

Aracaju, SE / Novembro, 2025

## Protocolo de conservação de grãos de pólen de jenipapeiro a temperaturas baixas e ultrabaixas

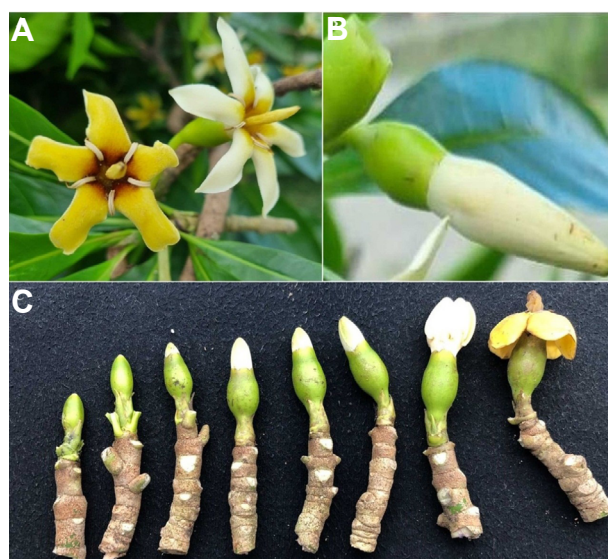
Ana da Silva Lédo<sup>(1)</sup>, Gilmara da Silva Freire<sup>(2)</sup>, Ana Veruska Cruz da Silva<sup>(3)</sup>, Josué Francisco da Silva Junior<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. <sup>(2)</sup> Bióloga, doutora em Agricultura e Biodiversidade, UFS/PPGAGRI, Aracaju, SE. <sup>(3)</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. <sup>(4)</sup> Engenheiro-agrônomo, mestre em Ciências Agrárias, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

### Introdução

A *Genipa americana* L., espécie nativa, mas não endêmica do Brasil, conhecida popularmente como jenipapeiro, é da família Rubiaceae e ocorre nas cinco regiões do país, geralmente nas formações florestais mais úmidas (Gomes, 2025). É uma planta frutífera de grande importância econômica para comunidades rurais e tradicionais. Além disso, apresenta interesse econômico devido à aplicação da genipina, um iridoide, na indústria alimentícia e farmacêutica, além do potencial medicinal (Ahmed et al., 2024). A espécie foi 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).

O sistema de reprodução é apomítico e alogâmico, sendo que, nas flores femininas, os estames não são funcionais (estaminódios). Da mesma forma, nas flores masculinas, os ovários não são funcionais (Figura 1) (Ruzza et al., 2023). Apesar da ocorrência de apomixia, a produção de grãos de pólen viáveis e a alogamia presentes na espécie, permitem a efetivação de cruzamentos dirigidos. Portanto, o desenvolvimento de protocolo de conservação de grãos de pólen é necessário ao melhoramento genético do jenipapeiro.



Fotos: Gilmara Freire

**Figura 1.** Flores de *Genipa americana* L.: A - flores masculinas; B - botão floral masculino; C - flor e botões florais femininos em diferentes estádios.

Diversas técnicas de conservação de material genético vegetal têm utilizado faixas de temperatura baixas até ultrabaixas (abaixo de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A criopreservação consiste na conservação do material vegetal em temperaturas ultrabaixas, obtidas pelo nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou de sua fase de vapor ( $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A técnica se torna um procedimento viável para conservação de material biológico por

longos períodos, exigindo poucos espaço e manutenção (Benson, 2008).

A conservação do grão de pólen é uma das ferramentas importantes na gestão dos recursos genéticos vegetais. O sucesso do armazenamento de grão de pólen depende de muitos fatores e requer métodos que assegurem alta integridade genética, vigor e capacidade de germinação (Wang, 1975). O grão de pólen conservado pode ser usado para apoiar a reprodução em espécies com agentes polinizadores ineficientes, ineficazes ou inexistentes (Tighe, 2004). Os testes de viabilidade replicáveis são cruciais para o desenvolvimento contínuo de protocolos de polinização artificial e armazenamento de grão de pólen (Conner, 2011).

