



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

MICHELE DOS SANTOS FERREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE ESPÉCIES SILVESTRES DE
Passiflora L. E REVISÃO SISTEMÁTICA DE QUATRO DÉCADAS DE PESQUISA**

Feira de Santana – BA
2024

MICHELE DOS SANTOS FERREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE ESPÉCIES SILVESTRES DE
Passiflora L. E REVISÃO SISTEMÁTICA DE QUATRO DÉCADAS DE PESQUISA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dra. Claudineia Regina Pelacani Cruz
Coorientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Coorientadora: Dra. Eva Maria Rodrigues Costa

Feira de Santana – BA
2024

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

F442 Ferreira, Michele dos Santos

Criopreservação de grãos de pólen de espécies silvestres de *Passiflora* L. E revisão sistemática de quatro décadas de pesquisa / Michele dos Santos Ferreira. – 2024.

89 f. : il.

Orientadora: Claudineia Regina Pelacani Cruz.

Coorientadoras: Fernanda Vidigal Duarte Souza; Eva Maria Rodrigues Costa.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2024.

1. *Passiflora* spp. 2. Maracujazeiros. 3. Variabilidade. 4. Conservação.

5. Criopreservação – grãos de pólen. I. Título. II. Cruz, Claudineia Regina Pelacani. III. Souza, Fernanda Vidigal Duarte. IV. Costa, Eva Maria Rodrigues. V. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

CDU 582.842.7:575

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **JONNY EVERSON SCHERWINSKI PEREIRA**
Data: 05/11/2024 08:26:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Documento assinado digitalmente
 **DANIELA GARCIA SILVEIRA**
Data: 06/11/2024 10:36:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Daniela Garcia Silveira
(IF Baiano- Campus Governador Mangabeira)

Documento assinado digitalmente
 **EVERTON HILO DE SOUZA**
Data: 06/11/2024 08:51:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Everton Hilo de Souza
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

Documento assinado digitalmente
 **JOSE RANIERE FERREIRA DE SANTANA**
Data: 06/11/2024 14:38:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Ranieri Ferreira de Santana (Universidade
Estadual de Feira de Santana - UEFS)

Documento assinado digitalmente
 **CLAUDINEIA REGINA PELACANI CRUZ**
Data: 01/11/2024 10:50:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Claudinéia Regina Pelacani Cruz
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que permitiu que tudo isso fosse possível. Ele sempre esteve comigo, guiando-me e fortalecendo-me, sendo a base de todas as minhas conquistas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e a EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa - Código de Financiamento 001.

Agradeço a minha orientadora Dr^a. Claudineia Pelacani, por sua colaboração e suporte prestado em momentos-chave desta trajetória. Sua contribuição foi fundamental para a consolidação e conclusão deste trabalho. Obrigada pela confiança e disponibilidade.

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Fernanda Vidigal, por seu constante apoio ao longo de todo o processo do doutorado. Sua orientação e expertise foram essenciais para o desenvolvimento e sucesso deste trabalho. Sou grata pela confiança e pelos valiosos ensinamentos.

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Eva Maria, por sua dedicação e apoio. Sua colaboração e conselhos foram fundamentais para o progresso da pesquisa. Foi gratificante compartilhar com você esses momentos de trabalho e aprendizado.

Agradeço à “Equipe do Maracujá”, representada pelo Dr. Onildo Nunes e Dra. Tatiana Junghans, pelo suporte essencial para a realização desta pesquisa.

Agradeço à equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial ao técnico Helder Carvalho e à analista Fabiana Aud, pelo suporte fundamental na realização dos experimentos. Sou grata aos amigos que fiz nesse ambiente, que compartilharam não apenas momentos de trabalho e aprendizado, mas também momentos de descontração e companheirismo. A colaboração e amizade de todos tornaram essa jornada mais agradável e enriquecedora.

Agradeço à equipe do Laboratório de Conservação e Tecnologia de Sementes da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial à técnica Tatiane Amorim, pelo suporte na realização dos experimentos e pela amizade construída ao longo dos anos, desde minha graduação e mestrado.

Agradeço aos meus pais, Eliene e Simpliciano, por todo o investimento, orações e incentivo. Sou grata por ter o apoio de vocês na realização dos meus sonhos.

