILL, L.E. Low temperature and freeze-/vacuum-drying preservation of pollen. *In*: KARTHA, K. K. ed. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. p. 171–198.
- TOWILL, L.E.; WALTERS, C. Cryopreservation of pollen. *In*: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Rome: IPGRI, 2000. p.115-129.
- UEDA, S.; IWAHASHI, Y. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p.1677-1680, 1991.
- VASILAKAKIS, M.; PORLINGIS, I. C. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. **HortScience**, v. 20, p. 733–735, 1985.

VERMOESEN, C. De fijnere structuur der stuifmeelkorrels en hunne systematische beteekenis bij de Angiospermen. **Natuurwetenschappelijk Tijdschrift**, v. 4, p. 1–12, 1922.

WANG, B.S.P. Tree seed and pollen storage for genetic conservation, possibilities and limitations. *In*: FAO. **The methodology of conservation of forest genetic resources**. Rome: FAO/UNEP, 1975. p. 93-103.

WITHERS, L A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa- SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 297-330.

YATES, I.; SPARKS, D. Three-year-old pecan pollen retains fertility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, p. 359–363, 1990.

4. MANUSCRIPT 1

IN VITRO VIABILITY OF GENIPAP POLLEN GRAINS IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Artigo publicado no periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira.

FREIRE, G.S.; ROCHA, L.B.; MACHADO, C.A.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S. *In vitro* pollen grain viability of genipap in different culture media. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 57: p. e03020, 2022. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2022.v57.03020>

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade *in vitro* do grão de pólen de jenipapeiro (*Genipa americana*) à temperatura ambiente, em diferentes meios de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x11 (meios de cultura x tempos de incubação), com quatro repetições. O número de grãos de pólen germinados foi analisado em intervalos de 24 horas até 288 horas após incubação em temperatura ambiente. O meio com 100 mg L⁻¹ de H₃BO₃, 80 g L⁻¹ de sacarose e 1,0 g L⁻¹ de ágar resulta em alta à média percentagem de germinação *in vitro*, sendo o mais adequado para estudos da viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de jenipapeiro.

Termos para indexação: *Genipa americana*, germinação *in vitro* de pólen, melhoramento de plantas, tubo polínico.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the viability of genipap (*Genipa americana*) pollen grain at room temperature in different culture media. The experimental design was completely randomized in a 3x11 factorial arrangement (culture media x incubation times) with four replicates. The number of germinated pollen grains was analyzed at 24-hour intervals up to 288 hours after incubation at room temperature. The culture medium with 100 mg L⁻¹ H₃BO₃, 80 g L⁻¹ sucrose, and 1.0 g L⁻¹ agar results in a higher to intermediate germination percentage, being the most suitable for studies on the *in vitro* viability of genipap pollen grains.

Index terms: *Genipa americana*, *in vitro* pollen germination, plant breeding, pollen tube.

4.1. Introduction

Genipap (*Genipa americana* L.), belonging to the Rubiaceae family, is a native and non-endemic species to Brazil, occurring in all five regions of the country (Gomes, 2022). This species was listed among the top ten native fruit trees with the greatest potential for immediate use in Brazil according to the “Plantas do Futuro” program, developed, in partnership, by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/World Bank/Global Environment Facility/Ministério do Meio Ambiente/Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (Coradin et al., 2018).

To guarantee the maintenance of genetic variability in a species, it is important to evaluate the viability of pollen, whose grains carry genetic material resulting from recombination, increasing the likelihood of the plants transmitting highly diverse genotypes to the next generation (Zortéa et al., 2022). Pollen viability can be determined by several methods, such as *in vitro* and *in vivo* pollen tube growth and histochemical staining using different dyes (Impe et al., 2020). Among the methods for testing pollen viability, *in vitro*

pollen germination is considered one of the most convenient and reliable as it indicates the ability of pollen grains to emit the pollen tube (Luo et al., 2020).

For *in vitro* germination, each species has specific requirements regarding the composition of the used culture medium due to genetic variations and pollen grain osmotic pressure (Lin et al., 2017). For satisfactory germination and tube growth, generally moisture, a carbohydrate source, boron, and calcium are required (Patel & Mankad, 2014).

In the case of genipap, further research is necessary, particularly related to floral biology, *ex situ* conservation, and cryopreservation for future *ex situ* conservation and pollination studies. In addition, up to date, there is no known information available on the *in vitro* pollen germination of the species.

The objective of this work was to evaluate the viability of genipap pollen grain at room temperature in different culture media.

4.2. Materials and Methods

For the experiment, 20 functional male flowers were collected from a natural population found in the municipality of Siriri, in the state of Sergipe, Brazil (10°60'30"S, 37°11'28"W), at the pre-anthesis stage, i.e., 24 hours before opening, between 9:00 and 10:00 a.m. After the pedicel was cut off, the flowers were conditioned in a tightly closed paper bag and maintained in expanded polystyrene boxes, which were taken to the Laboratory of Plant Tissue Culture of Embrapa Tabuleiros Costeiros, located in the municipality of Aracaju, in the same state. At the laboratory, fine-nose forceps were used to extract pollen grains from the anthers opened on aluminum foil.

To evaluate the effect of different culture media on *in vitro* germination, approximately 0.0005 g pollen grains were inoculated on 10x35 mm sterile petri dishes, containing 2.0 mL of the three following culture media: A, 200 mg L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 300 mg L⁻¹ Ca(NO₃)O₂.4H₂O, 100 mg L⁻¹ KNO₃, 100 mg L⁻¹ H₃BO₃, and 40 g L⁻¹ sucrose as in Lora et al. (2006); B, 100 g L⁻¹ sucrose and 3.0 g L⁻¹ agar according to Sousa et al. (2010); and C, 100 g L⁻¹ H₃BO₃, 80 g L⁻¹ sucrose, and 1.0 g L⁻¹ agar, following Sousa et al. (2010) with modifications by Moura et al. (2015). For this analysis, each culture medium was spread on 11 petri dishes with four compartments (separate counting fields) each and maintained in a biological incubator at 27±2°C. The number of germinated pollen grains was analyzed under a 10X microscope objective at 24-hour intervals up to 288 hours after incubation. The total number of pollen grains and number of pollen grains germinated in each compartment were counted under the microscope. To calculate the percentage of *in vitro* pollen grain germination, the following formula was used: *in vitro* pollen grain germination (%) = (number of pollen grains germinated / total number of counted pollen grains) x 100.

The experimental design was completely randomized in a 3x11 factorial arrangement (culture media x incubation times) with four replicates, each composed of one Petri dish with the four counting fields. For the statistical analysis, data of *in vitro* pollen grain (%) were analyzed by the analysis of variance using the F-test. For the qualitative factor (culture media), means were compared by Tukey's test, at 5% probability. For the quantitative factor (pollen grain incubation times), regression equations were estimated. All analyses were conducted using the SISVAR software (Ferreira, 2019).

4.3. Results and Discussion

In vitro pollen grain germination differed significantly by the F-test due to the interaction between different culture media and incubation times (Table 1). Despite this, all culture media showed favorable nutritional conditions for pollen tube development. From 192 to 288 hours of incubation, there was no significant difference in pollen germination among culture media B and C; the absence of boron and calcium in the former did not affect pollen tube emission. The exception was medium A, which showed a drastic reduction in germination percentage at 288 hours. Similar results were reported by Souza et al. (2021) for

pollen germination of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (Rubiaceae). Genotype variation in family Rubiaceae was observed by comparing the results obtained for pollen grains of its species with those of others that also require boron and calcium for *in vitro* pollen grain germination, such as Acauã coffee (Angelo, 2015), *Hamelia patens* Jacq. (Verma et al., 2017), and *Ixora coccinea* L. (Phanomchai et al., 2021).

Table 1: *In vitro* pollen grain germination of genipap (*Genipa americana*) at room temperature ($27\pm 2^\circ\text{C}$) as a function of culture media and incubation time at 24-hour intervals up to 288 hours after incubation⁽¹⁾.

| <i>In vitro</i> pollen germination (%) | Culture media ⁽²⁾ | | |
|--|--|--|---|
| | A | B | C |
| 24 | 52.19 B | 85.88 A | 89.24 A |
| 48 | 95.48 A | 76.49 B | 87.64 AB |
| 72 | 92.46 A | 83.30 A | 81.74 A |
| 120 | 96.91 A | 86.60 AB | 71.75 B |
| 144 | 72.79 A | 82.40 A | 53.51 B |
| 168 | 76.64 A | 55.57 B | 67.99 AB |
| 192 | 75.36 A | 69.96 A | 69.24 A |
| 216 | 77.77 A | 70.94 A | 70.55 A |
| 240 | 70.10 A | 60.89 A | 73.04 A |
| 264 | 52.56 A | 42.94 A | 59.02 A |
| 288 | 20.04 B | 54.97 A | 56.60 A |
| RE | $Y = -0.002^{**}x^2 + 0.559^{**}x + 56.04^{**}; R^2 = 0.737$ | $Y = 0.15^{**}x - 91.66^{**}; R^2 = 0.673$ | $Y = -0.000011x^3 + 0.00052^{**}x^2 - 0.084^{**}x + 111.75^{**}; R^2 = 0.652$ |
| VC (%) | 12.88 | | |

⁽¹⁾Means followed by equal letters, in the lines, differ from each other by Tukey's test, at 5% probability. ⁽²⁾Culture media A, B, and C according to Lora et al. (2006), Sousa et al. (2010), and Sousa et al. (2010) modified by Moura et al. (2015), respectively. CV, coefficient of variation. ** and *Significant by the regression coefficient at 1 and 5% probability, respectively.

For incubation times, medium A followed a quadratic model, with an optimal time and maximum germination of 139.75 hours and 95.10%, respectively. Medium B presented a negative linear regression, in which germination percentage decreased from 86.60 to 42.94%; however, it still showed a high to intermediate pollen viability. Culture medium C resulted in a cubic equation, exhibiting a high to intermediate pollen germination percentage, with constant viability values. Likewise, Souza et al. (2021) found pollen viability from 40 to 90% for different *C. canephora* genotypes.

4.4. Conclusion

The obtained results are indicative that medium C presented adequate nutritional conditions for pollen tube growth, being the most suitable for genipap *in vitro* pollen grain germination. The observed findings contribute towards genipap species conservation and genetic breeding programs.

4.5. References

ANGELO, P.C. da S. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de cafeeiro acauã para estimativa de viabilidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 9., 2015, Curitiba. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café, 2015. 6p.

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F.G.C. (Ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste. Brasília: MMA, 2018. (Série Biodiversidade, 51).

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs: Sisvar. *Brazilian Journal of Biometrics*, v.37, p.529-535, 2019. DOI: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

GOMES, M. Genipa. In: FLORA e Funga do Brasil. Available at:. Accessed on: Sept. 3 2022.

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, art.1588, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01588>.

LIN, Y.; WANG, Y.; IQBAL, A.; SHI, P.; LI, J.; YANG, Y.; LEI, X. Optimization of culture medium and temperature for the *in vitro* germination of oil palm pollen. *Scientia Horticulturae*, v.220, p.134-138, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.040>.

LORA, J.; PÉREZ DE OTEYZA, M.A.; FUENTETAJA, P.; HORMAZA, J.I. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Scientia Horticulturae*, v.108, p.91-94, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.12.003>.

LUO, S.; ZHANG, K.; ZHONG, W.-P.; CHEN, P.; FAN, X.-M.; YUAN, D.-Y. Optimization of *in vitro* pollen germination and pollen viability tests for *Castanea mollissima* and *Castanea henryi*. *Scientia Horticulturae*, v.271, art.109481, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109481>.

MOURA, C.R.F.; MACHADO, C. de A.; LÉDO, A. da S. *In vitro* germination and viability of pollen grain of coconut accessions. *Revista Ciência Agronômica*, v.46, p.421-427, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150022>.

PATEL, R.G.; MANKAD, A.U. *In vitro* pollen germination – a review. *International Journal of Science and Research*, v.3, p.304-307, 2014.

PHANOMCHAI, S.; BODHIPADMA, K.; NOICHINDA, S.; PUNNAKANTA, L.; LEUNG, D.W.M. Harvesting time and viability of *Ixora coccinea* ‘Dwarf red coccinea’ pollen. *Biotropica*, v.28, p.84-91, 2021. DOI: <https://doi.org/10.11598/btb.2021.28.1.1159>.

SOUSA, V.A. de; SCHEMBERG, E.A.; AGUIAR, A.V. Germinação *in vitro* do pólen de jervá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). *Scientia Forestalis*, v.8, p.147-151, 2010.

SOUZA, C.A. de; ROCHA, R.B.; SANTOS, M.R.A. dos; LOPES, T.A.; TEIXEIRA, A.L.; ESPINDULA, M.C. *In vitro* pollination and fluorescence microscopy for characterization of gametophytic self-incompatibility of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.21, e37692142, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332021v21n4a51>.

VERMA, K.; URFAN, M.; TIWARI, P. *In vitro* pollen germination, tube growth and pollen viability of some angiospermic taxa from Srinagar Valley (Garhwal Himalaya). *International Journal of Engineering Technology Science and Research*, v.4, p.345-353, 2017.

ZORTÉA, K.É.M.; ROSSI, A.A.B.; CORDEIRO, A.G.M.; SANDER, N.L.; CARDOSO, E. dos S.; SILVA, C.J. da. Pollen morphology, meiotic index and pollen viability in individuals of *Vochysia divergens* Pohl. native to the Amazon and the Pantanal. *Research, Society and Development*, v.11, e51511427540, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27540>.

5. MANUSCRIPT 2

VIABILITY AND CONSERVATION OF GENIPAP TREE POLLEN GRAINS

Artigo publicado no periódico *Caatinga*.

FREIRE, G. D. S.; MACHADO, C. D. A.; SILVA, A. V. D.; LEDO, A. D. S. Viability and conservation of genipap tree pollen grains. *Revista Caatinga*, 37, e12071, 2024. <https://doi.org/10.1590/1983-21252024v37i12071rc>

RESUMO

A conservação de recursos genéticos vegetais é vital para manter a diversidade para uso futuro. A conservação de grãos de pólen é uma das ferramentas complementares às estratégias convencionais de conservação, além de desempenhar um papel importante em programas de melhoramento. Considerando a importância do jenipapeiro e a escassez de trabalhos relacionados à biologia floral e conservação de pólen, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de armazenamento de grãos de pólen em diferentes condições de armazenamento. O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. A coleta de flores foi realizada na fase de pré-antese e após a extração, os grãos de pólen foram acondicionados em criotubos e mantidos nas seguintes temperaturas: 4°C, -20°C, -80°C e -196°C. As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento. Após 180 dias, as porcentagens de germinação do tubo polínico foram superiores a 60,00% em todas as temperaturas. A menor porcentagem foi observada em condição de armazenamento de 4°C com 60,21%. Sendo as demais temperaturas as mais indicadas para conservação *ex situ* de grãos de pólen.

Palavras-chave: Nitrogênio líquido. *Genipa americana* L. Germinação.

ABSTRACT

Conservation of plant genetic resources is vital for maintaining diversity for future use. The conservation of pollen grains is one of the tools complementary to conventional conservation strategies and plays an important role in breeding programs. Considering the importance of genipap trees and the lack of studies related to their floral biology and pollen conservation, the aim of this study was to evaluate the storage potential of pollen grains under different storage conditions. This study was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory of Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brazil. Flowers were collected in the preanthesis phase, and the pollen grains were placed in cryotubes and kept at different temperatures (i.e., 4°C, -20°C, -80°C, and -196°C) after extraction. Evaluations were performed after 30, 60, 90, 120, 150, and 180 days of storage. After 180 days, the germination percentage of the pollen tube was greater than 60.00% for all storage temperatures. The lowest percentage (60.21%) was observed under the storage condition of 4°C. Therefore, the other three temperatures are more highly recommended for *ex situ* conservation of pollen grains.

Keywords: Liquid nitrogen. *Genipa americana* L. Germination. Pollen tube.

5.1. Introduction

Genipa americana L., popularly known as jenipapeiro or the genipap tree in Brazil, is widely distributed from Mexico and the Antilles to northern Argentina. It has different popular names depending on the region of occurrence. In Brazil, its presence has been confirmed in all states of the Federation, except for Rio Grande do Sul, and in all biomes,

except Pampa (southern grasslands) (GOMES, 2023). All parts of the tree are used. The fruit is used as food for humans in natura and for making sweets, jams, juices, beverages, wine, and spirits. The liqueur is an important element in the June Festivals in the Northeast region of Brazil (SILVA; LEDO; SILVA JÚNIOR, 2020).

The species were listed among the ten native fruit-bearing plants with greatest potential for immediate use in Brazil by the “Plants of the Future” program, developed in a partnership between the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, World Bank, Global Environment Facility, Ministry of the Environment, and Project for Conservation and Sustainable Use of Brazilian Biological Diversity (SILVA; LEDO; MELO, 2018).

Diverse biotechnological techniques have been applied in the conservation of genetic resources. Most prominent among them are plant tissue culture-based *in vitro* conservation in the short and medium term and cryopreservation in the long term. Conservation or preservation of the genetic diversity of a plant is vital for maintaining its diversity for future use and plays an important role in breeding programs (WELEWANNI; JAYASEKERA; BANDUPRIYA, 2017).