O objetivo desta publicação é descrever a metodologia de criopreservação de grãos de pólen de acessos de jenipapeiro, desenvolvida pelo Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE. O protocolo poderá ser aplicado por usuários de tecnologia, técnicos, pesquisadores, professores e estudantes.

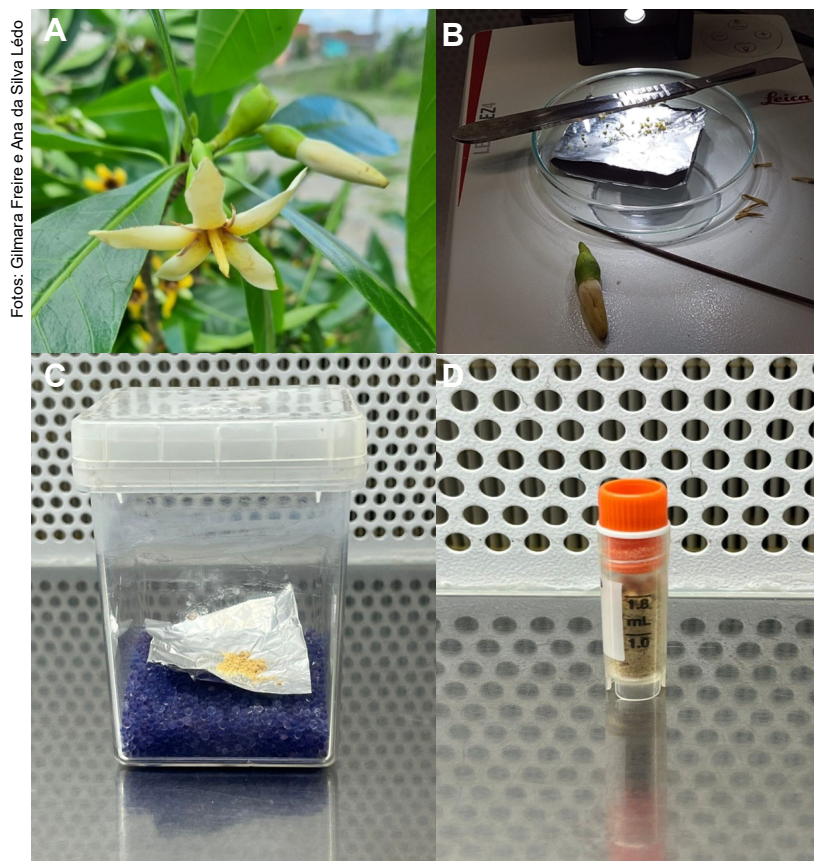
## Obtenção de flores em campo, transporte, extração e acondicionamento de grãos de pólen em laboratório

a) Flores masculinas funcionais, com o androceu bem desenvolvido, devem ser pré-selecionadas em plantas doadoras, marcadas com barbante colorido e monitoradas até a pré-antese (Figura 2A).

b) Flores masculinas funcionais devem ser coletadas na fase de pré-antese, ou seja, 24 h antes da abertura, entre 9 h e 10 h, evitando período de alta temperatura ambiente.

c) Após o corte dos ramos contendo as flores, com auxílio de podão, os mesmos são acondicionados em sacos de papel pardo ou de plástico fechados, identificados e mantidos em caixas de poliestireno expandido, e transportadas até o laboratório ou área de processamento.

d) No laboratório, inicialmente, as flores masculinas são retiradas dos ramos com auxílio de tesoura e, em câmara de fluxo laminar, com auxílio de



Fotos: Gilmaria Freire e Ana da Silva Lédó

**Figura 2.** Etapas da coleta de flores masculinas funcionais no campo e extração, desidratação e acondicionamento em laboratório. A - seleção de flores masculinas na fase pré-antese; B - retirada de grãos de pólen das anteras em câmara de fluxo laminar; C - desidratação em sílica gel; D - acondicionamento em criotubos.

pinças de ponta fina e bisturi, ocorre a extração dos grãos de pólen das anteras abertas coletando-os em papel alumínio (Figura 2B).

e) Os grãos de pólen são desidratados por 24 h em dessecador com sílica gel sobre papel alumínio (Figura 2C), para reduzir a umidade e a formação de cristais de gelo no processo de crioconservação.

f) Os grãos de pólen devem ser acondicionados em recipientes estéreis como tubos tipo Eppendorf, criotubos ou frascos de vidro (Figura 2D).