Agradeço à minha irmã Mileide por estar sempre ao meu lado, compartilhando tanto os momentos de alegria quanto as frustrações, medos e superações. Sou grata por celebrar comigo minhas conquistas.

Agradeço a minha família espiritual, a Primeira Igreja Batista em São Felipe, em especial aos meus pastores, Marcondes Barbosa e Karina Guimarães, por todos os conselhos, incentivo e orações.

Enfim, agradeço a todos que compartilham comigo este momento de gratidão e alegria, e a todos que de alguma forma contribuíram e celebram comigo esta conquista!

Muito obrigada!

“Porque o Senhor é bom. A sua misericórdia não tem fim. Eterna é a sua fidelidade.”
Salmos 100:5

RESUMO

O pólen, como um recurso genético valioso, desempenha um papel importante tanto na conservação de germoplasma quanto no melhoramento de plantas. Entre as diversas estratégias de conservação, a criopreservação de pólen destaca-se como uma estratégia eficaz, inovadora e de longo prazo. Essa técnica permite a conservação e intercâmbio de germoplasma, a hibridização de plantas em diferentes locais e épocas, além de superar a assincronia de florescimento, que pode ser uma barreira para o progresso nos programas de melhoramento genético. Um exemplo é o uso de espécies silvestres de *Passiflora*, que possuem alelos de interesse para o desenvolvimento de híbridos melhorados. No entanto, a assincronia de florescimento que ocorrer entre as espécies pode representar uma barreira significativa para os programas de melhoramento do maracujazeiro. Assim, inicialmente, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficaz para a criopreservação de pólen de espécies silvestres de *Passiflora*. Para isso, grãos de pólen de oito espécies foram submetidos à desidratação em dessecador com sílica gel e estufa (35 °C), durante 0, 20, 40 e 60 minutos. Em seguida foi mantido em nitrogênio líquido por 24 horas. Foram avaliados a germinação *in vitro*, medições do comprimento do tubo polínico e a polinização controlada utilizando pólen criopreservado. Os resultados mostraram que o pólen criopreservado apresentou percentuais de germinação variando de 71% a 28%, e o pólen fresco variou de 89% a 37%. As porcentagens de frutificação variaram de 50% a 40%, com porcentagens de germinação de sementes entre 67% e 99%. Quanto ao desenvolvimento do tubo polínico para os grãos de pólen submetidos à criopreservação, foi observado um crescimento significativo em comparação com os grãos de pólen frescos. Esses resultados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, destacam a eficácia da criopreservação como uma técnica robusta para conservar conjuntos de genes haploides dentro de um banco criogênico. Além disso, este trabalho também apresenta a primeira revisão sistemática sobre a criopreservação de pólen, abrangendo 40 anos de pesquisa, desde os primeiros estudos publicados em 1984 até os mais recentes em 2024. Foram compiladas informações relevantes sobre o tema a partir de cinco bases de dados (Web of Science, Scopus, CAB Direct, Springer e Science Direct), utilizando uma sequência de busca padronizada e critérios de inclusão e exclusão predefinidos. Foram identificados 566 artigos, dos quais 88 foram selecionados para compor esta revisão. Essas publicações abrangem 38 famílias de plantas em 19 países, com a China, Índia, Estados Unidos e Brasil sendo os principais produtores de pesquisa sobre o tema. Este estudo propôs a harmonização de métodos e protocolos para facilitar a comparação de dados obtidos em diferentes centros de pesquisa, com base em estudos existentes sobre criopreservação de pólen. Dessa forma, este trabalho oferece uma contribuição significativa para orientar e impulsionar a pesquisa sobre a conservação dos recursos genéticos vegetais.

Palavras-chaves: Maracujazeiros; Variabilidade; Conservação à longo prazo; Nitrogênio líquido; Banco de dados; Métodos; Criobancos.