Cryopreservation includes the conservation of plant material at an ultralow temperature provided by liquid nitrogen at -196°C , or by its vapor phase at -150°C (LEDO et al., 2020). The cryopreservation of pollen grains is often neglected. It is a safe and practical alternative for germplasm curators or plant breeders, conserving important alleles and overcoming reproductive difficulties, such as asynchrony of flowering and insufficient pollen production (SAHA et al., 2023). It is important to emphasize that cryopreservation of pollen grains is an important tool (DINATO et al., 2020). It has been successfully applied to diverse fruit-bearing species, such as coconut (*Cocos nucifera* L.) Ledo and Vendrame (2021), pineapple (*Ananas comosus* L.) Souza, Souza and Silva (2018), mango (*Mangifera indica* L.) Veena et al. (2019), sugar-apple (*Annona squamosa* L.) Chander, Rajasekharan and Kurian (2019), olives (*Olea europaea* L.) Petruccelli et al. (2021), date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Oliveira et al. (2023), and *Pisidium* sp. (VISHWAKARMA et al., 2021).

Applying plant tissue culture techniques is important for species such as genipap trees because they overcome the difficulties imposed by traditional propagation systems, allowing large-scale multiplication and conservation of this specie with good prospects for the future (SOUZA et al., 2016). *Ex-situ* conservation of the genetic resources of the species was carried out through germplasm banks in the field.

Given the importance of the genipap tree and the lack of studies related to floral biology and pollen conservation, the aim of this study was to evaluate pollen viability determined by *in vitro* germination and pollen grain staining of *G. americana* under different storage conditions and to perform histological analysis of pollen grains.

5.2. Material and Methods

5.2.1. Collecting and obtaining pollen grains

This study was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory (Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, LCTP) of Embrapa Tabuleiros Costeiros in the municipality of Aracaju, Sergipe, Brazil. The collection was made from an adult mother plant of the genipap tree in the municipality of Siriri, Sergipe, Brazil ($10^{\circ}60'30''$ S, $37^{\circ}11'28''$ W, and altitude of 230 m), an area with a mean annual rainfall of 1,479 mm and mean temperature of 24.8°C . Functionally masculine flowers in the pre-anthesis phase (24 hours before opening) were selected to obtain the pollen grains. With the aid of scissors sterilized in ethyl alcohol, the flowers were cut at their pedicel, placed in a closed paper bag, and then placed in expanded polystyrene boxes (Isopor). Pollen grains were extracted from anthers opened over aluminum foil using finepoint tweezers in the laboratory. After the extraction, the pollen grains were inserted in 2.0-mL cryotubes and kept under the following storage conditions: T1, refrigerator

(4°C); T2, freezer (-20°C); T3, ultrafreezer (-80°C); and T4, a drum with liquid nitrogen (-196°C).

5.2.2. Viability determined using acetocarmine staining

The samples were removed from the storage condition treatments, rehydrated for 2 hours, and placed on slides to evaluate the viability of pollen grains by staining under each storage condition. A drop of 1% acetocarmine was then added, followed by homogenization. The slide was then placed in a Petri dish (80 mm, Labomax Inc.) and incubated in a biological incubator at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 25-30 minutes. The slides (26 × 76 mm, Global Glass) were analyzed for the number of viable and non-viable pollen grains per quadrant using a microscope (model DMSL, Leica, Bernsheim, Germany) at 10x magnification and a digital camera (Moticam C2300 model, Motic Instruments, Hong Kong, China). The pollen grains with intact walls stained red by the reaction in the presence of enzyme activity were considered viable, while unstained or red-stained grains with ruptured walls were considered unviable.

5.2.3. Viability determined using *in vitro* germination

Samples (0.0005 g) were inoculated in Petri dishes containing 2 mL of the culture medium described by Lora et al. (2006) to determine viability by *in vitro* germination of the pollen tube as recommended by Freire et al. (2022). The Petri dishes (80 mm, Labomax Inc.) were kept in an incubator for 24 hours at a temperature of $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Petri dishes were analyzed for the number of pollen grains that germinated using a microscope (model DMSL, Leica, Bernsheim, Germany) at 10x magnification with a digital camera (model Moticam C2300, Motic Instruments, Hong Kong, China). Pollen grains were considered to have germinated when they had a pollen tube length two times greater than the diameter. Viability was evaluated by germination and acetocarmine staining after 30, 60, 90, 120, 150, and 180 days of storage.

5.2.4. Experimental design and statistical analyses

A completely randomized design was adopted in a 4×6 factorial arrangement (four storage conditions combined with six storage periods) with four replicates. Each replicate consisted of a Petri dish containing four counting fields. Analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the pollen grain viability data using the F-test at 5% significance. For qualitative factors (storage conditions), the mean values were compared using Tukey's test at 5% probability. The regression equations were fitted to the quantitative factor (storage time) using SISVAR.

In addition, viability was evaluated by germination 365 days after conservation, and the data from this evaluation were compared only with the data obtained at 180 days. Analysis of variance (ANOVA) alone was used for the storage conditions and storage time factors using the F-test at 5% significance. For this, a completely randomized design was adopted in a 2×4 factorial arrangement (two storage periods combined with four storage conditions) with four replicates. Each replicate was composed of a Petri dish with four count fields.

5.2.5. Histological analysis

The pollen grains used for histological analysis were stored for 60 days under the following storage conditions: T1, refrigerator (4°C); T2, freezer (-20°C); T3, ultra freezer (-80°C); and T4, drum with liquid nitrogen (-196°C). The pollen grains were fixed in 50% FAA for 72 hours, transferred to 70% ethanol, and dehydrated in a series of ethanol solutions of increasing concentrations (90% and 100%) at 2-hour intervals. They were infiltrated with an infiltration solution (Historesin kit, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) and polymerized in histomolds. Microtomes were prepared using the semiautomatic microtome (model YD335) with sections of 6- μm thickness that were then stained with toluidine blue at

pH 4.8 and observed under an optical microscope (Nikon Eclipse E100 connected to an Infinity 1 camera) where photomicrographs were taken.

5.3. Results and Discussion

5.3.1. Viability of genipap pollen grains determined by *in vitro* germination

A significant difference was observed for the interaction between storage conditions and storage time on genipap pollen grain viability, as determined by *in vitro* germination of the pollen tube, using the F-test ($p < 0.05$). After 180 days of storage under different conditions, the percentages of *in vitro* germination of pollen grains were higher than 60.00%, and the lowest percentage of germination of the pollen tube (60.21%) was observed at 4°C, with a severe decline in viability over time (Figure 1). However, no significant difference among the four storage conditions was observed when viability was analyzed after 120 days of storage. The *in vitro* germination test showed that the pollen grains were viable and formed pollen tubes (Figure 4).

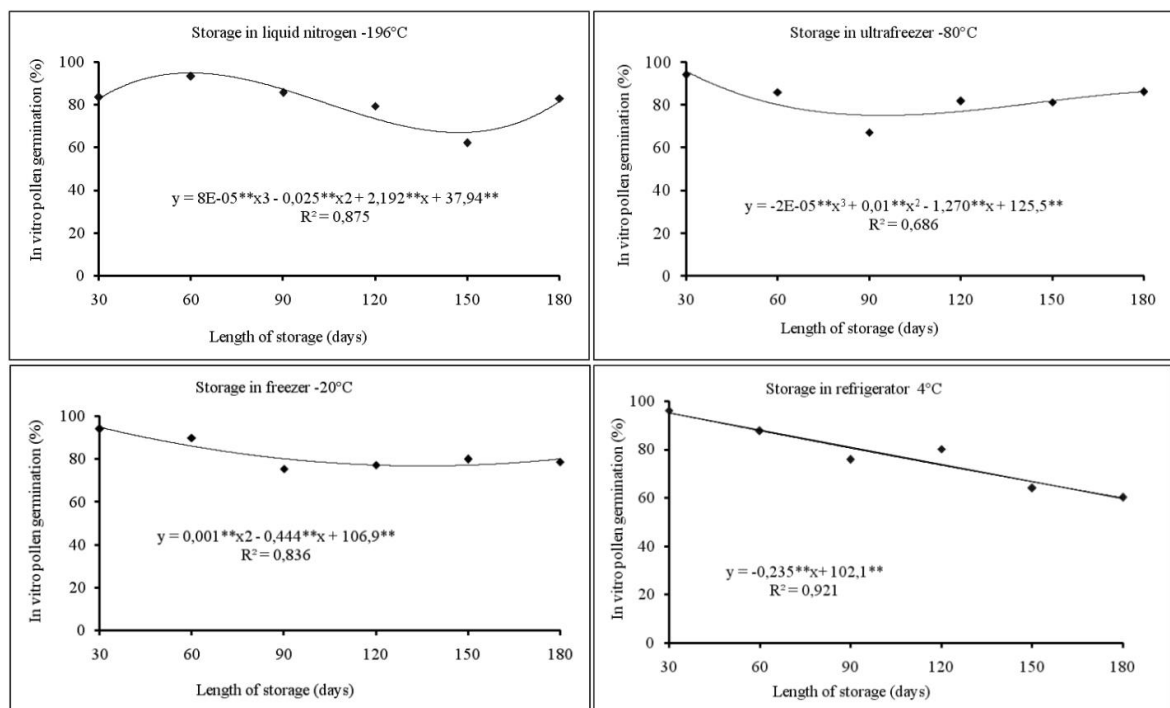


Figure 1. Viability response of genipap pollen grains at different storage conditions and length of storage (days) determined using *in vitro* germination.

According to Souza, Pereira and Martins (2002), values above 70% are high pollen viability, 31-69% are intermediate pollen viability, and up to 30% are low pollen viability. As shown in Table 1, the results indicated viability values ranging from intermediate to high up to 180 days under different storage conditions. Although *in vitro* germination of pollen grains enabled the experimental conditions to be controlled, it does not completely reproduce the *in vivo* growth of the pollen tube, where interactions with the stigma surface are more complex (NOVARA et al., 2017).

The success of pollen grain storage for long periods can contribute to an increase in *in vitro* pollination techniques and hybridization, facilitating transport and allowing storage so that plants of different ages or flowering times can be pollinated or hybridized (GIOVANNINI et al., 2017).

The pollen tubes showed low developed and were fragile after 90 days of storage at -20°C and -80°C. Germination was difficult to read because the genipap pollen grains had a translucent appearance. Good development was observed under the storage conditions and

conservation times. The fragility of the pollen tube may be related to its handling. According to Giovannini et al. (2017), pollen degradation during storage may be due to dehydration, which results in the loss of colloidal properties and may interfere with the development of the pollen tube.

Table 1. Mean values of viability of pollen grains (%) of the Siriri accession under different storage conditions determined using *in vitro* germination.

| Time (days) | -196°C | -80°C | -20°C | 4°C |
|-------------|----------|---------|----------|----------|
| 30 | 83.52 B | 94.30 A | 94.15 A | 96.20 A |
| 60 | 93.32 A | 86.07 B | 90.05 AB | 87.79 AB |
| 90 | 85.66 A | 67.11 C | 75.62 B | 75.97 B |
| 120 | 79.39 A | 81.94 A | 77.43 A | 80.27 A |
| 150 | 62.06 B | 81.36 A | 80.03 A | 64.07 B |
| 180 | 83.02 AB | 86.21 A | 78.87 B | 60.21 C |
| CV 1 (%): | 3.83 | | | |
| CV 2 (%): | 3.70 | | | |

Mean values followed by the same uppercase letters in the same row do not differ according to Tukey's test at 5% significance.

A comparison of the mean values of viability determined by germination at 180 and 365 days of conservation under different storage conditions showed that the storage conditions of -80°C and -196°C were more suitable (Figure 2). Once cryopreserved at the temperature of -196 °C, the pollen would theoretically have an infinite period of longevity. Thus, it could overcome the environmental specificities of the species, such as the problems of asynchronous flowering and early or late flowering of male plants (RAJASEKHARAN; GANESHAN, 2019; VISHWAKARMA et al., 2021). Dinato et al. (2020) reported an improvement in pollen viability after cryopreservation and emphasized the importance of this technique in breeding programs to prolong the length of the storage period in various seasons.

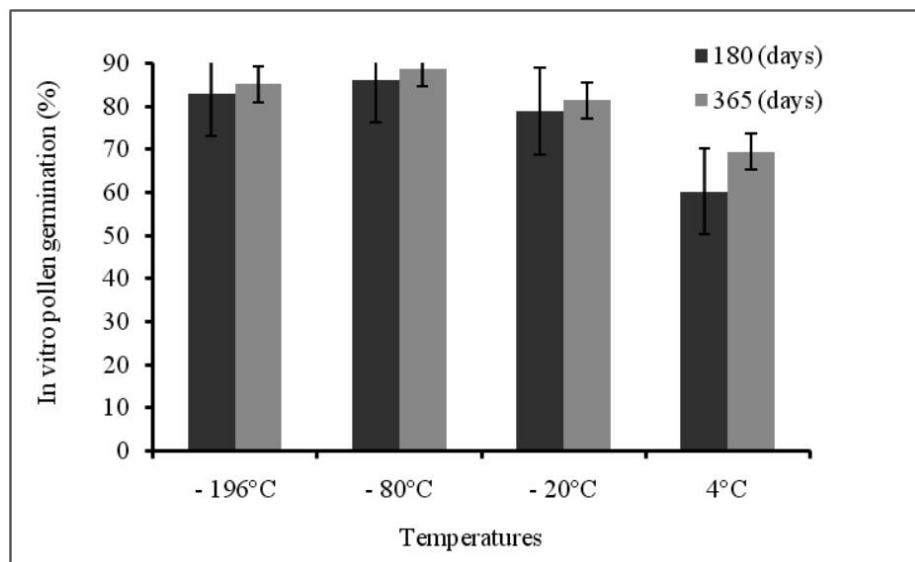


Figure 2. Viability of genipap (%) pollen grains after 180 and 365 days at different storage conditions determined using *in vitro* germination.

In relation to storage time, the highest percentages of *in vitro* germination of pollen grains for all the temperatures was detected at 365 days, and the storage condition with the lowest germination percentage was that of 4°C. Similar results were observed by Anushma et

al. (2018) with date palm pollen grains, with a reduction in the germination percentage as the storage temperature increased.

The reduction in pollen grain viability is likely caused by the methods of handling the pollen before storage, moisture in the pollen, temperature stability during the storage period, and starch concentration, which results in a reduction in the soluble sugar concentration (MEHAREB et al., 2017).

5.3.2. Viability of genipap pollen grains determined using acetocarmine staining

There was a significant difference in the F test ($p < 0.05$) for the interaction between storage conditions and time on the viability of genipap pollen grains, as determined using acetocarmine staining. The estimation of pollen viability by staining with 1% acetocarmine acid showed that all storage conditions studied led to viability greater than 88.00% after 180 days of storage (Figure 3).

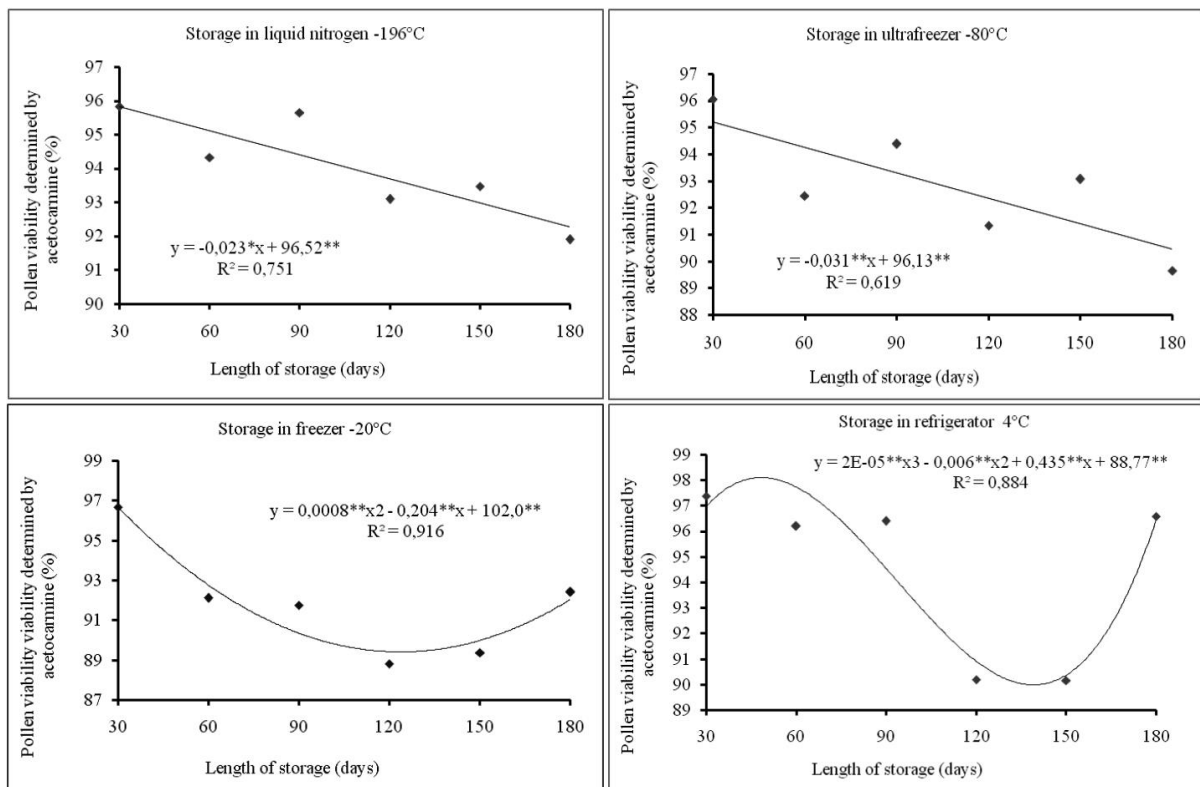


Figure 3. Viability response (%) determined by acetocarmine staining of genipap pollen grains under different storage conditions and lengths of storage (days).