### Conservação de grãos de pólen a baixas e ultrabaixas temperaturas

a) Após a desidratação em sílica gel, os grãos de pólen estão aptos para conservação em quatro condições de temperatura, a depender do objetivo e tempo necessário para a sua conservação: refrigerador (4 °C); freezer (-20 °C); ultrafreezer (-80 °C); e nitrogênio líquido (-196 °C).

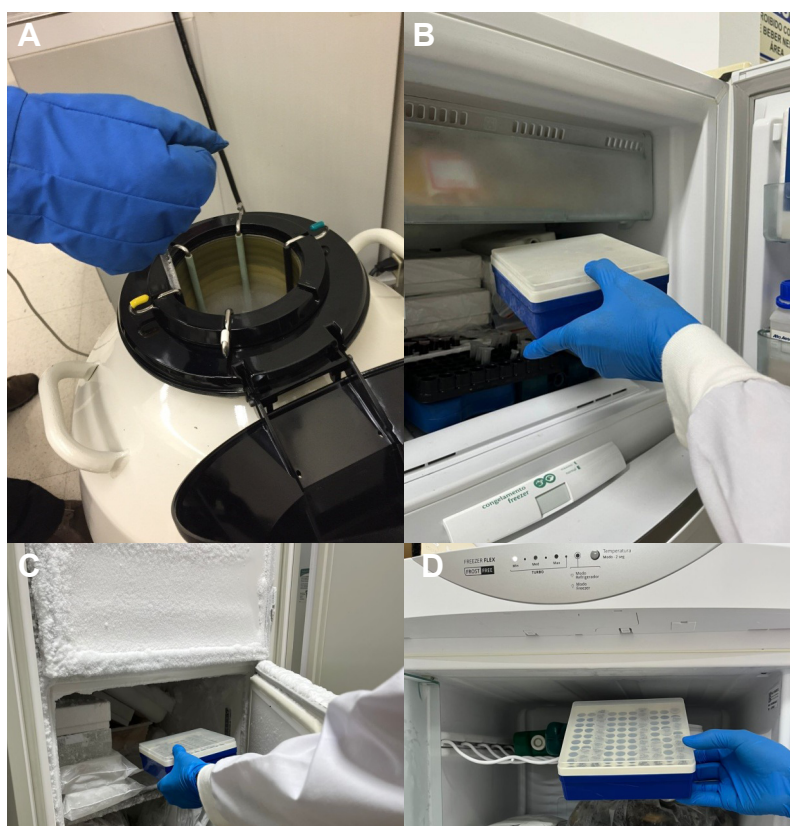
b) Os testes de viabilidade dos grãos de pólen devem ser realizados como controle antes e após desidratação em sílica gel.

c) Para o armazenamento a -196 °C, os grãos de pólen acondicionados em criotubos capacidade de 3 mL a 5 mL de polipropileno estéreis são inseridos em garrafa térmica contendo nitrogênio líquido e rapidamente imersos em tambor de armazenamento nitrogênio líquido em recipiente de transporte (Figura 3A).

d) Em seguida, os canistres contendo os criotubos com grãos de pólen são rapidamente retirados do recipiente de transporte e inseridos em canecas do tambor de nitrogênio líquido (Figura 3B).

e) Os tambores de nitrogênio líquido devem ser mantidos em ambiente com temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C, com nível adequado de nitrogênio líquido conforme capacidade dos mesmos.

f) Nas demais condições de armazenamento, os recipientes com grãos de pólen podem ser acomodados em caixas de polipropileno resistente a baixas temperaturas (-20 °C e -80 °C), Figuras 3 C e D.