ABSTRACT

Pollen, as a valuable genetic resource, plays an important role in both germplasm conservation and plant breeding. Among various conservation strategies, pollen cryopreservation stands out as an effective, innovative, and long-term strategy. This technique allows for the conservation and exchange of germplasm, plant hybridization across different locations and seasons, and overcoming flowering asynchrony, which can be a barrier to progress in breeding programs. An example is the use of wild *Passiflora* species, which have alleles of interest for developing improved hybrids. However, the flowering asynchrony that occurs among species can present a significant barrier to passion fruit breeding programs. Thus, this study initially aimed to establish an effective protocol for pollen cryopreservation of wild *Passiflora* species. To achieve this, pollen grains from eight species were dehydrated in a desiccator with silica gel and an oven (35 °C) for 0, 20, 40, and 60 minutes. They were then stored in liquid nitrogen for 24 hours. In vitro germination, pollen tube length measurements, and controlled pollination using cryopreserved pollen were evaluated. Results showed that cryopreserved pollen exhibited germination rates ranging from 71% to 28%, while fresh pollen ranged from 89% to 37%. Fruit set percentages varied from 50% to 40%, with seed germination rates between 67% and 99%. Regarding pollen tube development for cryopreserved pollen grains, a significant growth was observed compared to fresh pollen grains. These in vitro and in vivo results highlight the efficacy of cryopreservation as a robust technique for conserving haploid gene pools within a cryogenic bank. Additionally, this study also presents the first systematic review on pollen cryopreservation, encompassing 40 years of research, from the earliest studies published in 1984 to the most recent in 2024. Relevant information on this topic was compiled from five databases (Web of Science, Scopus, CAB Direct, Springer, and Science Direct), using a standardized search string and predefined inclusion and exclusion criteria. A total of 566 articles were identified, of which 88 were selected for this review. These publications cover 38 plant families across 19 countries, with China, India, the United States, and Brazil as the leading research producers on this topic. This study proposed harmonizing methods and protocols to facilitate data comparison across different research centers, based on existing studies on pollen cryopreservation. In this way, this work provides a significant contribution to guiding and advancing research on the conservation of plant genetic resources.

Keywords: Passion fruit; Variability; Long-term conservation; Liquid nitrogen; Database; Methods; Cryobanks.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	17
Capítulo I	21
Criopreservação de Pólen em Nitrogênio Líquido – Conhecimento e Desenvolvimento: Uma Revisão Sistemática.	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1. Introdução	24
2. Materiais e Métodos	25
3. Resultados	27
3.1 Triagem dos Estudos	27
3.2 Histórico da criopreservação de pólen	28
3.3 Principais países de pesquisa e culturas envolvidas na criopreservação de pólen	29
3.4 Estágio de desenvolvimento da flor para coleta de pólen	30
3.5 Desidratação de grãos de pólen	31
3.6 Crioprotetores para criopreservação de pólen	32
3.7 Tempo de imersão do pólen em nitrogênio líquido em condições experimentais	32
3.8 Principais métodos utilizados para testar a viabilidade do pólen em estudos de criopreservação	33
4. Discussão	35
5. Mecanismos de Danos ao Pólen Durante a Criopreservação	42
5.1 Danos Oxidativos e Estresse Induzido por ERO	42
5.2 Morte Celular Programada (PCD)	43
5.3 O Papel dos Íons de Cálcio (Ca²⁺) na Morte Celular Programada (PCD)	43
5.4 Mecanismos Moleculares e Regulação de Proteínas	44
5.5 A Via Mitocondrial da PCD	44
6. Lacunas na Pesquisa sobre Criopreservação de Pólen	45
6.1 Espécies Silvestres	45
6.2 Longevidade do Pólen em Armazenamento de Longo Prazo Além de Uma Década	45
6.3 Fertilidade e Crescimento das Plantas Geradas	46
6.4 Criopreservação entre Pólen Bicelular e Tricelular	47
7. Conclusão	48
REFERÊNCIAS	50
Capítulo II	61

Estratégia para o estabelecimento de um criobanco de pólen de <i>Passiflora</i> spp. silvestres	
61	
RESUMO	62
ABSTRACT	63
1.Introdução	64
2. Materiais e Métodos	65
2.1 Material Vegetal	65
2.2 Desidratação do pólen	66
2.3 Teste de germinação dos grãos de pólen	67
2.4 Armazenamento em Nitrogênio Líquido	68
2.5 Polinização in vivo	68
3 Resultados	69
3.1 Desidratação	69
3.2 Armazenamento em nitrogênio líquido	72
4 Discussão	77
REFERÊNCIAS	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

INTRODUÇÃO GERAL

A criopreservação é uma estratégia de conservação *ex situ*, essencial para o armazenamento em longo prazo de material biológico em temperaturas extremamente baixas, utilizando nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (HALMAGYI et al., 2022). Essa estratégia oferece uma solução eficaz para a conservação prolongada de recursos genéticos de valor sócio-econômico e ecológico (LI e PRITCHARD, 2009). A capacidade de manter a viabilidade e a integridade do material genético durante longos períodos é crucial para a segurança alimentar, a preservação da biodiversidade, assim como para o melhoramento genético dessas espécies (ELGELMANN, 1997; VERZHUK et al., 2023; BENELLI et al., 2024).