Pollen viability is widely tested using staining because of the simplicity and speed of the procedure (Figure 4). However, this may over- or underestimate the results. Thus, it is fundamental to adopt different methods for determining pollen viability to obtain more accurate results. The viability test for *in vitro* germination is a reliable and widely used method (ALEXANDER, 2019).

The acetocarmine stain used in the present study indicated the presence of structural elements and integrity of the pollen grains. Therefore, it is used as an indicator of pollen viability by indicating chromosomal integrity, which is used for chromatin integrity observation and reacts with cell components present in mature pollen grains (RUZZA et al., 2023).

In a study conducted by Ruzza et al. (2023), the highest mean percentage of pollen viability in *G. americana* was obtained using acetocarmine staining, with 97.96% of the pollen grains showing chromatin integrity.

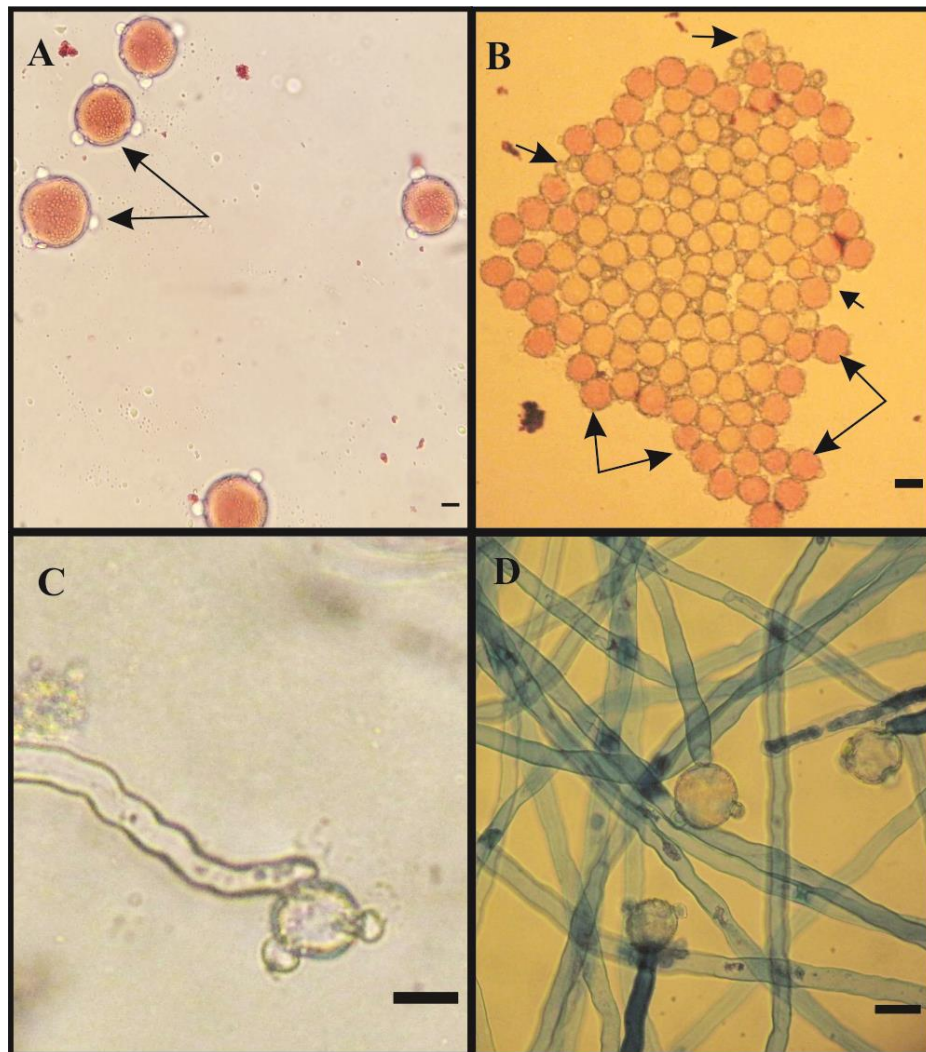


Figure 4. Viability test of pollen grains of *G. americana*, where A and B exhibit viability determined using 1% acetocarmine staining, and C and D exhibit viability determined using germination of the pollen tube. Symbols: A single arrow represents non-stained pollen, and a double arrow represents stained pollen.

5.3.3. Histological analysis

Some pollen grains showed a dark blue nucleus, generally located in the central region, and a pollenkit joined to the exine surface (Figure 5). Genipap pollen grains are medium-sized, tricolporate, and spherical, with a reticulate exine, and their shape is oblate and circular scope (MATOS et al., 2014). All species release their pollen grains in bicellular form, and the generative cell is spindle-shaped (CORTEZ et al., 2022).

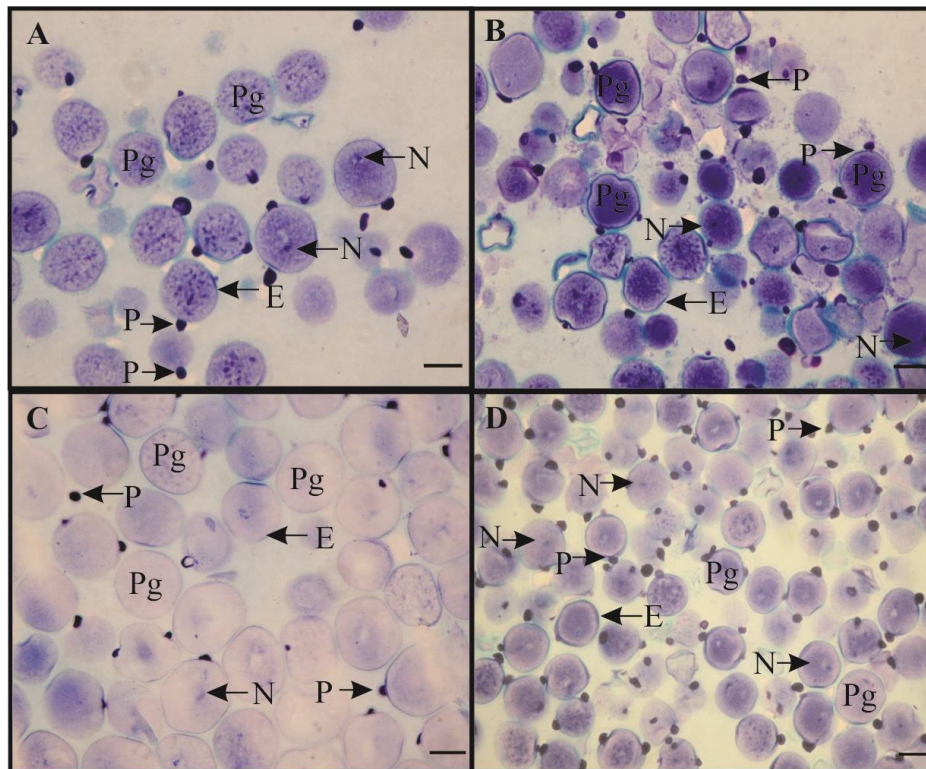


Figure 5. Histological analysis of the pollen grains of *G. americana* under different storage conditions. A in a refrigerator (4°C), B in a freezer (-20°C), C in an ultra freezer (-80°C), and D in a drum with liquid nitrogen (-196°C). N nucleus, E exine, Pg pollen grains, and P pollenkitt.

The morphology and structural characteristics of the pollen grains were similar under all four storage conditions. This may indicate that modifications in pollen structure did not occur even after conservation. Regarding the presence of pollenkitt in the pollen grain of *G. americana*, it is a structure present in most angiosperms; in most entomophilous species, it is always present with parietal or amoeboid tapetum, and it has important functions during dispersal of pollen grains, participating in adherence to the body of pollinators (DETTKE; SANTOS, 2011).

The results obtained indicate that the conservation of genipap pollen grains at different temperatures is promising for breeding, pollination, and hybridization studies. Pollen grains maintained excellent viability profiles after long-term storage at low temperatures for long periods.

5.4. Conclusion

These results indicate that conserving genipap pollen grains at lower temperatures is promising. The storage temperature of 4°C reduced pollen viability, determined using *in vitro* germination, over the storage period. Based on the histological analysis, it can be concluded that the morphology and structural characteristics of the pollen grains were very similar under all four storage conditions.

5.5. References

ALEXANDER, L. W. Optimizing pollen germination and pollen viability estimates for *Hydrangea macrophylla*, *Dichroa febrifuga*, and their hybrids. **Scientia Horticulturae**, 246: 44-250, 2019.

- ANUSHMA, P. L. et al. Pollen storage studies in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **International Journal of Chemical Studies**, 6: 2640-2642, 2018.
- CHANDER, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; KURIAN, R. M. Pollen storage studies in sugar apple (*Annona squamosa* L.) cv. Balanagar. **Israel Journal of Plant Sciences**, 66: 196-202, 2019.
- CORTEZ, P. A. et al. Microscopias de luz e eletrônica revelam detalhes desconhecidos da estrutura e fisiologia do grão de pólen de espécies do cerrado brasileiro. **Protoplasma**, 259: 399-412, 2022.
- DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 9: 48-74, 2011.
- DINATO, N. B. et al. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. **CryoLetters**, 41: 115-127, 2020.
- FREIRE, G. S. et al. *In vitro* pollen grain viability of genipap in different culture media. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 57: 1-4, 2022.
- GIOVANNINI, A. et al. Pollen grain preservation and fertility in valuable commercial rose cultivars. **Plants**, 6: 17, 2017.
- GOMES, M. **Genipa**. In: **FLORA e Funga do Brasil**. Disponível em: Acesso em: 23 mai. 2023.
- LEDO, A. S.; VENDRAME, W. A. Coconut Micropropagation and Cryopreservation. **Horticultural Reviews**, 48: 308-338, 2021.
- LEDO, A. S. et al. Cryopreservation of Brazilian green dwarf coconut plumules by droplet-vitrification. **Ciência Rural**, 50: 1-8, 2020.
- LORA, J. et al. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. **Scientia Horticulturae**, 108: 91-94, 2006.
- MATOS, M. et al. Caracterização polínica das plantas lenhosas do Bosque dos Papagaios, Boa Vista, Roraima, norte do Brasil. **Boletim do Museu Integrado de Roraima**, 8: 19- 41, 2014.
- MEHAREB, E. M. et al. Pollen storage as an alternative to sugarcane flowering synchronization. **Pakistan Sugar Journal**, 32: 11-18, 2017.
- NOVARA, C. et al. Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. **Scientia Horticulturae**, 214: 295-303, 2017.
- OLIVEIRA, A. C. A. et al. Methods for cryopreserving of date palm pollen. In: RAJASEKHARAN, P.; ROHINI, M. (Eds.). **Pollen cryopreservation protocols**. 1. ed. New York, US: Springer, 2023. v. 1, cap. 49, p. 519-525.

PETRUCCELLI, R. et al. Characterization and conservation of “Olivo della Strega”: an ancient olive tree, precious resource for natural and cultural heritage. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, 32: 311-324, 2021.

RAJASEKHARAN, P. E.; GANESHAN, S. Current perspectives on pollen cryopreservation in horticultural species, In III International Symposium on Plant Cryopreservation. **Acta Horticulturae**, 1234: 47-56, 2019.

RUZZA, D. A. C. et al. Palynology and meiotic behavior of *Genipa americana* L., a species native to the amazon. **Bioscience Journal**, 39: e39070, 2023.

SAHA, K. et al. Cryopreservation of Pollen Grains of Hot Pepper. In: RAJASEKHARAN, P.; ROHINI, M. (Eds.). **Pollen cryopreservation protocols**. 1. ed. New York, US: Springer, 2023. v. 1, cap. 20, p. 253-261.

SILVA, A. V. C.; LEDO, A. S.; SILVA JÚNIOR, J. F. **Descritores para o jenipapeiro (*Genipa americana* L.)**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 57 p.

SILVA, A. V. C.; LEDO, A. S.; MELO, M. F. V. *Genipa americana* Jenipapo. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. 2. ed. Brasília, DF: MMA, 2018. v. 3, cap. 5, p. 169-176.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H.; SILVA, R. L. Cryopreservation of pollen grains of pineapple and other bromeliads. **Methods in Molecular Biology**, 1815: 279-288, 2018.

SOUZA, R. R. et al. Optimization of jenipapo *in vitro* seed germination process. **Ciência e Agrotecnologia**, 40: 658-664, 2016.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, 26: 1209-1217, 2002.

VEENA, G. L. et al. Pollen conservation and *in vitro* germination studies in 'Appemidi' mango. **Acta Horticulturae**, 1244: 39-42, 2019.

WELEWANNI, I.; JAYASEKERA, A.; BANDUPRIYA, D. Coconut cryopreservation: present status and future prospects. **Coconut Research and Development Journal**, 31: 41-61, 2017.

VISHWAKARMA, P. K. et al. Effect of cryopreservation on pollen viability, fertility and morphology of different *Psidium* species. **Cryobiology**, 98: 112-118, 2021.

6. MANUSCRIPT 3

IN VITRO VIABILITY OF POLLEN GRAINS FROM GENIPAP ACCESSIONS

Artigo publicado no periódico Scientia Plena

Freire, G. S.; Machado, C. A.; Silva, A. V. C.; Alves R. F.; Silva, A. S. In vitro viability of pollen grains from genipap accessions. **Scientia Plena**, v. 21, n. 1, 010202, 2025.

<https://doi.org/10.14808/sci.plena.2025.010202>

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* viability of pollen from genipap accessions at ambient temperature in different culture media. Pollen grains were collected at the Genipap Active Germplasm Bank (BAG Jenipapo) of Embrapa Tabuleiros Costeiros at the Jorge Sobral Experimental Field in the municipality of Nossa Senhora das Dores, Sergipe, Brazil. Three culture media were evaluated in combination with 11 evaluation times and 4 accessions. *In vitro* viability through germination of the pollen tube using acetocarmine was evaluated in accessions AR2, AR4, CA, and CR3 cultivated in: Lora, Sousa, and modified Sousa medium. A significant effect ($p \leq 0.05$) was observed among the interactions of the time after inoculation, culture media, and accession factors regarding pollen germination *in vitro*. The highest *in vitro* viability was obtained by accession CR3 in Lora culture medium at 96 h of incubation (86.56%). Regarding pollen viability using 1% acetocarmine, there was no significant difference in viability time for accessions AR2 and CR3. However, a significant difference was observed among the accessions after 168 h, with a decrease in viability for the AR4 accession, to 64.74%. The Lora culture medium is superior for *in vitro* viability studies of pollen grains by germination of the pollen tube in genipap accessions, and there is a genetic-dependent response for viability of pollen grains from genipap accessions.

Keywords: *Genipa americana* L., germination, pollen tube.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade polínica *in vitro* de acessos de jenipapeiro em temperatura ambiente em diferentes meios de cultura. A coleta dos grãos de pólen foi realizada no Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo (BAG Jenipapo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo Experimental Jorge Sobral, no município de Nossa Senhora das Dores, Sergipe. Foram avaliados três meios de cultura, combinados com 11 tempos de avaliação e 4 acessos. A viabilidade *in vitro* por meio da germinação do tubo polínico e com o uso do corante carmim acético foi avaliada nos acessos AR2, AR4, CA e CR3 em três meios de cultura: Lora, Sousa e Sousa modificado. Foi observado efeito significativo ($p \leq 0,05$) entre as interações dos fatores tempo após inoculação, meios de cultura e acessos quanto à germinação de pólen *in vitro*. A maior viabilidade *in vitro* foi obtida pelo acesso CR3 em meio de cultura Lora por 96h de incubação (86,56%). Quanto à viabilidade polínica por corante carmim acético 1%, não houve diferença significativa do tempo de viabilidade *in vitro* para os acessos AR2 e CR3. No entanto, após 168 horas foi observada diferença significativa entre os acessos, com decréscimo da viabilidade para o acesso AR4 com 64,74%. Pode-se concluir que o meio de cultura de Lora é superior para estudos de viabilidade *in vitro* de grãos de pólen por germinação do tubo polínico em acessos de jenipapeiro e que existe resposta genético-dependente para a viabilidade de grãos de pólen de acessos de jenipapeiro.

Palavras-Chave: *Genipa americana* L., germinação, tubo polínico.

6.1. Introduction

Genipa americana L. is a native species not endemic to Brazil of the Rubiaceae family, originating from the north of South America and widely distributed in South and Central America [1]. It is present in nearly all of Brazilian territory and in all the biomes, except for the Pampas [2].

The genipap tree is of significant economic importance; however, expansion of the agricultural frontier and other factors have led to loss of individuals, which can generate genetic erosion, changes in distribution patterns, and even extinction, making it necessary to conserve the species *ex situ* and *in situ* [3, 4].

The main bioactive compound of the genipap fruit, called jenipapo, is genipin, a powerful natural blue dye with polar characteristics that, in addition to being a colorant, has antioxidant, anticarcinogenic, and neuroprotective activity; and it acts against liver diseases [5]. The fruit is also a source of non-polar compounds, such as fatty acids, though extraction of these compounds has not yet been examined [6]. Genipap has been used more expressively in making jellies, jams, preserves, liqueurs, and wines; the fruit has been collected in an extractive manner from natural populations and has contributed to the family income of rural and riverside populations [7].

Advances in propagation and promotion of the species are important for conservation and plant breeding programs. Plant tissue culture techniques have been successfully applied to the propagation and conservation of the genipap tree [8, 9, 4, 10, 11]. Advances in propagation and promotion of the species are important for conservation and plant breeding programs. However, few studies have been conducted on the *in vitro* viability and conservation of pollen grains. Cryopreservation of pollen grains is an important strategy for conservation and directed crosses [12]. Pollen viability tests are also performed to identify a suitable culture medium for pollen germination of each species. A study was carried out on pollen viability of genipap by Freire et al. (2022) [13]. The results obtained previously were used to conduct the present study.