Fotos: Ana da Silva Léo

**Figura 3.** Conservação de grãos de pólen de jenipapeiro: A - crioconservação em nitrogênio líquido (-196 °C); B - conservação em refrigerador (4 °C); C - conservação em ultrafreezer (-80 °C) e D - conservação em freezer (-20 °C).

## Teste de viabilidade polínica por germinação in vitro do tubo polínico

A análise de viabilidade do pólen é importante no processo de conservação, pois quanto maior a viabilidade inicial, maiores as chances de obtenção de plantas provenientes do cruzamento com pólen conservado (Amaral et al., 2012). Os testes de viabilidade dos grãos de pólen devem ser realizados como controle antes e após desidratação em sílica gel, e após o processo de reaquecimento.

Testes de viabilidade polínica por corantes são rápidos (Figura 4A), mas superestimam as porcentagens de viabilidade polínica, sendo os testes por germinação in vitro do tubo polínico (Figura 4B) e/ou polinização in vivo (no campo) os mais recomendados.

A seguir, serão apresentados os passos para a aplicação do teste por germinação in vitro do tubo polínico:

a) Após a conservação, os criotubos, contendo os grãos de pólen, são retirados da condição de

armazenamento e colocados em recipientes em banho-maria a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 a 3 min (Figura 5A).

b) Os grãos de pólen descongelados são transferidos para placas de Petri estéreis descartáveis ou não, 60 x 15 mm contendo 2 mL a 4 mL de meio de Lora (Tabela 1) líquido estéril. As culturas são mantidas em BOD por 24 h, à temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  na presença de luz (Figura 5C).

c) Após 24 h de incubação, as placas são observadas na lupa em quatro campos de contagem (Figura 5D).

d) Deve ser considerado pólen germinado, aquele em que na visualização apresentar emissão de tubo polínico com comprimento superior ao diâmetro do próprio pólen (Wang et al., 2004).

e) Para estimar a porcentagem de viabilidade polínica, VP (%), aplicar a seguinte fórmula:

$$\text{VP (\%)} = (\text{N}^{\circ} \text{ de grãos de pólen germinados} / \text{N}^{\circ} \text{ de grãos de pólen total}) \times 100$$

## Preparo do meio de cultura para os testes de viabilidade por germinação do tubo polínico

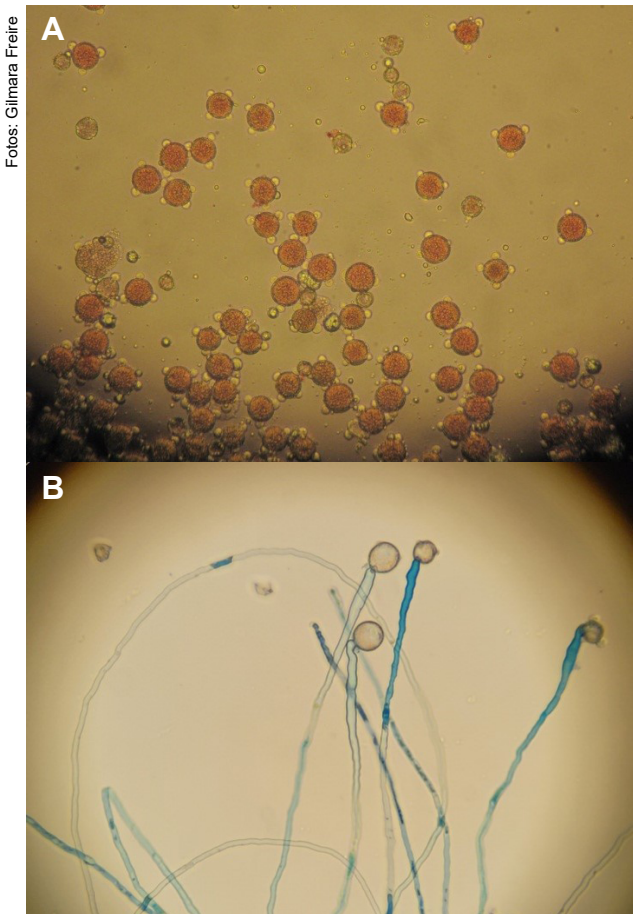
O meio de Lora (2006) é o mais eficiente para estudos de viabilidade polínica de grãos de pólen de jenipapeiro (Tabela 1).