Sob condições criopreservadas, o material vegetal é mantido em um estado em que as divisões celulares e os processos metabólicos são significativamente reduzidos, assegurando a preservação da integridade genética por longos períodos, com mínima necessidade de espaço e manutenção (ELGELMANN, 1997; BENSON et al., 2008). Nessas condições, os riscos de ameaças bióticas ou abióticas, comuns em coleções de campo, são drasticamente minimizados, assim como os perigos de contaminação microbiana e a variação genética ou somaclonal como pode ocorrer nas coleções *in vitro* (PANIS et al., 2020; BETTONI, 2021). Dessa forma, a criopreservação complementa os bancos de genes de campo tradicionais e os bancos *in vitro*, superando suas limitações.

Entre os diversos tipos de material biológico que podem ser criopreservados, como sementes (VELASCO-GARCÍA et al., 2022), ápices meristemáticos (SOUZA et al., 2018; BETTONI et al., 2021) e embriões somáticos (BRADAĬ et al., 2023), os grãos de pólen é particularmente valioso e se destaca pela relativa facilidade e alta eficiência (SILVA et al. 2017; DINATO et al., 2020). O pólen, constituído por grãos microscópicos que contêm as células reprodutivas masculinas das plantas, desempenha um papel central na polinização, um processo essencial para a fecundação e produção de sementes (BORG et al., 2009; GÓMEZ et al., 2015). Além disso, os grãos de pólen são vitais para o fluxo gênico entre populações vegetais, promovendo a diversidade genética dentro e entre as espécies (WILSON e ZHANG, 2009).

Dessa forma, a criopreservação de grãos de pólen, surge como uma ferramenta poderosa na conservação de recursos genéticos vegetais. Por meio desta estratégia, é possível preservar alelos fundamentais na continuidade de programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de novas variedades com características desejáveis, como

resistência a doenças, tolerância a estresses ambientais e aumento da produtividade (WILSON e ZHANG, 2009; TER STEEG et al., 2022). A técnica de criopreservação dos grãos de pólen também resolve desafios como, assincronia de florescimento (VENDRAME et al., 2008), polinização cruzada entre diferentes locais e épocas, além de possibilitar o intercâmbio de germoplasma entre diferentes instituições e países (VOLK, 2011).

Os recursos genéticos vegetais constituem uma reserva de variabilidade genética vital, necessária para o desenvolvimento de cultivares que possam enfrentar condições adversas e fortalecer os sistemas agrícolas (OGWU et al., 2014; HASAN et al., 2015). Dentre esses recursos valiosos estão as espécies de *Passiflora* L. O gênero, possui grande relevância tanto econômica quanto científica (REIS et al., 2018; PEREIRA et al., 2023). Trata-se do gênero com maior diversidade e de ocorrência mais abundante da família Passifloraceae, sendo o maior grupo de trepadeiras e lianas da região Neotropical, cerca de 570 espécies, sendo 93 endêmicas do Brasil, onde se destaca como um dos principais centros de diversidade do gênero (BERNACCI et al., 2024).

O gênero *Passiflora* é dividido atualmente em seis subgêneros, dos quais quatro ocorrem no Brasil: *Passiflora* subgen. *Astrophea* (DC.) Mast., *P.* subgen. *Decaloba* (DC.) Rchb., *P.* subgen. *Deidamioides* (Harms) Killip e *P.* subgen. *Passiflora* (BERNACCI et al., 2024). As espécies desse gênero, não apenas contribuem para a biodiversidade, mas também desempenham papel importante na polinização e na ecologia dos habitats em que estão inseridas, atraindo uma variedade de polinizadores, incluindo insetos e pássaros (WINFREE et al., 2011). Além disso, algumas espécies de *Passiflora* possuem propriedades medicinais reconhecidas (BARBALHO et al., 2012; RAMAIYA et al., 2014), sendo utilizadas em práticas fitoterápicas para tratar diversas condições de saúde (ZHANG et al., 2023). As espécies silvestres, apresentam grande potencial no melhoramento genético, especialmente em relação à resistência a doenças e à qualidade dos frutos (JUNQUEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