Cryopreservation consists of conservation at an ultralow temperature provided by liquid nitrogen at -196 °C, or by its vapor phase at -150 °C. It is considered a safe and practical alternative for germplasm curators or plant breeders, conserving important alleles and overcoming reproductive difficulties, such as asynchronous flowering and insufficient pollen production [14]. *In vitro* pollen conservation is a strategy that complements germplasm conservation in the field or seed bank, and it has been successfully applied to diverse fruit-bearing species, such as coconut (*Cocos nucifera* L.) [15]; pineapple (*Ananas comosus* L.) [16, 17]; mango (*Mangifera indica* L.) [18]; sugar apple (*Annona squamosa* L.) [19]; olive (*Olea europaea* L.) [20]; date palm (*Phoenix dactylifera* L.) [21]; and *Psidium* sp., [22].

Considering the *in vitro* conservation of pollen grains, some factors must be kept in mind to obtain efficient protocols, considering the high specificity of the germination response to the culture media. It is essential to define culture media for each species and for genotypes within the same species [23]. The culture medium should be composed of organic and inorganic elements that most nearly reproduce the conditions offered by the female flower structure upon receiving the pollen grain, and these conditions may differ from may differ between species [17]. The genotype factor has been considered for *in vitro* responses.

Successful pollen storage for genetic resources conservation depends on the many factors, and it is essential that the chosen procedure maintain high genetic integrity and diversity, vigor, and germination percentages [13]. Thus, the aim of the present study was to evaluate pollen viability by *in vitro* pollen tube germination and by staining of different genipap accessions at ambient temperature over time in different culture media and *in vitro* culturing time.

6.2. Materials and Methods

The study was conducted in the Plant Tissue Culture Laboratory of Embrapa Tabuleiros Costeiros at Aracaju, Sergipe, Brazil. Functionally male flowers were collected in pre-anthesis (24 h before opening) between 9:00 and 10:00 a.m. in four accessions of the Genipap Active Germplasm Bank (BAG Jenipapo) of Embrapa Tabuleiros Costeiros. Plants were chosen from the following accessions: Lagarto/Silo (CR3), Caueira (CA), Arauá 2 (AR2), and Arauá 4 (AR4).

6.2.1. Viability of pollen grains from genipap accessions by *in vitro* germination of the pollen tube

For these analyses, functionally male flowers were cut at their pedicel using a scissors sterilized in ethanol; they were placed and sealed in paper bags and stored in expanded polystyrene (Isopor®) boxes. In the laboratory, fine point tweezers were used to extract pollen grains from the anthers opened over aluminum foil. After that procedure, the pollen grains were kept in a biological incubator at a temperature of 30 ± 1 °C.

To evaluate the effect of different culture media on *in vitro* germination of the pollen tube, approximately 0,0005 g of pollen grains were inoculated in 35-mm-diameter sterile disposable Petri dishes containing 2 mL of the culture media shown in Table 1.

Table 1: Composition of the culture media tested for *in vitro* germination of pollen grains from different accessions.

| Culture medium | Composition |
|--|---|
| Medium A - Lora et al. (2006) [24] | 200 mg L ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O; 300 mg L ⁻¹ Ca (NO ₃) O ₂ .4H ₂ O; 100 mg L ⁻¹ KNO ₃ ; 100 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ ; 40 g L ⁻¹ sucrose |
| Medium B - Sousa et al. (2010) [25] | 100 g L ⁻¹ sucrose; 3 g L ⁻¹ agar |
| Medium C - Sousa et al. (2010) [25] modified by Machado et al. (2014) [26] | 80 g L ⁻¹ sucrose; 1 g L ⁻¹ agar; 100 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ |

The number of germinated pollen grains was analyzed under a microscope 10X objective lens at 24-h intervals, up to 288 h after beginning incubation. Pollen grains were considered germinated when the pollen tube length was twice the diameter, according to the methodology suggested by Cook and Stanley [27]. For better visualization of the pollen tube and assistance in counting and photomicrography, the cultures were stained with Evans blue dye. The *in vitro* germination percentage was obtained by applying the following formula: *in vitro* germination of pollen grains (%) = (number of germinated pollen grains / total number of pollen grains) × 100.

6.2.2. Viability of pollen grains from genipap accessions by staining

For determination of viability by staining at ambient temperature, the pollen grain samples were collected as already described and placed in 2.0-mL cryotubes and kept at room temperature at 30 ± 1 °C up to the end of the experimental trial. The viability of the pollen grains was evaluated by 1% acetocarmine. The number of viable and inviable pollen grains per quadrant was analyzed under a microscope 20X objective lens at 24-h intervals up to 288 h, or until reaching values below 50-60%.

Samples of approximately 0.0005 g of pollen grains were arranged on glass slides (26 × 76 mm, Global Glass), and then a drop of 1% acetocarmine was added and homogenized. After that, the slides were placed in Petri dishes (80 mm, Labomax Inc.) and kept in a biological incubator for 25 to 30 min at a temperature of 30 ± 1 °C.

Pollen grains stained red (through reaction of the occurrence of enzyme activity) and with intact walls were considered to be viable, and those not stained red or stained red with ruptured walls were considered inviable [26]. The following formula was considered for

calculation of the percentage: viability of the pollen grains by staining (%) = (number of stained pollen grains / total number of pollen grains) \times 100.

6.2.3. Experimental designs and statistical analyses

The experimental design for *in vitro* viability by germination of the pollen tube was completely randomized in a $3 \times 4 \times 11$ triple factorial arrangement (three culture media \times four accessions \times eleven evaluation times) and four replications. Each replication consisted of a Petri dish with four counting fields.

The experimental design for viability by staining was completely randomized in a 4×10 double factorial arrangement (four accessions \times ten evaluation times) and four replications. Each replication consisted of a slide with four counting fields.

Analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the pollen grain viability data using the F-test at 5% significance. For qualitative factors (accession and culture medium), the mean values were compared using Tukey's test at 5% probability. The regression equations were fitted to the quantitative factor (*in vitro* culturing time), using the SISVAR statistical program [28].

6.3. Results and Discussion

6.3.1. Viability of pollen grains from genipap accessions by *in vitro* germination of the pollen tube

A significant effect was observed for the interactions of the accession and culture medium factors, the accession and *in vitro* culturing time factors, and the *in vitro* culturing time and culture medium factors for the pollen grain viability.

In the accession as a function of the *in vitro* culturing time interaction, the accession CR3 obtained better performance than the others up to 192 h of inoculation, with a value of 43%, the AR2 e CA accessions did not show a sudden reduction in their viability over time according to the adjusted regression equations (Figure 1). According to Souza et al. (2002) [29], values higher than 70% are considered high pollen viability; from 31% to 69%, intermediate viability; and up to 30%, low pollen viability. Accordingly, the accessions AR2, AR4, and CA exhibited intermediate and low viability, and the accession CR3, high to intermediate viability (Table 2). It can be considered that there were variations between the percentages of pollen viability in the genotypes evaluated, in which it was observed that the CR3 accession presented values higher than 39% of viability up to 264 hours after collection, the other genotypes presented lower values, providing evidence that the genotypes differ from each other (Table 2).

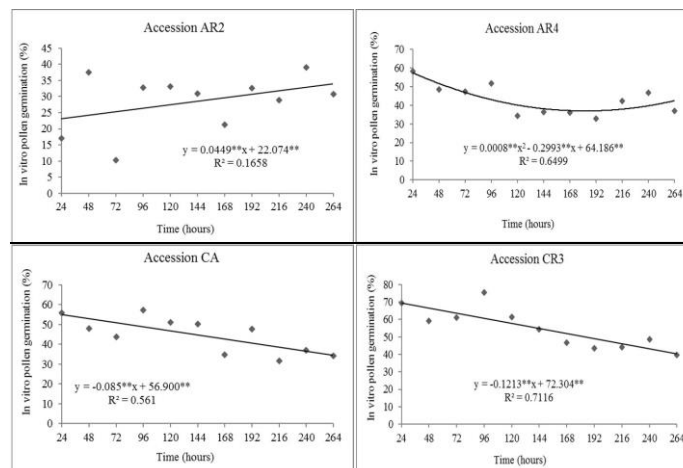


Figure 1: Viability response of genipap pollen grains at different accessions as a function of *in vitro* culturing time.

Table 2: *In vitro* viability of pollen grains by germination of the pollen tube (%) in different accessions of the Genipap BAG as a function of *in vitro* culturing time.

| Time (h) | Accessions | | | |
|----------|------------|----------|---------|---------|
| | AR2 | AR4 | CA | CR3 |
| 24 | 16.97 C | 58.41 B | 55.92 B | 69.41 A |
| 48 | 37.45 C | 48.39 B | 48.07 B | 59.20 A |
| 72 | 10.35 C | 47.31 B | 43.61 B | 61.10 A |
| 96 | 32.73 C | 51.72 B | 57.17 B | 75.34 A |
| 120 | 33.09 C | 34.43 C | 51.07 B | 61.23 A |
| 144 | 30.85 B | 36.47 B | 50.19 B | 54.32 A |
| 168 | 21.35 C | 36.07 B | 34.66 B | 46.79 A |
| 192 | 32.57 B | 32.86 B | 47.76 A | 43.44 A |
| 216 | 28.83 B | 42.31 A | 31.68 B | 44.14 A |
| 240 | 39.11 AB | 46.71 AB | 37.03 B | 48.57 A |
| 264 | 30.70 A | 37.11 A | 34.07 A | 39.72 A |

Mean values followed by the same uppercase letters in the same row do not differ according to Tukey's test at 5% significance ($p \geq 0.05$).

Considering the culture medium and accession interaction, the highest mean values of *in vitro* viability were found in culture medium A for the four accessions, with values greater than 62%, achieving high and medium viability (Table 3). The Lora culture medium [24] was likely superior through being more complete in relation to nutrients such as magnesium sulfate, calcium nitrate, potassium nitrate, and boric acid.

Table 3: Pollen viability (%) by *in vitro* germination of the pollen tube of genipap accessions as a function of the culture medium.

| Culture medium | Accessions | | | |
|----------------|------------|----------|----------|----------|
| | AR2 | AR4 | CA | CR3 |
| A | 64.83 Da | 74.17 Ca | 80.40 Ba | 91.70 Aa |
| B | 6.26 Cb | 11.71 Bc | 15.31 Bc | 23.68 Ac |
| C | 9.99 Cb | 34.87 Bb | 32.11 Bb | 42.46 Ab |

Mean values followed by the same lowercase letter in the column and uppercase letter in the row do not differ statistically from each other by Tukey's test ($p < 0.05$). Medium A - Lora et al. (2006) [24], Medium B - Sousa et al. (2010) [25], and Medium C - Sousa et al. (2010) [25] modified by Machado et al. (2014) [26].

In the B and C culture media, viability was intermediate and low in all the accessions. The B and C culture media are in gel form, a condition that may have created difficulties for germination of the pollen tube of the accessions. Selection of the culture medium depends on the physiological need of each species for development of the pollen tube. Use of the liquid medium brought about results superior to those of the gelled media. A similar result was observed by Zortéa et al. (2022) [30] in studies on *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) pollen grains. The authors found that the culture media with the addition of agar and boric

acid led to lower germination of the pollen tube. In contrast, Freire et al. (2022) [12], in their work on genipap pollen germination, observed that the best culture medium for pollen tube germination of Siriri accession was the medium of Sousa (2012) [25] modified by Machado et al. (2014) [26] with the addition of agar. This fact may be an indication that there are nutritional requirements for development not only among different species, but also among genotypes.

The CR3 accession stood out, showing greater viabilities of 91.70%, 23.68%, and 43.46% in the A, B, and C culture media, respectively (Table 3). Adhikari and Campbell (1998) [31] report that pollen grain viability is affected by genotypic differences and the physiological stage of the plant and of the flower. Although *in vitro* germination of pollen grains makes for a controlled experimental system, it does not fully reproduce the growth of the pollen tube *in vivo*, where interactions can occur between the compositions of the culture media and different plant genotypes [32].

In vitro germination of the pollen tube of the genipap is easily observed at microscope and use of Evans blue dye (Figure 2).

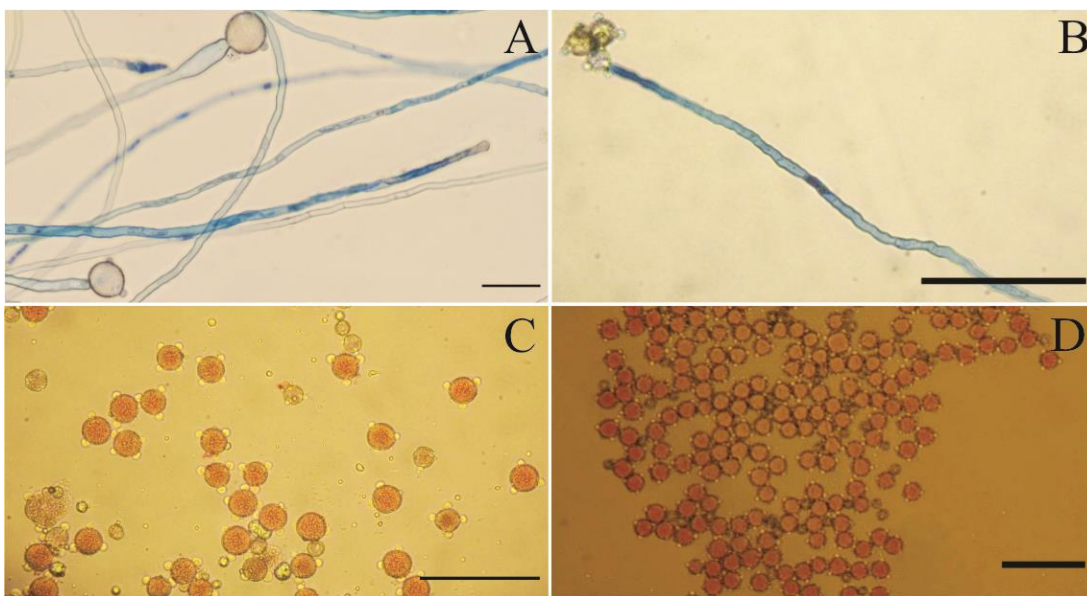


Figure 2: A and B: emergence of the pollen tube in the medium of Lora et al. (2006) [24] stained with Evans blue dye, and structures of the pollen tube and pollen grains; Figures C and D: pollen grains stained with carmine acetic 1%. Figures A, B, and C at 20X – bar = 50 μ m; Figure D at 10X – bar = 200 μ m.

There was significant interaction between culture media and *in vitro* culturing times (Table 4). The Lora medium (A) maintained high pollen viability throughout the evaluation time up to 264 h. This result may be related to the factors mentioned above, such as mineral and physical constitution of the medium.

Table 4: Pollen viability (%) by *in vitro* germination of the pollen tube of genipap accessions as a function of the culture medium and *in vitro* culturing time.

| Time (h) | Culture medium | | |
|----------|----------------|----------|----------|
| | Medium A | Medium B | Medium C |
| 24 | 65.63 A | 23.76 C | 57.39B |
| 48 | 66.82 A | 18.37 C | 53.35 B |
| 72 | 70.94 A | 16.92 C | 31.33 B |

| | | | |
|-----|---------|---------|---------|
| 96 | 86.56 A | 27.95 C | 43.82 B |
| 120 | 85.59 A | 7.62 C | 30.10 B |
| 144 | 82.71 A | 10.55 C | 24.51 B |
| 168 | 69.30 A | 10.14 C | 22.50 B |
| 192 | 82.69 A | 7.72 C | 21.61 B |
| 216 | 81.89 A | 10.92 B | 9.63 B |
| 240 | 86.53 A | 13.40 B | 15.75 B |
| 264 | 77.62 A | 8.22 B | 10.02 B |

Mean values followed by the same uppercase letters in the same row do not differ according to Tukey's test at 5% significance ($p \geq 0.05$). Medium A - Lora et al. (2006) [24], Medium B - Sousa et al. (2010) [25], and Medium C - Sousa et al. (2010) [25] modified by Machado et al. (2014) [26].

The viability by *in vitro* germination of genipap pollen grains showed quadratic variation for the culture media with a significant decrease for media B and C; however, germination in medium A remained high throughout the evaluation period (Figure 3). The highest viability by *in vitro* germination of the pollen tube obtained by the maximum point of the regression curve was 86.56 % at 96 hours after inoculation.

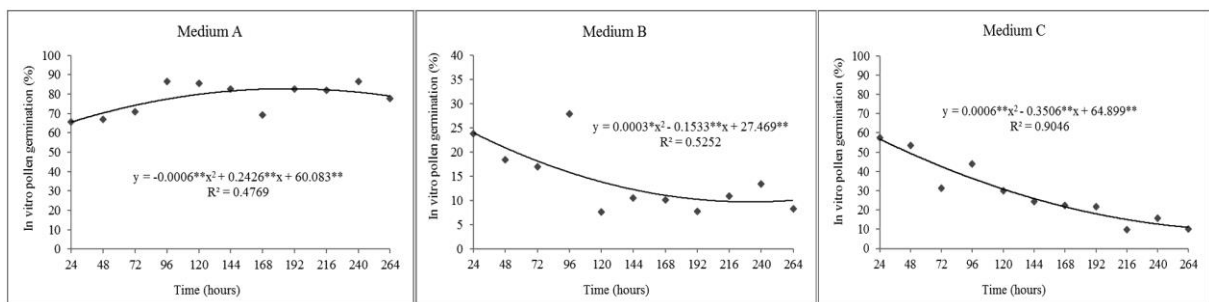


Figure 3: Response of viability by *in vitro* germination of genipap pollen grains as a function of the culture medium and *in vitro* cultivation time.