O meio de Lora deve ser preparado com pH ajustado para  $5,8 \pm 1,0$  e autoclavado por 20 min a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pode ser mantido à temperatura ambiente ou em geladeira até sua distribuição em placas de Petri estéreis.

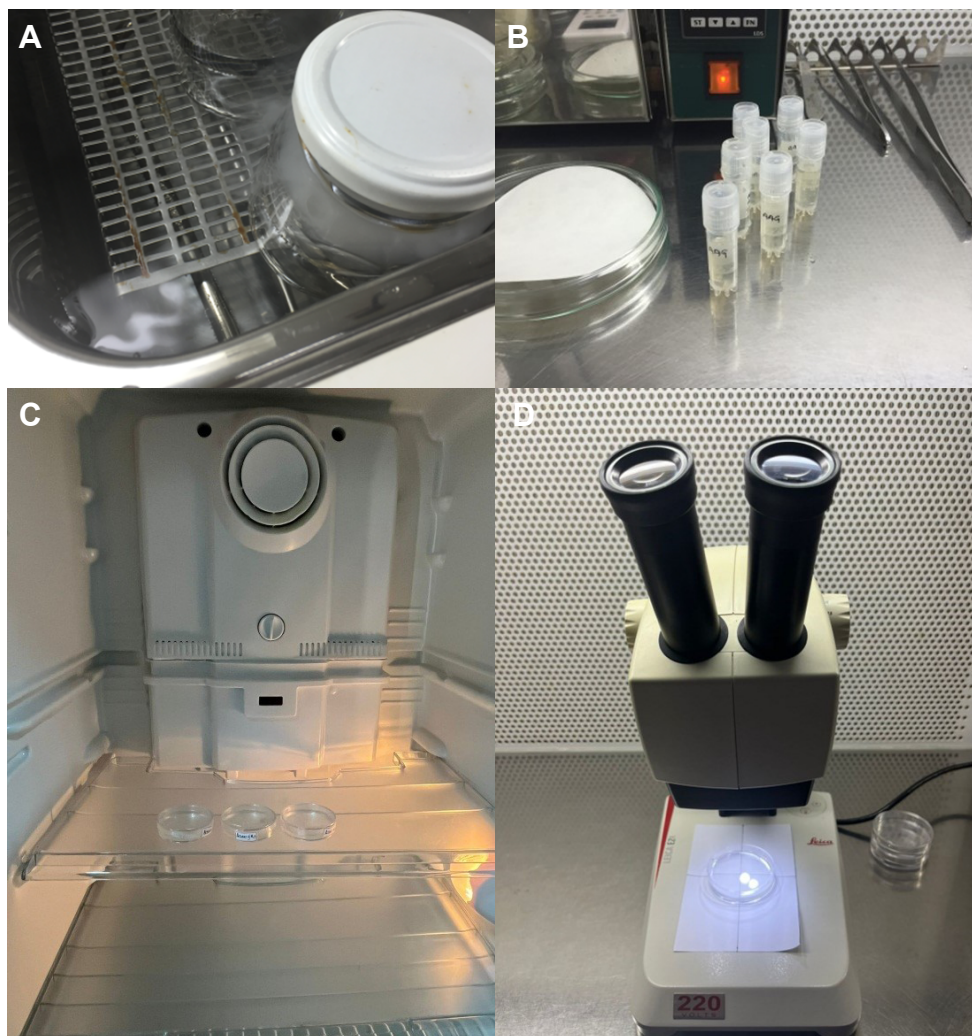
**Tabela 1.** Componentes do meio de cultura Lora (2006) para germinação in vitro de grãos de pólen de jenipapeiro.