A principal espécie, *Passiflora edulis* Sims, é uma planta nativa do Brasil (ZHANG et al., 2023), possui grande importância no agronegócio e está crescendo em todo o mundo (TURAZI et al., 2024). É geralmente comercializada para consumo in natura, onde frutas de qualidade premium têm um valor de mercado relativamente alto (FALEIRO, 2022). A produção mundial de maracujá foi avaliada em aproximadamente USD 3,71 bilhões em 2023, com previsão de crescimento de 5,2% ao ano até 2031 (DATAM BRIDGE MARKET RESEARCH, 2024). O melhoramento genético e as tecnologias desenvolvidas nas últimas

décadas têm contribuído para o conhecimento e expansão da cultura no Brasil e no mundo (TURAZI et al., 2024).

Dentro desse contexto, a criopreservação de pólen de espécies silvestres de *Passiflora* é fundamental, pois elas possuem características únicas que são valiosas para o desenvolvimento de novas variedades. A assincronia de florescimento, que ocorre entre espécies do gênero pode se constituir em uma barreira para a geração de novos híbridos. O pólen dessas espécies pode ser utilizado para gerar híbridos que combinam as melhores características dos progenitores, como resistência a patógenos, tolerância a estresses ambientais, e melhorias na qualidade dos frutos (OLIVEIRA et al., 2013; OCAMPO et al., 2016; VIANNA et al., 2019). Além disso, as exuberantes flores, formas, e aromas dessas plantas, que possuem alto valor ornamental, podem ser potencializados por meio da hibridação (SOARES et al., 2015; BUGALLO et al., 2011), resultando em novas variedades que atendem tanto às demandas agrícolas quanto às paisagísticas. Assim, essa estratégia não apenas contribui para a diversificação genética, mas também amplia as possibilidades de desenvolvimento de plantas com maior adaptabilidade e valor comercial.

Com isso, esta tese descreve um estudo experimental focado na criopreservação de pólen de oito espécies silvestres de *Passiflora* L. Este estudo, realizado com espécies conservadas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, buscou estabelecer um protocolo de criopreservação de pólen, investigando fatores cruciais como condições e períodos de desidratação. A pesquisa experimental envolveu estimativa do conteúdo de água das amostras, testes de germinação in vitro, medições do comprimento do tubo polínico e experimentos de polinização controlada em campo com pólen criopreservado. Os resultados deste estudo são inéditos e fornecem dados valiosos para a conservação dos grãos de pólen de espécie silvestres de *Passiflora* e para desenvolvimento de protocolos eficientes na conservação de germoplasma do maracujá.

A revisão sistemática, que constitui um capítulo desta tese, é uma metodologia de pesquisa que tem ganhado destaque nos últimos anos pela sua robustez e rigor científico. Uma revisão sistemática envolve a coleta, análise e síntese de todas as evidências disponíveis sobre uma questão de pesquisa específica, utilizando métodos padronizados para minimizar vieses e garantir a confiabilidade dos resultados (SARGEANT e O'CONNOR, 2020). Essa abordagem é essencial para consolidar o conhecimento existente, identificar lacunas na literatura e orientar futuras pesquisas de maneira fundamentada (JIMENEZ et al., 2019).

A condução de uma revisão sistemática segue uma sequência rigorosa de etapas, começando pela formulação de uma pergunta de pesquisa clara e bem definida (DEHKORDI et al. 2021). Em seguida, é realizada uma busca exaustiva da literatura em diversas bases de dados, utilizando termos de busca específicos e critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos (STRECH e SOFAER, 2012). Após a seleção dos estudos relevantes, procede-se à extração e avaliação crítica dos dados, aplicando ferramentas padronizadas para avaliar a qualidade metodológica dos estudos incluídos (DEHKORDI et al., 2021). Finalmente, os dados são sintetizados e analisados para gerar conclusões robustas e baseadas em evidências (PATI e LORUSSO, 2018).