6.3.2. Viability of pollen grains from genipap accessions by staining

A significant effect was observed by the F test in the interactions of the accession and *in vitro* culturing time factors. There was no significant difference of *in vitro* culturing time for accessions AR2 and CR3. However, after 168 h, a significant difference was observed among the accessions, with a decline in viability for the accession AR4 (Table 5).

There was a significant effect of *in vitro* culturing time and accessions interaction by germination of the pollen tube and by staining in carmine acetic 1% at ambient temperature. Viability by *in vitro* germination showed a decline in comparison with viability by staining with carmine acetic 1% (Tables 2 and 5).

Analyses of pollen viability by staining should not be used in an isolated manner, because they indicate the presence of cell content, which does not necessarily imply formation of the pollen tube and later fertilization (Figure 1). *In vitro* tests of germination of the pollen tube are necessary to confirm this viability more reliably [33].

Table 5: Pollen viability (%) by carmine acetic 1% of genipap accessions as a function *in vitro* culturing time.

| Time (h) | Accessions | | | |
|----------|------------|------------|------------|-----------|
| | AR2 | AR4 | CA | CR3 |
| 0 | 95.92 Aa | 98.10 Aab | 95.48 Aab | 96.00 Aa |
| 24 | 97.94 Aa | 93.66 Aabc | 96.52 Aab | 95.30 Aa |
| 48 | 97.36 Aa | 95.46 Aabc | 96.79 Aab | 96.22 Aa |
| 72 | 98.36 Aa | 97.18 Aab | 96.22 Aab | 97.56 Aa |
| 96 | 99.23 Aa | 93.01Babc | 100.00 Aa | 97.32 ABa |
| 120 | 95.37 Aa | 98.26 Aa | 94.17 Aab | 95.73 Aa |
| 144 | 98.50 Aa | 96.12 Aab | 99.60 Aa | 97.79 Aa |
| 168 | 96.52 ABa | 91.35 Bbc | 96.34 ABab | 97.27 Aa |
| 192 | 98.52 ABa | 89.01 Cc | 93.45 BCab | 100.00 Aa |
| 216 | 96.68 ABa | 64.74 Cd | 91.28 Bb | 96.88 Aa |

Mean values followed by the same lowercase letter in the column and uppercase letter in the row do not differ from each other by Tukey's test ($p \geq 0.05$).

Several authors report obtaining overestimates of pollen grain viability by staining in comparison with *in vitro* germination in various species [25, 34, 35, 23, 36].

Determination of pollen viability by staining and by germination of the pollen tube is fundamental for fertilization and assists in identification of the best male parents to maximize establishment of crosses and breeding programs [37]. Information on the viability and development of pollen grains in different accessions are fundamental for studies on reproductive biology and plant breeding, increasing the chances of success in controlled crosses, as well as assisting in identification of more promising crosses for use in hybridization programs [34, 38, 39, 23].

According to Ferreira et al. (2021) [23], germination of pollen in a culture medium is still the main technique used to determine viability, and it may provide results like those that will likely occur *in vivo*. However, as time proceeds, viability of the pollen grain declines and, consequently, its efficiency in fertilization.

6.4. Conclusions

The Lora culture medium is superior for *in vitro* pollen grain viability studies of genipap accessions as it presents nutritional requirements for maintaining the pollen tube germination up to 264 h. Furthermore, there is a genotype-dependent response to the viability of pollen grains from genipap accessions.

Through the viability analyses of genipap pollen grains in different accessions as a function of the *in vitro* cultivation time, it was observed that the pollen grains of genipap accessions lost viability 264 hours after collection and storage at room temperature.

It was possible to see through this study that the viability of pollen grains by staining method with carmine acetic 1% is overestimated.

6.5. References

1. Zappi DC, Filardi FLR., Leitman P, Souza VC, Walter, MTB, Pirani, JR., et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*. 2015 Oct-Dec;66(4):1085-13, doi: 10.1590/2175-7860201566411
2. Cardoso MN, Nascimento ALS, Oliveira LAR, Assunção DA, Machado CA, Oliveira ACA, et al. Research Article Genetic diversity in native *Genipa americana* (Rubiaceae)

- populations in Sergipe, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 2019 Feb;18(1):18119, doi: org/10.4238/gmr18119
3. Ruzza DAC, Bispo RB, Pedri, ECM, Martins KC, Zortéa KEM, Souza SAM, et al. Palynology and meiotic behavior of *Genipa americana* L., a species native to the Amazon. *Biosci. J.* 2023 May;39:e39070, doi.org/10.14393/BJ-v39n0a2023-62719
 4. Jesus AS, Sena Filho JG, Teodoro AV, Ardoso MN, Nascimento ALS, Ledo AS, et al. Conservation, utilization, genetic and chemodiversity of germplasm of genipap (*Genipa americana* L.) in Brazil. *Curr Trends Biomedical Eng & Biosci.* 2019 Mar;18(4):555995, doi: 10.19080/CTBEB.2019.18.555995
 5. Náthia-Neves G, Meireles MA. Genipap: a new perspective on natural colors for the food industry. *Food and Public Health.* 2018 Jan;8(1):21-33, doi.org/10.5923/j.fph.20180801.04
 6. Nathia-Neves G, Vardanega R, Hatami T, Meireles MAA. Process integration for recovering high added-value products from *Genipa americana* L.: Process optimization and economic evaluation. *J. Supercrit. Fluids.* 2020 May;164:104897, doi:10.1016/j.supflu.2020.104897
 7. Silva AVC, Ledo AS, Melo MFV, Jenipapeiro (*Genipa americana* L.); In: Coradin L, Camillo J, Germain F, Parevn C, editors. *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste.* Brasília (DF): MMA; 2018. p.169-76.
 8. Sá FP, Souza VFD, Silva AVC, Lédo AS. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. *Cienc. Rural.* 2015 Nov;45(11):1939-45, doi.org/10.1590/0103-8478cr20140579
 9. Sá FP, Ledo AS, Silva AVC, Amorim JAE, Pasqual M. *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. *Ciênc. Agrotec.* 2016 Mar-Apr;(40):155-63, doi.org/10.1590/1413-70542016402036015
 10. Nascimento CM, Oliveira LAR, Silva AVC, Castro EM, Ledo AS. Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. *Sci. Plena.* 2020 Feb;16(2):1-11, doi.org/10.14808/sci.plena.2020.020201
 11. Cardoso MN, Soares ANR, Oliveira LAR, Nascimento LHA, Ledo AS, SILVA, A.V.C. Physiological quality and tolerance of *Genipa americana* L. seed submitted to drying. *Sci. Plena.* 2022 Sep;18(9):1-11, doi: 10.14808/sci.plena.2022.090201
 12. Dinato NB, Santos IRI, Vigna BBZ, Paula AF, Fávero AP. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. *CryoLetters.* 2020 May-Jun;41(3):115-27
 13. Freire GS, Rocha LB, Machado CA, Silva AVC, Ledo AS. *In vitro* pollen grain viability of genipap in different culture media. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 2022 mar;57: e03020. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2022.v57.03020>
 14. Saha K, Rajasekharan PE, Madhavi K, Mathad RC. Cryopreservation of pollen grains of hot pepper. In: Rajasekharan P, Rohini M, editors. *Pollen cryopreservation protocols.* Springer Protocols Handbooks. Humana, New York (US); 2023. P. 253-61.

15. Ledo AS, Vendrame WA. Coconut micropropagation and cryopreservation. *Hortic. Rev.* 2021 Apr;48:308-38, doi.org/10.1002/9781119750802.ch6
16. Souza FVD, Souza EH, Silva RL. Cryopreservation of pollen grains of pineapple and other bromeliads. *Methods Mol Biol.* 2018 Jul;1815:279-88, doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4_19
17. Silva DF, Pio R, Nogueira PV, Silva PAO, Figueiredo AL. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. *Rev. Ciênc. Agron.* 2017 Apr-Jun;48(2):365-73, doi.org/10.5935/1806-6690.20170042
18. Veena GL, Rajasekharan PE, Dinesh MR, Sankaran M. Pollen conservation *and in vitro* germination studies in 'Appemidi' mango. *Acta Hortic.* 2017 Jul;1244:39-42, doi: 10.17660/ActaHortic.2019.1244.6
19. Chander S, Rajasekharan PE, Kurian RM. Pollen storage studies in sugar apple (*Annona squamosa* L.) cv. Balanagar. *Isr. J. Plant Sci.* 2019 Aug;66:196-202, doi: 10.1163/22238980-20191080
20. Petruccelli R., Giordano C, Salvatici MC, Beghè D, Rodolfi M, Fabbri A, et al. Characterization and conservation of “Olivo della Strega”: an ancient olive tree, precious resource for natural and cultural heritage. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali.* 2021 Apr;32:311–24, doi.org/10.1007/s12210-021-00989-z
21. Oliveira ACA, Ledo AS, Polek M, Krueger RR, Pastor A, Volk GM. Methods for cryopreserving of date palm pollen. In: Rajasekharan P, Rohini M, editors. *Pollen cryopreservation protocols*. 1ª ed. New York (US): springer; 2023, p. 519-25, doi.org/10.1007/978-1-0716-2843-0_49
22. Vishwakarma PK, Linta V, Vasugi C, Rajasekharan PE. Effect of cryopreservation on pollen viability, fertility and morphology of different *Psidium* species. *Cryobiology.* 2021 Feb;98:112-8, doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.017
23. Ferreira MS, Soares TL, Costa EMR, Silva RL, Jesus ON, Junghans TL, et al. Optimization of culture medium for the *in vitro* germination and histochemical analysis of *Passiflora* spp. pollen grains. *Sci. Hortic.* 2021 Oct;288:110298, doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110298
24. Lora MAJ, Oteyza P, Fuentetaja P, Hormaza JI. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill) pollen. *Sci. Hortic.* 2006 Mar;108(1):91-4. doi.org/10.1016/j.scienta.2005.12.003
25. Sousa VA, Schemberg EA, Aguiar AV. Germinação *in vitro* do pólen de jervá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). *Sci. For.* 2010 Jun;38(86):147-151
26. Machado CA, Moura CRF, Lemos EEPD, Ramos SRR, Ribeiro FE, Léo AS. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. *Acta Sci. Agron.* 2014 Apr-Jun;36(2):227-32, doi.org/10.4025/actasciagron.v36i2.17346
27. Cook SA, Stanley RG. Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. *Silvae Genet.* 1960 Sep;9:121-48.

28. Ferreira DF, Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs: Sisvar. Rev. Bras. Biom. 2019 Dec;37(4):529-35, doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450
29. Souza MM, Pereira TNS, Martins ER. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). Ciênc. Agrotec. 2002 Jan;26(6):1209-17.
30. Zortéa KÉM, Rossi AAB, Cordeiro AGM, Sander NL, Cardoso ES, Silva CJ. Pollen morphology, meiotic index and pollen viability in individuals of *Vochysia divergens* Pohl. native to the Amazon and the Pantanal. Res., Soc. Dev. 2022 Mar;11(4):1-17. doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27540
31. Adhikari KN, Campbell CG. *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. Euphytica. 1998 Jul;102: p.87-92. doi.org/10.1023/A:1018393425407
32. Soares TL, Jesus ON, Souza EH, Oliveira EJ. Reproductive biology and pollen-pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. Sci. Hortic. 2015 Dec;197(14):339-49. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.045
33. Araújo DCB, Chagas PC, Chagas EA, Moura EA, Oliveira RR, Taveira DL. et al.. Flower stages, germination and viability of pollen grains of *Annona squamosa* L. in tropical conditions. Acta Sci. Technol. 2021 Jun;43(1):e51013-e51013, 2021. doi.org/10.4025/actascitechnol.v43i1.51013
34. Alexander LW. Optimizing pollen germination and pollen viability estimates for *Hydrangea macrophylla*, *Dichroa febrifuga*, and their hybrids. Sci. Hortic. 2019 Feb;246(27):244–250. doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.008
35. Impe D, Reitz J, Köpnic C, Rolletschek H, Börner A, Senula A. et al. Assessment of pollen viability for wheat. Front Plant Sci. 2020 Jan;22(10):1588, 2020. doi.org/10.3389/fpls.2019.01588
36. Kadluczka D, Czernicka M, Sliwinska E, Bieniasz M, Maćkowska K, Kapczynska A, et al. Development and quality of pollen in *Lachenalia* cultivars with determination of genome size and chromosome number. Sci. Hortic. 2021 Feb;277:109842. doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109842
37. Sousa MB, Andrade LRBD, Souza EHD, Alves AAC, Oliveira EJ. Reproductive barriers in cassava: Factors and implications for genetic improvement. PloS one. 2021 Nov;16(11):e0260576. doi.org/10.1371/journal.pone.0260576
38. Luo S, Zhang K, Zhong WP, Chen P, Fan XM, Yuana DY. Optimization of *in vitro* pollen germination and pollen viability tests for *Castanea mollissima* and *Castanea henryi*. Sci. Hortic. 2020 Sep;271:109481. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109481
39. Silva DM, Zambon CR, Techio VH, Pio R. Floral characterization and pollen germination protocol for *Castanea crenata* Siebold & Zucc. S AFR J BOT. 2020 May;130:389–95. doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.027

7. MANUSCRIPT 4

LOW AND ULTRA-LOW TEMPERATURE STORAGE OF POLLEN GRAINS AND *IN VITRO* POLLINATION OF *Genipa americana* L. ACCESSIONS

Artigo submetido ao periódico *Scientia Agricola* (em análise).

ABSTRACT

Genipap has considerable economic potential because the fruit can be consumed fresh or in the form of sweets, preserves, and liqueurs. The aim of this study was to evaluate the effects of low and ultra-low temperatures and storage time on the *in vitro* pollen grain germination of *Genipa americana* (Rubiaceae) accessions (Araújo 2, AR2; Lagarto 5, CR5; Ilha Mem de Sá, MS; Caueira, CA). Functionally male flowers of the four genipap accessions were collected from the Genipap Active Germplasm Bank of Embrapa Tabuleiros Costeiros. The viability of pollen grains was evaluated using *in vitro* germination after storage at different temperatures (refrigerator, 4°C; freezer, -20°C; ultrafreezer, -80°C; liquid nitrogen, -196°C). The integrity of the morphological structures was examined using histological analysis. Monthly pollen viability was determined for up to 180 d of *in vitro* germination of the pollen tube under each storage condition. The CA and CR5 accessions showed a quadratic response as a function of storage time, with the highest estimated germination viabilities of 91.51% and 97.58% at 95.23 d and 117.3 d of conservation, respectively. The MS and AR2 accessions adjusted regressions are not presented. At 90 and 120 d, all conditions provided a viability greater than 84%. Histological analysis of pollen grains at room temperature and under different storage conditions indicated no changes in cell structural characteristics. Genipap pollen grains appear to benefit from storage and the four temperatures tested.

Keywords: genipap, pollination, conservation.

7.1. Introduction

The genipap tree (*Genipa americana* L., Rubiaceae) is a native species that is not endemic to Brazil. It is present in almost all Brazilian biomes except the Pampas (Cardoso et al., 2019; Ruzza et al., 2023; Gomes, 2024). It has considerable economic potential because the fruit can be consumed fresh or in the form of sweets, preserves, or liqueurs. All parts of the plant exhibit medicinal properties (Cardoso et al., 2020; Ruzza et al., 2023). This species is functionally dioecious (Ruzza et al., 2020) and pollinated by flies and bees (Bortoleti et al., 2018). Genipap seeds are dispersed by fish and mammals, such as tapirs (*Tapirus terrestris* L.) and red brocket deer (*Mazama* sp.) (Ruzza et al., 2020).

Natural genipap tree populations in different regions have been affected by human activity; therefore, *in situ* and *ex situ* conservation strategies are imperative. Plant tissue culture techniques have been increasingly used to conserve species in the long- and medium-term. This species has already shown promising results with *in vitro* propagation and acclimatization, encapsulation, dehydration, and cryoprotection, in the regenerative capacity of shoot apices, and long-term conservation of embryonic axes (Sá et al., 2015, 2016; Jesus et al., 2019; Nascimento et al., 2020; Cardoso et al., 2022).

There are no published works on the conservation of pollen grains from different genipap accessions. The first studies were published on the selection of culture media for the germination of pollen grains at room temperature (Freire et al., 2022) and conservation of accession Siriri at different temperatures (Freire et al., 2024). In the present study, the behavior of genotypes stored under different temperature conditions was evaluated on the basis of an exploratory investigation done previously by this research group. Storage of pollen

grains at low and ultralow temperatures is an important tool to complement field germplasm and seed banks (Dinato et al., 2020). Pollen storage is of practical importance in breeding species because it allows crosses between plants that do not flower simultaneously or that are geographically disparate (Walyaro and Van Der Vossen, 1977; Wolkis et al., 2024), considering that all species release their pollen grains in the bicellular stage, and the generative cell is fusiform (Cortez et al., 2022).

The aim of this study was to evaluate the effects of low and ultra-low temperatures and storage time on the *in vitro* pollen grain germination of *Genipa americana* (Rubiaceae) accessions.