Macro e micronutrientes	mg L <sup>-1</sup>
Nitrato de cálcio tetrahidratado - Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	250
Nitrato de potássio - KNO <sub>3</sub>	100
Sulfato de magnésio heptahidratado - MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200
Ácido bórico - H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100
	<b>g L<sup>-1</sup></b>
Sacarose	40

Fonte: Lora et al. (2006).



**Figura 4.** Testes de viabilidade polínica em grãos de pólen de jenipapeiro. A- por corante; B- por germinação do tubo polínico.



Fotos: Ana da Silva Lêdo

**Figura 5.** Descongelamento de grãos de pólen. A - banho maria a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2-3 minutos; B - grãos de pólen descongelados; C - incubação em BOD por 24 h; D - contagem de grãos de pólen viáveis em lupa.

## Considerações finais

A conservação de grãos de pólen de jenipapeiro em diferentes condições de armazenamento é eficiente, todos alcançaram aos 180 dias viabilidades acima de 80% e a técnica pode ser aplicada para programas de melhoramento genético e conservação da espécie, considerando a possibilidade de realização de cruzamentos específicos a qualquer tempo, sem dependência de coletas frequentes de grãos de pólen no campo.

Além disso, pode contribuir para a formação de bancos de pólen, intercâmbio de germoplasma dentre outras aplicações da biotecnologia.

A espécie apresenta uma ampla faixa de conservação de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  que deve ser selecionada em função do uso imediato ou futuro.

## Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos Genison Oliveira Trindade e José Inácio Roque Junior por todo apoio nas atividades de campo e no Laboratório e Cultura de Tecidos de Plantas, à Embrapa e ao CNPq (Processo 311708/2022-6) pelo aporte de recursos financeiros e à Capes (Financiamento 001) pela bolsa de doutorado da autora principal.

## Referências

AHMED, R.; N. HIRA, WANG, M.; IQBAL, S.; YI, J.; HEMAR, Y. Genipin, a natural blue colorant precursor: Source, extraction, properties, and applications, **Food Chemistry**, v. 434, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137498>

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: BENSON, B. (ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 23-29.

CONNER, P. J. Optimization of in vitro pecan pollen germination. **HortScience**, v. 46, n. 4, p. 571–576, 2011. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.4.571>

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

GOMES, M. **Genipa**. In: FLORA e Funga do Brasil. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14044>. Acesso em: 23 jun. 2025.

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>

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. DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v39n0a2023-62719>

TIGHE, M. E. **Manual of collection and management of tropical and subtropical pinus pollen from natural stands**. Carolina do Norte: CAMOCORE, 2004. 20 p.

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, p. 93–103, 1975.

WANG, Z. Y.; GE, Y.; SCOTT, M.; SPANGENBERG, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 523–530, 2004.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.91.4.523>

#### Embrapa Tabuleiros Costeiros

Av. Gov. Paulo Barreto de Menezes, nº 3250  
CEP 49025-040, Aracaju, SE  
<https://www.embrapa.br/tabuleiros-costeiros>  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Amaury da Silva dos Santos*

Secretário-executivo: *Aline Gonçalves Moura*

Membros: *Aldomario Santo Negrissoli Junior, Marcos Aurélio Santos da Silva, Fabio Enrique Torresan, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Viviane Talamin, Amaury Apôlonio de Oliveira, Joézio Luiz dos Anjos, Alitiene Moura Lemos Pereira e Josué Francisco da Silva Júnior*

#### Comunicado Técnico 254

ISSN 1678-1937

Outubro, 2025

Edição executiva, revisão de texto e diagramação:

*Aline Gonçalves Moura*

Normalização bibliográfica: *Josete Cunha Melo*  
(CRB-5/1383)

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Publicação digital: PDF



Ministério da  
Agricultura e Pecuária

Todos os direitos reservados à Embrapa.