Uma revisão sistemática pode ser conduzida de duas maneiras principais: quantitativa (meta-análise) ou qualitativa. Na meta-análise, os resultados de dois ou mais estudos são combinados para avaliar o efeito de uma intervenção utilizando métodos estatísticos. No método qualitativo, as descobertas de diferentes estudos são integradas sem o uso de análises estatísticas (JADAD e McQUAY, 1996; JADAD e HAYNES, 1998). Diversas diretrizes foram introduzidas para padronizar o relato de meta-análises, incluindo o QUORUM, MOOSE, STROBE, CONSORT e QUADAS, atualmente, a declaração PRISMA (Itens de Relatórios Preferenciais para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises) ganhou ampla aceitação (STROUP et al., 2000). O processo de revisão sistemática baseado na declaração PRISMA envolve quatro etapas principais: formulação das perguntas de pesquisa, definição dos critérios de elegibilidade, identificação de todos os estudos relevantes, extração e síntese dos dados, e, por fim, a dedução e apresentação dos resultados que correspondem às respostas às perguntas de pesquisa (STREC e SOFAER, 2012; ASAR et al., 2016).

No âmbito desta tese, a revisão sistemática sobre criopreservação de grãos de pólen abrangeu 40 anos de pesquisa, fundamentando-se na análise de estudos publicados em bases de dados renomadas, como Web of Science, Scopus, CAB Direct, Springer e Science Direct. As informações coletadas sobre criopreservação dos grãos de pólen foram organizadas e apresentadas de maneira clara, facilitando a comparação entre metodologias e protocolos. Isso contribui para uma melhor compreensão dos estudos realizados em diferentes centros de pesquisa, proporcionando uma visão inédita dos avanços, desafios e tendências emergentes na área ao longo desses anos.

Em conjunto, os dois capítulos desta tese oferecem uma visão abrangente sobre a criopreservação de grãos de pólen e a conservação de recursos genéticos vegetais. O primeiro capítulo foca em aspectos experimentais específicos relacionados ao gênero *Passiflora*,

enquanto o segundo capítulo proporciona uma análise crítica e sistemática do conhecimento existente na área para várias espécies. Juntos, esses capítulos contribuem para o avanço do conhecimento e das práticas na criopreservação de grãos de pólen, promovendo a conservação da biodiversidade e o melhoramento genético de plantas.

REFERÊNCIAS

- ASAR, S. H.; JALALPOUR, S. H.; AYOUBI, F.; RAHMANI, M. R.; REZAEIAN, M. PRISMA; preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, v. 15, n. 1, p. 68-80, 2016.
- BARBALHO, S. M.; SOUZA, M. D. S. S.; DE PAULA, E. S. J.; MENDES, C. G.; OLIVEIRA, G. A.; COSTA, T.; FARINAZZI-MACHADO, M. V. Yellow passion fruit rind (*Passiflora edulis*): an industrial waste or an adjuvant in the maintenance of glycemia and prevention of dyslipidemia. *Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism*, v. 1, n. 1, p. 5, 2012.
- BENELLI, C.; TARRAF, W.; İZGÜ, T.; ANICHINI, M.; FARALONI, C.; SALVATICI, M.C.; JOUINI, N.; GERMANÀ, M.A.; DANTI, R.; LAMBARDI, M. Long-Term Conservation for the Safeguard of *Abies nebrodensis*: An Endemic and Endangered Species of Sicily. *Plants*, v. 13, n. 12, p. 1682, 2024.
- BENSON, E.E. Cryopreservation of phytodiversity: A critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 27, p. 141–219, 2008.
- BERNACCI, L.C.; NUNES, T.S.; MEZZONATO, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; D.C. IMIG; CERVI, A.C. (in memoriam) *Passiflora* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12506>>. Acesso em: 15 ago. 2024
- BETTONI, J. C.; MARKOVIĆ, Z.; BI, W.; VOLK, G. M.; MATSUMOTO, T.; WANG, Q. C. Grapevine shoot tip cryopreservation and cryotherapy: Secure storage of disease-free plants. *Plants*, v. 10, n. 10, p. 2190, 2021.
- BORG, M.; BROWNFIELD, L.; TWELL, D. Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 5, p. 1465-1478, 2009.
- BRADAĬ, F.; ALMAGRO-BASTANTE, J.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Effect of sucrose preculture and culture inoculum density on cryopreservation of olive somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, v. 322, p. 112385, 2023.
- BUGALLO, V.; CARDONE, S.; PANNUNZIO, M. J.; FACCIUTO, G. Breeding advances in *Passiflora* spp. (Passionflower) native to Argentina. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, v. 5, n. 1, p. 23-34, 2011.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S.; JESUS, O. N.; VIEIRA, J. G.; MORI, G. M.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Molecular genetic variability of commercial and wild accessions of passion fruit (*Passiflora* spp.) targeting ex situ conservation and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, v.15, n. 12, p. 22933-22959, 2014.
- DATAM BRIDGE MARKET RESEARCH. Global Passion Fruit Market. Disponível em: <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-passion-fruit-market>. Acesso em: 18 nov. 2024.