7.2. Materials and Methods

7.2.1. *In vitro* pollen germination after storage

Plants of Arauá 2 (AR2), Lagarto 5 (CR5), Ilha Mem de Sá (MS), and Caueira (CA) accessions from the Genipap Active Germplasm Bank (Banco Ativo de Germoplasma - BAG Jenipapo) of Embrapa Tabuleiros Costeiros (10°28'03.54" S; 37°11'39.78" W) were selected for collection of functionally male flowers in the pre-anthesis stage (24 h before opening) between 09:00 and 10:00 a.m. With the aid of scissors sterilized in ethyl alcohol, the flowers were cut at their pedicel, placed in a closed paper bag, and then placed in expanded polystyrene boxes (Isopor). Pollen grains were extracted from anthers opened over aluminum foil using fine-point tweezers in the laboratory (Freire et al., 2024). After extraction, the pollen grains were inserted into 2.0-mL cryotubes and kept in a desiccator with silica as a hygroscopic substance for 24 h until the pollen dried. They were then kept under the following storage conditions: T1, refrigerator (4 °C); T2, freezer (-20 °C); T3, ultrafreezer (-80 °C); and T4, a drum with liquid nitrogen (-196 °C).

Monthly pollen viability was determined for up to 180 d of *in vitro* germination of the pollen tube under each storage condition. The pollen grain samples were rehydrated for 4 min at a water-bath temperature of 40 °C, as described in Jia et al. (2022). Pollen grain samples from each accession (0.0005 grams) were inoculated in Petri dishes containing 2 mL of the culture medium of Lora (2006) composed of 200 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 300 mg L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O; 100 mg L⁻¹ KNO₃; 100 mg L⁻¹ H₃BO₃; 40 g L⁻¹ sucrose and kept in a B.O.D. incubator for 24 h at a temperature of 30 ± 1 °C, as described by Freire et al. (2022). The number of germinated pollen grains in the Petri dishes was determined by microscopy (model DMSL, Leica, Bernsheim, Germany) at 10× magnification linked to a digital camera (model Moticam C2300, Motic Instruments, Hong Kong, China). Pollen grains were considered germinated when the pollen tube length was twice the diameter (Cook and Stanley, 1960).

7.2.2. Histological analyses

Histological analysis of fresh pollen grains was done after 90 d of storage under the different conditions. Pollen grains were fixed according to the methodology described by Oliveira et al. (2018), infiltrated using a HistoResin kit (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), and polymerized in histomolds. Microtomy was performed in a semiautomatic microtome (model YD335) with 6-µm thick sections, which were subsequently stained with toluidine blue (pH 4.8) and documented under an optical microscope (Nikon Eclipse E100 connected to an Infinity 1 camera). The integrity of pollen grains and the presence of pollen nuclei were analyzed.

7.2.3. Experimental design and statistical analyses

A completely randomized experimental design was used for the viability in the germination trial in a 4 × 4 × 6 factorial arrangement (four storage temperatures × four accessions × six storage times). Each Petri dish was divided into four quadrants (four

replicates) and the number of germinated and total pollen grains was counted. The germination percentage was calculated by counting at least 100 pollen grains per replicate, for a total of 400 pollen grains. Two drops of toluidine blue were added to the culture medium to improve the visualization of germinated pollen grains using a stereomicroscope.

Data were compared using Tukey's test at a 5% probability level for qualitative factors (accession and storage temperatures). Regression equations were estimated for the quantitative factor (storage time). All statistical calculations were performed using the Sisvar software (Ferreira, 2019).

7.3. Results

7.3.1. *In vitro* pollen grain germination after storage

The analysis of variance of *in vitro* pollen grain viability showed no differences ($p \geq 0.05$) in accessions, storage temperature, and storage time for pollen grain germination. Differences ($p < 0.05$) were observed in accession \times storage time, accession \times storage temperature, and storage time \times temperature interactions.

The CA and CR5 accessions showed a quadratic response in response to storage time, with the highest estimated germination viability of 91.51% and 97.58% at 95.23 d and 117.3 d of conservation, respectively. However, accession CR5 presented limitations in the development of the polinic tube, which was observed to weaken during evaluations throughout the storage period (Figure 1). The MS and AR2 accessions did not show regression adjustment or pronounced effects on pollen grain germination related to storage time (Figure 2).

Considering the storage time, the accessions presented mean pollen grain viability values of more than 80%, except for accession CA at 30 d and 180 d, CR5 at 30 d, and AR2 at 60 d (Table 1). The CA accession obtained a mean value of pollen grain viability above 80% under storage temperatures of 4 °C and -196 °C (Table 2). The lowest averages in this interaction were obtained at the ultra-low temperature (-196 °C) for the CA and AR2 accessions. For the 4 °C (refrigerator storage condition), all the accessions obtained averages lower than 90% viability. All accessions stored in the freezer (-20 °C) and in the ultra-freezer (-80 °C) exhibited averages higher than 80% (Table 2).

For the storage temperature and storage time interaction, the pollen grain viability at 4 °C, -20 °C, and -196 °C followed a quadratic model, with highest estimated germination viabilities of 85.71%, 94.90%, and 90.26% at 93.93 d, 107.53 d, and 128.89 d of storage time, respectively (Figure 3). The pollen grain viability at -80 °C storage time, obtained a positive linear response. Furthermore, at 90 and 120 d, pollen grain viability was high ($> 84\%$), and the storage temperatures did not differ from each other (Table 3).

7.3.2. Histological analyses

The morphology and structural characteristics were similar among the pollen grains of the accessions studied at different storage temperatures and room temperature of 28 ± 1 °C (Figure 4). The pollen grains of the genipap trees had an oblate spheroid shape with a small polar area. They had 3-colporate openings, with reticulate to microreticulate ornamentation, and were considered small to medium in size.

7.4. Discussion

Variations were observed in pollen germination percentages among the accessions evaluated, which may be due to the effect of the genotype. Miler and Wozny (2021) studied chrysanthemum [*Chrysanthemum* \times *morifolium* (Ramat.)] pollen grains; the success of pollen germination depended on the storage temperature and genotype, regardless of the storage time.

The differences observed in the current study indicate that there is variation between genotypes of the same species, as well as the growth conditions of the genetic materials, which exert a marked influence on the germination of pollen grains. Pollen grain storage plays a fundamental role in the preservation of germplasm, in supporting research using biological materials, and is widely recognized as one of the main strategies for genotype conservation (Moura et al., 2015).

The process of pollen viability loss is gradual, and it is impossible for researchers to determine the timeline of the decay of viability over the storage period. Pollen viability testing methods depend on many factors, such as enzymatic activity; cytoplasmic integrity; and physical conditions, such as temperature. These affect the content and plasmalemma membrane under test conditions, such as exposure to air (Dafni and Firmage, 2000).

Considering that pollen quality can be affected by genetic, environmental (temperature and humidity), and agronomic factors (Lin et al., 2017; Pereira et al., 2018), the incubation temperature plays an important role *in vitro* germination percentages. The effects of temperature on pollen performance are far-reaching and ostensibly affect the entire plant, thus determining its ontogeny (McKenna and Mulcahy, 1983; McKee and Richards, 1998). According to Zinn et al. (2010) and Hedhly (2011), prolonged exposure of pollen grains to low temperatures can alter the normal course of male gametophyte development, potentially altering reproductive capacity and reducing the number of pollen grains deposited on the stigma, as well as their viability, which inevitably leads to irregular and reduced seed yields. Mature pollen grains appear to be more tolerant to temperature stress than any other stage of development because of their low cytoplasmic water content, low metabolic activity, and carbohydrate content and dynamics (Hedhly, 2011; Rosbakh et al., 2018).

For the interaction between accessions at different storage times, the CR5 and AR2 accessions had a higher germination percentage after 180 d of storage than after 30 d of storage, indicating an increase in pollen viability after storage. This may indicate that the pollen reached maturity during the storage period. Similar results were observed by Machado et al. (2014), who evaluated storage time and found a substantial increase in viability after *in vitro* germination of pollen grains in coconuts (*Cocos nucifera* L.) after 30 d and 60 d of storage. Wang et al. (2015) observed pollen grains of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) at -86 °C maintained a germination rate consistently above 70% even after two years of storage. This corroborates the observations in the current study, in which accessions CR5 and AR2 showed a higher germination percentage of pollen grains at the end of the experimental analyses (180 d) than at the beginning of the evaluations (30 d of storage).

In relation to pollen grain viability and pollen tube development, Scorza and Sherman (1995) reported that the percentage of pollen grain germination viability was preserved at 50–80% and emphasized that well-developed pollen tubes were essential for successful pollination and crossings. In light of this, the CA, AR2, and MS accessions are recommended for fertilization during the pollination stages and for successful crossings. However, the CR5 accession showed limitations in pollen tube development and the pollen tubes proved to be fragile during storage.

Histological analysis indicated that the structural characteristics of the pollen grains remained unchanged at all evaluated temperatures, possibly because of the structural stability of the pollen grains even after the storage period. A similar result was observed by Edmonds (1984) with accessions of the genus, *Solanum* L., who found that pollen grain structures did not show marked morphological variations.

Ballesteros et al. (2020) reported that resistance to desiccation is a widely observed characteristic of pollen grains. The authors also reported that, after the drying process, there was a substantial reduction in metabolic activity, although some internal structures were able to preserve their original shapes. Some species are tolerant to pollen grain desiccation, whereas others are more sensitive (Towill, 2004). This is in line with the data obtained in the

histological analysis in the present study, as no changes in the structure of the pollen grains were detected, which may indicate that genipap pollen grains are resistant to desiccation.

The structures observed in the genipap pollen grains, such as the 3-colporate openings, reticulate to microreticulate ornamentation, and others described in the present study, corroborate information reported by Ruzza et al. (2023) in a study carried out with genipap pollen grains. Pollen grains are medium-sized, spherical, tricolporate, with reticulated exines, have a flattened shape, and a small polar area (Ruzza et al., 2023). However, differences in the structural characteristics of pollen grains can be observed within the same species, as they differ in ecological terms due to exposure at different times of day, varied environments, and contrasting conditions of temperature and relative humidity.

During pollen grain development in different species, the grains become morphologically, cytologically, and physiologically different (Pacini and Franchi, 2020). The number of cells per pollen grain in dispersion is extremely variable; in gymnosperms, it ranges from one to more than ten, but angiosperms always contain bi- or tricellular pollen (Pacini and Franchi, 2020).

The storage of pollen grains at these four temperatures shows promise for genipap trees. However, the most appropriate temperatures for *ex situ* conservation of the genipap pollen grains are -20 °C and -80 °C. Viability by *in vitro* germination of the pollen grains of the four accessions remained stable after 180 d of storage. However, accession CR5 presented problems in the structure of the pollen tube, with little development and fragility. Histological analysis indicated that the morphology and structural characteristics of the pollen grains were very similar among the four accessions and that there were no changes in the structural characteristics after the storage period.

7.5. References

- Ballesteros D, Pritchard HW, Walters CT. 2020. Dry architecture: Towards the understanding of the variation of longevity in desiccation-tolerant germplasm. *Seed Science Research* 30: 142–155. <https://doi.org/10.1017/S0960258520000239>
- Bortoleti KCA, Silva RLO, Araújo SS, Brasileiro-Vidal AC, Benko-Iseppon AM. 2018. Etnobotanical Retrospective and Features of the Multipurpose Plant *Genipa americana* L. (Rubiaceae). In: Martinez JL, Mñhoz-Acevedo A, Rai M. 1ed. *Ethnobotany: Application of Medicinal Plants*, CRC Press, p. 69-89.
- Cardoso MN, Nascimento ALS, Oliveira LAR, Assunção DA, Machado CA, Oliveira ACA, et al. 2019. Genetic diversity in native *Genipa americana* (Rubiaceae) populations in Sergipe, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 18: 18119. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr18119>
- Cardoso DR, Pinto LIF, Lima MA, Soares IF, Rocha FPS, Silva RA, et al. 2020. Potencial tecnológico e composição de Farinha de Jenipapo (*Genipa americana* L.) obtida por secagem em convecção. *Brazilian Journal of Development* 6: 33448-33467. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-050>
- Cardoso MN, Soares ANR, Oliveira LAR, Nascimento LHA, Ledo, AS, Silva AVC. 2022. Physiological quality and tolerance of *Genipa americana* L. seed submitted to drying. *Scientia Plena* 18: 1-11. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2022.090201>
- Cortez PA, Silva LNNS, Paschoalini GO, Albuquerque-Pinna, J, Sibinelli V, Melo-de-Pinna GFA. 2022. Light and electron microscopies reveal unknown details of the pollen grain structure and physiology from Brazilian Cerrado species. *Protoplasma* 259: 399-412. <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01671-9>

- Dafni A, Firmage D. 2000. Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222: 113–132. <https://doi.org/10.1007/bf00984098>
- Dinato NB, Santos IRI, Vigna BBZ, Paula AF, Fávero AP. 2020. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. *CryoLetters* 41: 115-127.
- Edmonds JM. 1984. Pollen morphology of *Solanum* L. section *Solanum*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 88: 237-251. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1984.tb01573.x>
- Ferreira, DF. 2019. Sisvar: Um sistema de análise estatística para delineamentos de efeitos fixos do tipo parcelas subdivididas. *Revista Brasileira de Biometria*, 37: 529-535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>
- Freire GS, Rocha LB, Machado CA, Silva AVC, Ledo AS. 2022. *In vitro* pollen grain viability of genipap in different culture media. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 57: e03020. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2022.v57.03020>
- Freire GS, Machado CA, Silva AVC, Ledo AS. 2024. Viability and conservation of genipap tree pollen grains. *Revista Caatinga* 37: e12071. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252024v37i12071rc>
- Gomes M. Genipa. In: *FLORA e Funga do Brasil*. Available at: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14044>>. Accessed on: Marc. 23 2024.
- Hedhly A. 2011. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany* 74: 9–16. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.03.016
- Jia W, Wang Y, Mi Z, Wang Z, He S, Kong D. 2022. Optimization of culture medium for *in vitro* germination and storage conditions of *Exochorda racemosa* pollen. *Frontiers in Plant Science* 13: 994214. doi: 10.3389/fpls.2022.994214
- Jesus AS, Filho JGS, Teodoro AV, Cardoso MN, Nascimento ALS, Ledo AS, et al. 2019. Conservation, Utilization, Genetic and Chemodiversity of Germplasm of Genipap (*Genipa americana* L.) in Brazil. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences* 18: 555995-555995.
- Lin Y, Wang Y, Iqbal A, Shi P, Li J, Yang Y, et al. 2017. Optimization of culture medium and temperature for the *in vitro* germination of oil palm pollen. *Scientia Horticulturae* 220: 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.040>
- Lora MAJ, Oteyza P, Fuentetaja P, Hormaza JI. 2006. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill) pollen. *Scientia Horticulturae* 1: 91-94. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.12.003>
- Machado CA, Moura CRF, Lemos EEPD, Ramos SRR, Ribeiro FE, Léo AS. 2014. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. *Acta Scientiarum Agronomy* 36: 227-232. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i2.17346>
- McKee J, Richards AJ. 1998. The effect of temperature on reproduction in five *Primula* species. *Annals of Botany* 82: 359–374. doi: 10.1006/anbo.1998.0697

McKenna MA, Mulcahy DL. 1983. Ecological aspects of gametophytic competition in *Dianthus chinensis*, in *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*, eds Mulcahy DL, Ottaviano E, (New York, NY: Elsevier Science Publishing Company), p.419–424

Miler N, Wozny A. 2021. Effect of pollen genotype, temperature and period of storage on *in vitro* germinability and *in vivo* seed set in chrysanthemum – preliminary study. *Agronomy* 11: 2395. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122395>

Moura CRF, Machado CDA, Léo AS. 2015. *In vitro* germination and viability of pollen grain of coconut accessions. *Revista Ciência Agronômica* 46: 421-427. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150022>

Nascimento CM, Oliveira LAR, Silva AVC, Castro EM, Ledo AS. 2020. Long term conservation of embryonic axes of genipap accessions. *Scientia Plena* 16: 1-11. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.020201>

Oliveira LAR, Oliviera ACA, Machado CDA, Cardoso MN, Santana FV, Miranda ICD, et al. 2018. Induction, growth kinetics and morpho-histological characterization of neem callus. *Journal of Agricultural Science* 10: 283-290. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n6p283>

Pacini E, Franchi GG. 2020. Pollen biodiversity - Why are pollen grains different despite having the same function? A review. *Botanical Journal of the Linnean Society* 193: 141–164. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa014>

Pereira MR, Ribeiro H, Cunha M, Abreu I. 2018. Comparison of pollen quality in *Vitis vinifera* L. cultivars. *Scientia Horticulturae* 227: 112-116. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.038>

Rosbakh S, Pacini E, Nepi M, Poschlod P. 2018. An unexplored side of regeneration niche: Seed quantity and quality are determined by the effect of temperature on pollen performance. *Frontiers in Plant Science* 9: 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01036>

Ruzza DAC, Rossi AAB, Fernandes JM, Pedri ECM, Tiago ECM, Bispo RB, et al. 2020. Etnobotânica do jenipapo (*Genipa americana* L., Rubiaceae) entre agricultores no município de Carlinda, Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal of Development* 6: 61161-61184. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-509>

Ruzza DAC, Bispo RB, Pedri ECM, Martins KC, Zortéa KEM, Souza SAM, et al. 2023. Palynology and meiotic behavior of *Genipa americana* L., a species native to the Amazon. *Bioscience Journal* 39: e39070. <https://doi.org/10.14393/BJ-v39n0a2023-62719>

Sá FP, Souza VFD, Silva AVC, Léo SA. 2015. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. *Ciência Rural* 45: 1939-1945. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140579>

Sá FP, Ledo AS, Silva AVC, Amorim JAE, Pasqual M. 2016. *In vitro* propagation and acclimatization of *genipapo* accessions. *Ciência e Agrotecnologia* 40: 155-163. <https://doi.org/10.1590/1413-70542016402036015>

Scorza R, Sherman WB. 1995. Peaches. p. 325-440. In: Janik J, Moore JN. eds. *Fruit breeding*. John & Sons, New York, USA.

Towill LE. 2004. Pollen Storage as a Conservation Tool In: Guerrant EO, Havens K, Maunder M, eds. *Ex Situ Plant Conservation; Supporting Species Survival in the Wild*. Washington D.C.: Island Press, 180–188.

Walyaro DJ, Van Der Vossen HAM. 1977. Pollen longevity and artificial cross-pollination in *Coffea arabica* L. *Euphytica* 26: 225-231. doi:10.1007/bf00032090.

Wang L, Wu J, Chen J, Fu D, Zhang C, Cai C, Ou L. 2015. A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Scientia Horticulturae* 188: 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.021>

Wolkis D, Eltringham C, Fant J, Foster J, Knight T, Meyer A, et al. 2024. Pollen banking is a critical need for conserving plant diversity. *Nature Plants* 10: 1270-1271. <https://doi.org/10.1038/s41477-024-01757-1>

Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF. 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*. 61: 1959–1968. doi: 10.1093/jxb/erq053

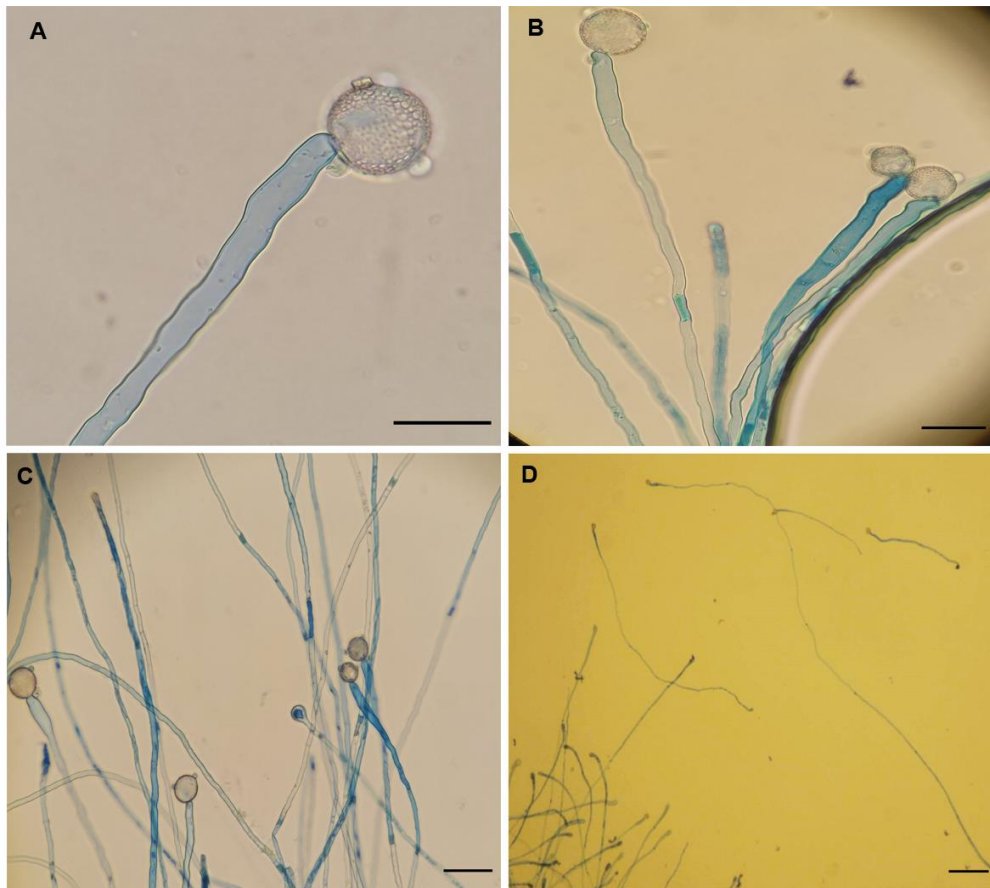


Figure 1 - Germinated genipap pollen grains, showing the protrusion of the pollen tube after a 24-h incubation period stored in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) in Lora culture medium. Figures A, B and C show the well-developed pollen tube, accessions CA, AR2 and MS respectively, figure D shows accession CR5 with the pollen tube brittle. Bar = $200\text{ }\mu\text{m}$.

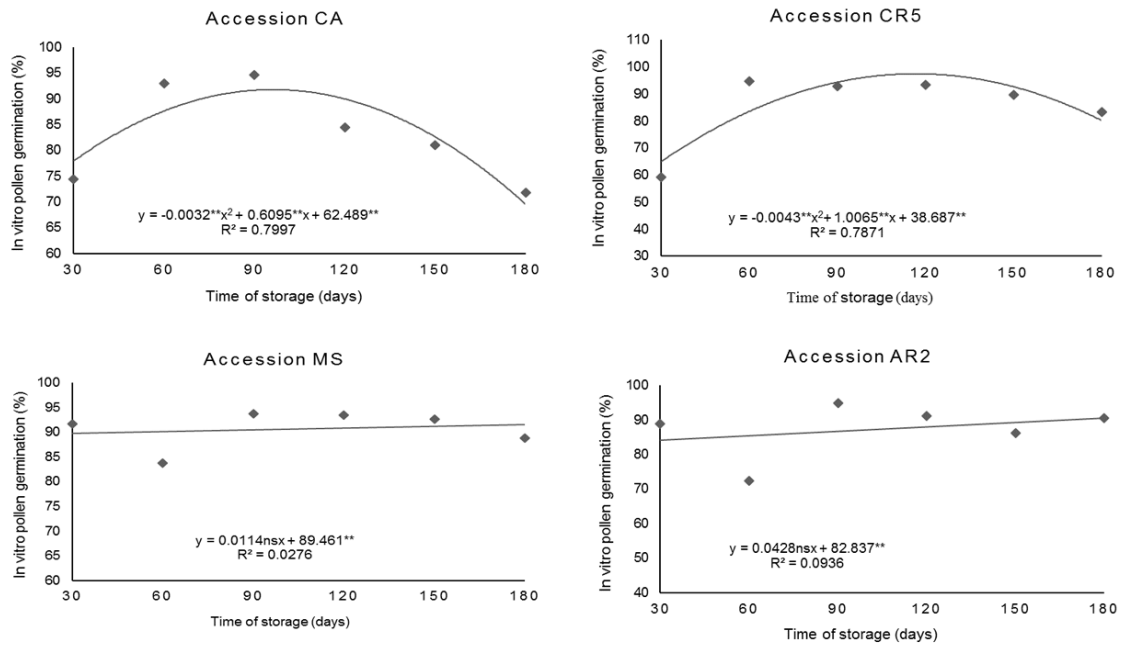


Figure 2 – Effects of storage times (days) on *in vitro* pollen grain germination (%) of genipap accessions. AR2- Arauá 2, CR5 - Lagarto 5, MS - Ilha Mem de Sá, and CA – Caueira accessions.

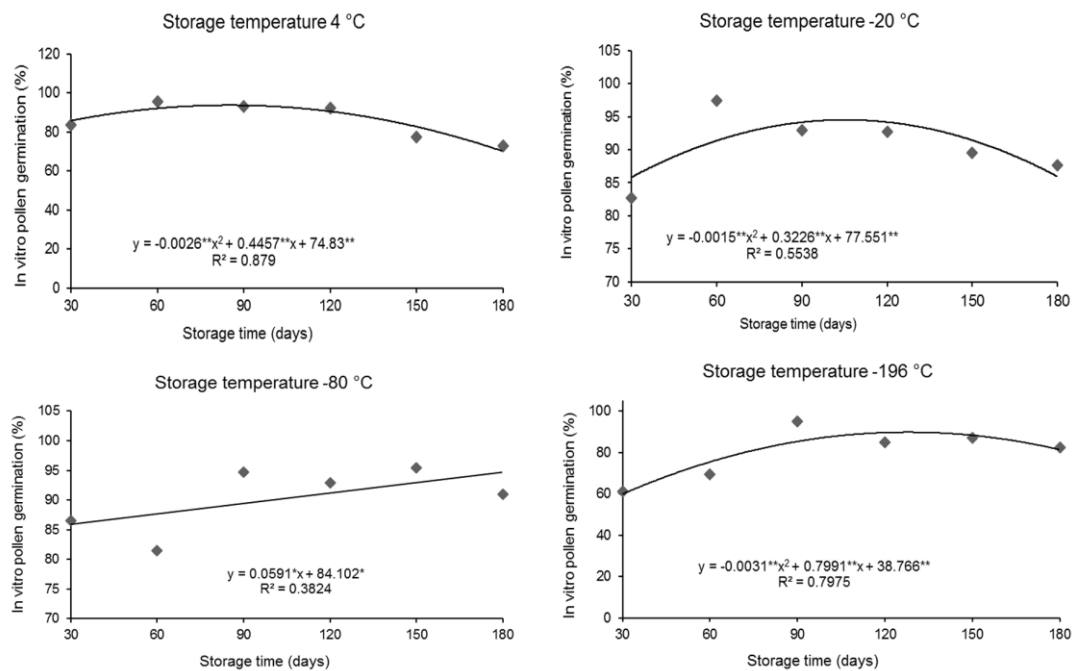


Figure 3 - Effects of storage times (days) on *in vitro* pollen grain germination (%) of genipap under different storage temperatures.

Table 1 – Effects of genipap accessions on *in vitro* pollen grain germination (%) at different storage times (days).

| Accession | Time (days) | | | | | |
|-----------|-------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 |
| CA | 74.3408 b | 93.0610 ab | 94.5949 a | 84.5124 a | 81.0031 b | 71.8109 b |
| CR5 | 59.1550 c | 94.7588 a | 92.7383 a | 93.4966 a | 89.7301 ab | 83.2778 a |
| MS | 91.6291 a | 83.7349 b | 93.7407 a | 93.4834 a | 92.5629 a | 88.7683 a |
| AR2 | 88.9718 a | 72.3847 c | 94.8520 a | 91.2127 a | 86.1551 ab | 90.4330 a |
| CV (%) | 13.58 | | | | | |

Mean values followed by the same lowercase letter in the column do not differ statistically from each other by Tukey's test ($p > 0.05$). AR2- Arauá 2, CR5 - Lagarto 5, MS - Ilha Mem de Sá, and CA – Caueira accessions.

Table 2 - Effects of genipap accessions and different storage times (days) on *in vitro* pollen grain germination (%).

| Temperature | Accession | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | CA | CR5 | MS | AR2 |
| 4°C | 77.0143 bB | 89.0930 aAB | 89.8727 aAB | 87.4894 aA |
| -20°C | 92.6981 aA | 81.8719 bBC | 93.4279 aA | 94.0041 aA |
| -80°C | 94.6440 aA | 91.0361 abA | 83.4745 bB | 92.0903 abA |
| -196°C | 68.5253 cB | 80.1033 bC | 95.8378 aA | 75.6098 abB |
| CV (%) | 13.58 | | | |

Mean values followed by the same lowercase letter in the row and uppercase letter in the column do not differ statistically from each other by Tukey's test ($p > 0.05$). AR2- Arauá 2, CR5 - Lagarto 5, MS - Ilha Mem de Sá, and CA – Caueira accessions.

Table 3 - Effects of storage temperature on *in vitro* pollen grain germination (%) at different storage times (days).

| Tempo | 4°C | -20°C | -80°C | - 196°C |
|--------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 30 | 83.7899 a | 82.7299 a | 86.4701 a | 61.1068 b |
| 60 | 95.4956 a | 97.4711 a | 81.5096 b | 69.4631 c |
| 90 | 93.3103 a | 92.9121 a | 94.6742 a | 95.0295 a |
| 120 | 92.2154 a | 92.6659 a | 92.9236 a | 84.9001 a |
| 150 | 77.5577 b | 89.5412 a | 95.3656 a | 86.9867 ab |
| 180 | 72.8352 b | 87.6829 a | 90.9243 a | 82.6285 ab |
| CV (%) | 13.58 | | | |

Mean values followed by the same lowercase letter in the row do not differ statistically from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

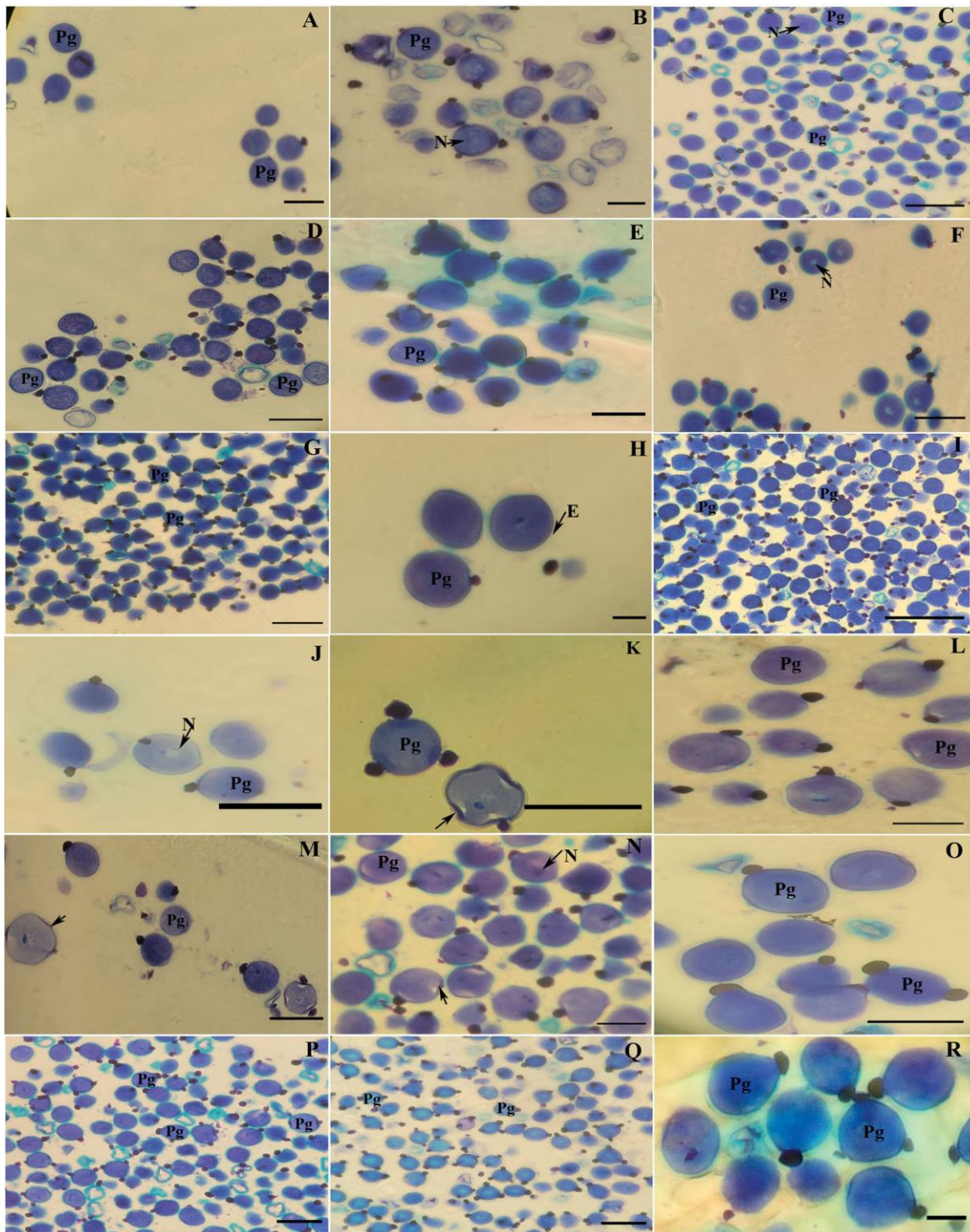


Figure 4 – Histological analysis of pollen grains from the accessions of the genipap BAG: A) AR2 at room temperature, B) AR2 stored in the refrigerator at 4 °C. C) AR2 in the freezer at -20 °C. D) AR2 in the ultra-freezer at -80 °C. E) AR2 liquid nitrogen at -196 °C. F) CA at room temperature. G) CA at 4 °C. H) CA at -20 °C. I) CA at -80 °C. J) CA at -196 °C. K) CR5 at room temperature. L) CR5 at 4 °C. M) CR5 at -20 °C. N) CR5 at -196 °C. O) MS at room temperature. P) MS at 4 °C. Q) MS -20 °C R) MS at -80 °C. Bar of 20 µm in images A, B, E, G, H, J, P, Q and R. Bar of 40 µm in images C, D, F, I, K, L, M, N and O. N = nucleus, E = exine, Pg = pollen grains.

8. ARTIGO 5

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE GRÃOS DE PÓLEN EM ACESSOS DE JENIPAPEIRO

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de caracterizar morfologicamente os grãos de pólen de diferentes acessos de jenipapeiro. Para essas análises, foram selecionadas plantas de quatro acessos do Banco de Germoplasma de Jenipapo da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Em laboratório, as anteras foram retiradas dos botões florais e armazenadas em tubos de falcon contendo FAA 70% e acondicionadas em geladeira a 4°C. Posteriormente, foram preparadas utilizando o método de acetólise. Posteriormente, cada amostra foi montada em quatro lâminas permanentes com gelatina glicerinada e seladas com parafina para análise. Uma análise quantitativa foi conduzida em microscópio óptico, com base em 100 grãos de pólen por amostra para analisar as características morfológicas, como a ornamentação da exina, a forma e o tamanho. As medidas dos grãos de pólen foram realizadas pelo software de análise ImageJ. As análises estatísticas foram feitas pelo software PAST. Os grãos de pólen de *Genipa americana* foram classificados como 3-colporados, com ornamentação reticulada a microreticulada. Os grãos de pólen de jenipapeiro foram considerados de tamanho pequeno a médio, formato oblata-esferoidal e com pequena área polar. As características apresentadas confirmam a variação existente dentro da espécie, ou seja, são euripolínicos.