- DEHKORDI, A. H.; MAZAHERI, E.; IBRAHIM, H. A.; DALVAND, S.; GHESHLAGH, R. G. How to write a systematic review: a narrative review. *International journal of preventive medicine*, v.12, n. 27, p.1-6, 2021.
- DINATO, N. B.; IMACULADA SANTOS, I. R.; ZANOTTO VIGNA, B. B.; PAULA, A. F.; FÁVERO, A. P. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. *CryoLetters*, v. 41, n. 3, p. 115-127, 2020.
- ELGELMANN, F. In vitro conservation methods. In: CALLOW, J.A.; FORD-LLOYE, B.V.; NEWBURY, H.J. (Eds.). *Biotechnology and Plant Genetic Resources. CAB International*, 1997. p. 119–161.
- FALEIRO, F. G. Passion fruit: fruit native to Brazil to the world. *HF Yearbook: 2022. Campo & Negócios*, v. 11, p. 79-81, 2022.
- GÓMEZ, J. F.; TALLE, B.; WILSON, Z. A. Anther and pollen development: a conserved developmental pathway. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 57, n. 11, p. 876-891, 2015.
- HALMAGYI, A.; VĂLIMĂREANU, S.; ŞOVĂREL, G.; COSTE, A. Cryo-Technologies for Ex Situ Conservation of Rosa Germplasm. *Plants*, v. 11, n. 8, p. 1095, 2022.
- HASAN, M.; ABDULLAH, H. M. Plant genetic resources and traditional knowledge: emerging needs for conservation. In: *Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge for Food Security*. p. 105-120, 2015.
- JADAD, A. R.; HAYNES, R. B. The Cochrane Collaboration—advances and challenges in improving evidence-based decision making. *Medical Decision Making*, v. 18, p. 2-9, 1998.
- JADAD, A. R.; McQUAY, H. J. Meta-analyses to evaluate analgesic interventions: a systematic qualitative review of their methodology. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 49, p. 235-243, 1996.
- JIMENEZ-RUIZ, C. A.; LOPEZ-PADILLA, D.; ALONSO-ARROYO, A.; ALEIXANDRE-BENAVENT, R.; SOLANO-REINA, S.; DE GRANDA-ORIVE, J. I. COVID-19 and smoking: a systematic review and meta-analysis of the evidence. *Archivos de Bronconeumología*, v. 57, p. 21-34, 2020.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; ANJOS, J. R. N. D.; SILVA, A. P. D. O.; CHAVES, R. D. C.; GOMES, A. C. Reaction to diseases and yield of eleven cultivars of sour-passion fruit cultivated with no pesticides. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 8, p.1005-1010, 2003.
- LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. *Trends in Plant Science*, v. 14, p. 614–621, 2009.
- OCAMPO, J.; ARIAS, J. C.; URREA, R. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. *Euphytica*, v. 209, p. 395-408, 2016
- OGWU, M. C.; OSAWARU, M. E.; AHANA, C. M. Challenges in conserving and utilizing plant genetic resources (PGR). *International Journal of Genetic and Molecular Biology*, v. 6, n. 2, p. 16-22, 2014.

OLIVEIRA, E. J. D.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. D. J.; SANTOS-FILHO, H. P.; JESUS, O. N. D. Disease severity from passion fruit to identify sources of resistance in field conditions. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 35, n. 2, p.485-492, 2013.

PANIS, B.; NAGEL, M.; VAN DEN HOUWE, I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in in vitro collection and/or in liquid nitrogen. *Plants*, v. 9, p. 1634, 2020.

PATI, D.; LORUSSO, L. N. How to write a systematic review of the literature. *HERD: Health Environments Research & Design Journal*, v. 11, n. 1, p. 15-30, 2018.