Palavras-chave: *Genipa americana* L., polimorfismo, Variedade polínica.

ABSTRACT

This work aimed to morphologically characterize the pollen grains of different genipap accessions. For these analyses, plants of four accessions from the Jenipapo Germplasm Bank of Embrapa Tabuleiros Costeiros were selected. In the laboratory, the anthers were removed from the flower buds and stored in falcon tubes containing 70% FAA and kept in a refrigerator at 4°C. Subsequently, they were prepared using the acetolysis method. Afterwards, each sample was mounted on four permanent slides with glycerinated gelatin and sealed with paraffin for analysis. Quantitative analysis was conducted under an optical microscope, based on 100 pollen grains per sample, to analyze morphological characteristics, such as exine ornamentation, shape and size. Pollen grain measurements were performed using ImageJ analysis software. Statistical analyses were performed using PAST software. The pollen grains of *Genipa americana* were classified as 3-colporate, with reticulate to microreticulate ornamentation. The pollen grains of jenipapeiro were considered small to medium in size, oblate-spheroidal in shape and with a small polar area. The characteristics presented confirm the variation existing within the species, that is, they are eurypollinous.

Keywords: *Genipa americana* L., Polymorphism, Pollen variety.

8.1. Introdução

Genipa americana L., conhecida popularmente como jenipapeiro, é uma planta frutífera de porte arbóreo, pertencente à família Rubiaceae, ocorrendo nas cinco regiões do país, geralmente presente nas formações florestais mais úmidas (Gomes, 2024). Rubiaceae Juss., por sua vez, é a quarta maior família de angiospermas, sendo posicionada em Gentianales. Possui distribuição cosmopolita, compreendendo cerca de 610 gêneros e 13.100 espécies e no Brasil ocorrem cerca de 130 gêneros e 1.425 espécies (APG IV, 2016; BFG, 2024).

Considerando que o grão de pólen é um alimento essencial para as abelhas e uma importante fonte nutricional para o homem, surge a necessidade de estudos que contribuam para o conhecimento da flora polínica de espécies frutíferas do Nordeste do Brasil (Karam *et al.*, 2022). Principalmente com espécies raras/ameaçadas de extinção ou com importância econômica como é o caso de *G. americana*, que possui grande interesse econômico.

A família possui uma diversidade morfológica considerável, a forma de vida é perene e anual, tem como forma de crescimento árvore, arbustos, ervas e menos frequente lianas, folhas e estípulas, inflorescências, morfologia de flores e frutos e mudanças correspondentes na polinização (por exemplo, corolas tubulares ou rotativas para diferentes visitantes) (Ehrendorfer *et al.*, 2018). A ecologia de dispersão tem como exemplo os mericarpos secos com pelos uncinados como meio para epizoocoria e os frutos carnudos como meio para endozoocoria (Ehrendorfer *et al.*, 2018).

Os grãos de pólen das espécies da família Rubiaceae foram inicialmente estudados por Erdtman (1952). No entanto, trabalhos mais recentes foram publicados por Dutra *et al.* (2014, 2020). Outro trabalho, ainda mais recente, foi publicado por Ruzza *et al.* (2023), que avaliou a morfologia polínica de *G. americana*, contudo, as propriedades em diferentes genótipos ainda não foram detalhadas. Além disso, como o trabalho foi realizado na região Centro-Oeste, no bioma de Floresta Amazônica, pode haver diferenças morfológicas entre as regiões.

Outro fator importante que ocorre na morfologia dentro da família Rubiaceae é o polimorfismo, sendo registrada a ocorrência no tamanho do grão de pólen em algumas espécies, assim como o número de aberturas polínicas e a ornamentação da exina, a exemplo de *Psychotria capitata* (Ruiz & Pav.) (Rubiaceae) (Ganders, 1979). Essas características mudam de acordo com a morfologia floral, bem como o número e tipo de abertura e a ornamentação da exina, que são características importantes na delimitação dos tipos polínicos e podem ser considerados caracteres de valor taxonômico para família (Dutra *et al.*, 2020)

O estudo da morfologia polínica é necessário para caracterização dos grãos de pólen e identificação das espécies correspondentes e o conhecimento dessas características morfológicas pode ser um método adequado para identificação de genótipos. Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de caracterizar morfológicamente os grãos de pólen de diferentes acessos de jenipapeiro.

8.2. Material e Métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia (GMBio) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). A coleta de flores funcionalmente masculinas foi realizada na pré-antese (24 h antes da abertura), entre 09 e 10 horas em quatro acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Jenipapo (BAG Jenipapo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros. A coleta foi realizada no dia 29 de novembro de 2022 e foram coletados cinco botões florais em cada acesso, totalizando 20 botões. As anteras foram retiradas dos botões florais e armazenadas em tubos de falcon contendo FAA 70% e acondicionadas em geladeira a 4 °C e ficou nessa condição até o início das análises de acetólise.

8.2.1. Análise palinológica

Para essas análises, foram selecionadas plantas dos acessos Arauá 2 (AR2), Lagarto 5 (CR5), Ilha Mem de Sá (MS) e Caueira (CA). Em laboratório, as amostras foram preparadas com uso da metodologia de Alvarado e Delgado (1985), e modificada por Novais *et al.* (2009), com o uso do método de acetólise descrito por Erdtman (1960).

Posteriormente, cada amostra foi montada em quatro lâminas permanentes com gelatina glicerizada e seladas com parafina, sendo em seguida analisadas em microscópio óptico. Uma análise quantitativa foi então conduzida com base em 100 grãos de pólen por amostra para analisar as características morfológicas, como a ornamentação da exina, a forma e o tamanho (Bucher *et al.*, 2004). As medidas dos grãos de pólen foram realizadas pelo software de análise ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

8.2.2. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software PAST (Palaeontological Statistics) versão 3.09 (Hammer *et al.*, 2001). A distância euclidiana (medida de dissimilaridade), com o método de agrupamento UPGMA, foi utilizada para avaliar a formação de grupos entre as amostras estudadas, com base na abundância e valores relacionados aos tamanhos dos eixos polar e equatorial dos grãos de pólen, onde quanto maior a medida de dissimilaridade menor será a similaridade entre as amostras.

8.3. Resultados e Discussão

Os grãos de pólen de *G. americana* apresentaram aberturas 3-colporadas, com ornamentação reticulada a microreticulada. Os valores do eixo polar dos grãos de pólen variaram de 24,21 a 26,46 μm , 25,21 a 27,99 μm , 21,93 a 25,91 μm e 24,32 a 26,29 μm para os acessos AR2, CA, CR5 e MS, respectivamente. Os valores registrados para o eixo equatorial foram de 23,61 a 26,82 μm , 25,01 a 28,03 μm , 21,53 a 25,85 μm , 24,87 a 26,40 μm para os acessos AR2, CA, CR5 e MS, respectivamente.

Os grãos de pólen foram considerados de tamanho pequeno a médio, de acordo com a classificação de Erdtman (1945). Ademais, foi verificada a ocorrência de polimorfismo no tamanho dos grãos de pólen (Figura 1).



Figura 1: Grãos de pólen de *G. americana* evidenciando diferença entre si em relação ao tamanho, ornamentação e forma. A- seta indicando a presença da exina, B e E - setas indicando as aberturas polínicas, F - setas indicando a exina e o conteúdo celular extravasado. Figuras A e B - representam grãos de pólen do acesso CA, C - acesso CR5, D - acesso AR2, E e F - representam grãos de pólen do acesso MS. Barra de 100 μm .

Os grãos de pólen apresentaram uma forma oblata-esferoidal, com pequena área polar. As características apresentadas confirmaram a variação morfológica dentro da espécie (Tabela 1). O grão de pólen possui ornamentação da exina reticulada, e possui tamanho médio (Ruzza *et al.*, 2023); enquanto os grãos de pólen dos acessos avaliados apresentaram tamanho de pequenos a médios. Essas variações morfológicas podem ser decorrentes da região de origem dos indivíduos avaliados, uma vez que a presente pesquisa foi realizada no Nordeste, com

indivíduos do bioma Mata Atlântica e o trabalho citado foi realizado na região Centro-Oeste, no bioma de Floresta Amazônica.

Tabela 1: Medições de grãos de pólen em acessos do BAG Jenipapo.

| Acesso | AR2 | | CA | | CR5 | | MS | |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Diâmetro | P | E | P | E | P | E | P | E |
| Médias | 24,82 μm | 24,88 μm | 26,19 μm | 26,21 μm | 23,97 μm | 24,06 μm | 25,37 μm | 25,15 μm |
| Desv. pad | 1,09 μm | 1,37 μm | 1,26 μm | 1,40 μm | 1,98 μm | 2,03 μm | 0,94 μm | 0,73 μm |
| CV | 4,39 μm | 5,49 μm | 4,82 μm | 5,33 μm | 8,27 μm | 8,45 μm | 3,70 μm | 2,88 μm |

CV: coeficiente de variação, Desv. pad: Desvio, P: Eixo polar, E: Eixo equatorial.

Através do dendrograma, observou-se a formação de três grupos, de acordo com a dissimilaridade e similaridade (Figura 2). O primeiro grupo foi composto por amostras do acesso CR5, distintamente separado dos demais. Essa dissimilaridade pode ser devido ao tamanho do grão de pólen, já que ele apresentou os menores valores, tanto para o eixo polar como para o eixo equatorial. O segundo grupo foi formado por amostras do acesso CA, que pode estar associado ao tamanho do grão de pólen, uma vez apresentou os maiores valores para ambos os eixos. O terceiro grupo foi formado por grãos de pólen dos acessos MS e AR2, evidenciando maior similaridade polínica, demonstrando que esses acessos apresentam relativamente o mesmo tamanho dos grãos de pólen.

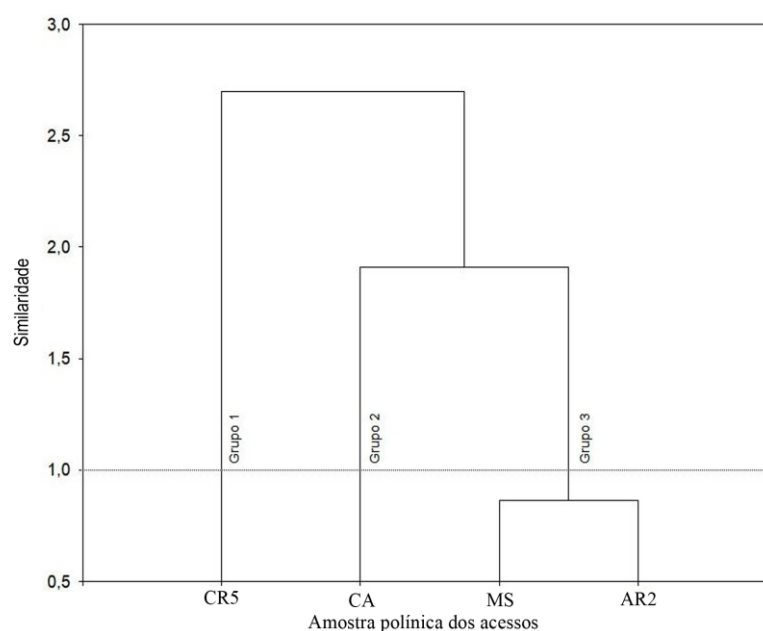


Figura 2: Análise de agrupamento de ligação única de acessos de *G. americana* estudadas com base em parâmetros quantitativos de grãos de pólen.

Estudos realizados por Dutra *et al.* (2020) e Guo *et al.* (2020) relataram que o grão de pólen do jenipapeiro é semelhante ao grão de pólen de *Leptodermis purdomii*, *Leptodermis buxifolia* e *Ixora venulosa* Benth., espécies pertencentes à família Rubiaceae. No entanto, Ruzza *et al.* (2023) relataram que os grãos de pólen diferem entre si em relação ao tamanho e à ornamentação, e essas características peculiares dos grãos de pólen permitem a fertilização da espécie através do grão de pólen apropriado. *G. americana* apresenta diversidade morfológica nos grãos de pólen (euripolínicas), essas diferenças presentes nas características

dos grãos de pólen são usadas para auxiliar na distinção das espécies dentro da família (Vishnu-Mitre e Sharma, 1962).

8.4. Conclusões

As características encontradas na *Genipa americana* ratificam a variação existente dentro da espécie. Entretanto, os grãos de pólen dos acessos estudados apresentam atributos em comum, que também são encontrados em outras rubiáceas e auxiliam na distinção das espécies dentro da família, uma vez que se trata de uma espécie euripolínica.

8.5. Referências Bibliográficas

ALVARADO, J. L.; DELGADO, M. D. Flora apícola en Uxpanapa, Veracruz, Mexico. **Biotica**, v. 10, p. 257-275, 1985.

Angiosperm Phylogeny Group (APG IV). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. The Linnean Society of London, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.181, p.1-20, 2016.

BFG - Flora e Funga do Brasil *Rubiaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB210>. Acesso em: 12 fev. 2025.

BUCHER, E.; KOFLER, V.; VORWOHL, G.; ZIEGER, E. **Lo spettro pollinico dei mieli dell'Alto Adige. Laives**: Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente e la Tutela del Lavoro, 2004. 676 p.

DUTRA, F.V.; DORETO, H.S.; RIBEIRO, P.C.; GASPARINO, E.C. Morfologia Polínica em Espécies Ornamentais de Asteraceae, Ericaceae, Fabaceae, Malpighiaceae, Malvaceae e Rubiaceae. **Nucleus**, v. 11, p. 7–17, 2014.

DUTRA, F. V.; BELLONZI, T. K.; SOUZA, C. N.; GASPARINO, E. D. Pollen morphology of Rubiaceae from Cerrado forest fragments: Pollen unit, polarity and diversity of the types of apertures. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 2020.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy IV. Labiatae, Verbenaceae and Avicenniaceae. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 39, p. 279-285, 1945.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy Angiosperms**. Stockholm: Almqvist e Wiksell, 1952.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 39, p. 561-564, 1960.

EHRENDORFER, F.; BARFUSS, M. H.; MANEN, J. F.; SCHNEEWEISS, G. M. Phylogeny, character evolution and spatiotemporal diversification of the species-rich and world-wide distributed tribe Rubieae (Rubiaceae). **Plos One**, v. 13, n. 12, p. e0207615, 2018.

GANDERS, F.R. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany**, v. 17, p. 607-635, 1979.

- GOMES, M. *Genipa* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14045>. Acesso em: 12 fev. 2025
- GUO, X.; LIAO, Q.; GUO, X.; ZHOU, S.; GUO, Y.; ZHANG, Y.; WANG, R. Pollen morphology of *Leptodermis* (Rubiaceae) and its systematic implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, p. 1-16, 2020.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9. 2001.
- KARAM, V. M.; SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. D. A. R. D. Pollen profile of bee pollen from semiarid Northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, p. e20220205, 2022.
- NOVAIS, J. S.; LIMA, L. C. L.; SANTOS, F. A. R. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera* L. in a semi-arid area from Bahia, Brazil. **Grana**, v. 48, p. 224-234, 2009.
- RUZZA, D.A.C.; BISPO, R.B.; PEDRI, E.C.M.; MARTINS, K.C.; ZORTÉA, K.E.M.; SOUZA, S.A.M.; PEREIRA, T.N.S.; ROSSI, A.A.B. Palynology and meiotic behavior of *Genipa americana* L., a species native to the Amazon. **Bioscience Journal**, v. 39, p. e39070, 2023.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- VISHNU-MITRE; SHARMA, B.D. Studies of Indian pollen grains. 1 - Leguminosae. **Pollen et Spores**, v. 4, n. 1, p. 6-45, 1962.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância da *Genipa americana* L. e seu papel socioeconômico e ambiental, os estudos relacionados à viabilidade e conservação do grão de pólen são relevantes. Através dos resultados obtidos, foi possível observar que o armazenamento de grãos de pólen nas quatro temperaturas é promissor.

A espécie possui alta viabilidade polínica e pode ser conservada por um longo período em baixas temperaturas. Os grãos de pólen de *G. americana* são 3-colporados, com ornamentação reticulada a microreticulada, sendo considerados de tamanho pequeno a médio, sua forma é oblata-esferoidal, com pequena área polar.

Por ser uma espécie nativa importante, é fundamental o estudo da viabilidade polínica, bem como o desenvolvimento de métodos confiáveis para determinar e monitorar essa viabilidade durante o armazenamento.

O estudo de viabilidade polínica por germinação *in vitro* de grãos de pólen é importante para programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma do jenipapeiro. O grão de pólen conservado pode ser usado em polinização cruzada e contribuir para a diversidade genética, possibilitando maiores chances de sucesso na reprodução da espécie, podendo reduzir a deriva genética da espécie e a endogamia, e aumentar o fluxo gênico.

A análise histológica revelou que a morfologia e as características estruturais dos grãos de pólen são muito semelhantes entre os quatro acessos e que não houve alterações nas características estruturais dos grãos de pólen dos quatro acessos, bem como do jenipapeiro coletado em Siriri (SE), após o período de armazenamento.