PEREIRA, Z. C.; CRUZ, J. M.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. A. Polpa de maracujá (*Passiflora* spp.): uma revisão sobre propriedades bioativas, benefícios à saúde e potencial tecnológico. *Food Research International*, v. 166, p. 112626, 2023.

RAMAIYA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H. Avaliação das atividades fenólicas, antioxidantes e antibacterianas totais de espécies de *Passiflora*. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 167309, 2014.

REIS, L. C. R.; FACCO, E. M. P.; SALVADOR, M.; FLÔRES, S. H.; OLIVEIRA RIOS, A. Potencial antioxidante e caracterização físico-química de maracujás amarelos, roxos e alaranjados. *Journal of Food Science and Technology*, v. 55, n. 7, p. 2679–2691, 2018.

SARGEANT, J. M.; O'CONNOR, A. M. Scoping reviews, systematic reviews, and meta-analysis: applications in veterinary medicine. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 11, 2020.

SILVA, M.A.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; MELO, C.A; CORRÊA, R.X.; ARAÚJO, I.S., CONCEIÇÃO, L.D. Analysis of transferability of microsatellite primers (SSR) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 3, p. 5908-5918, 2014.

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; VIEIRA, L. J.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. *Scientia Horticulturae*, v. 219, p. 326-334, 2017.

SOARES, T.L, JESUS, O.N., SOUZA, E.H., OLIVEIRA, E.J. Reproductive biology and pollen-pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 197, p. 339-349, 2015.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H.; SILVA, R. L. Cryopreservation of pollen grains of pineapple and other bromeliads. *Plant Cell Culture Protocols*. p. 279-288, 2018.

STRECH, D.; SOFAER, N. How to write a systematic review of reasons. *Journal of Medical Ethics*, v. 38, n. 2, p. 121-126, 2012.

STROUP, D. F.; BERLIN, J. A.; MORTON, S. C.; OLKIN, I.; WILLIAMSON, G. D.; RENNIE, D.; MOHER, D.; BECKER, B. J.; SIPE, T. A.; THACKER, S. B. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. *JAMA*, v. 283, n. 15, p. 2008-2012, 2000.

- TER STEEG, E. M.; STRUIK, P. C.; VISSER, R. G.; LINDHOUT, P. Crucial factors for the feasibility of commercial hybrid breeding in food crops. *Nature Plants*, v. 8, n. 5, p. 463-473, 2022.
- TURAZI, C. M. V.; FERNANDES, P. C. C.; FALEIRO, F. G.; COSTA, A. M. Analysis of collaboration networks for scientific and technological research on passion fruit. *Ciência Rural*, v.54, n. 1, p. e20220443, 2024.
- VELASCO-GARCÍA, M. V.; HERNÁNDEZ-ARROYO, D. G.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, L.; CASTILLO-MARTÍNEZ, C. R.; VALLEJO-REYNA, M. Á.; GARCÍA-CAMPUSANO, F. Seed cryopreservation of *Cedrela odorata* L.: germination and early nursery establishment. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, v. 13, n. 69, p. 31-55, 2022.
- VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. *HortScience*, v. 43, p. 264–267, 2008.
- VERZHUK, V.; MURASHEV, S.; NOVIKOVA, L.; KIRU, S.; ORLOVA, S. Conservation of the bird cherry (*Padus* Mill.) germplasm by cold storage and cryopreservation of winter cuttings. *Biology*, v. 12, n. 8, p. 1071, 2023.
- VIANNA, L. S.; PEREIRA, T.; SANTOS, E.; VIANNA, A.; PEREIRA, M.; RAMOS, H. Marcadores ISSR e SSR para determinar relações genéticas entre três espécies selvagens de *Passiflora*. *Genetic and Molecular Research*, v. 18, p. 1-10, 2019.
- VOLK, G. M. Collecting pollen for genetic resources conservation. **In:** *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. p. 1-10, 2011.
- WILSON, Z. A.; ZHANG, D. B. From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 5, p. 1479-1492, 2009.
- WINFREE, R.; GROSS, B. J.; KREMEN, C. Valuing pollination services to agriculture. *Ecological Economics*, v. 71, p. 80-88, 2011.
- ZHANG, J.; TAO, S.; HOU, G.; ZHAO, F.; MENG, Q.; TAN, S. Phytochemistry, nutritional composition, health benefits and future prospects of *Passiflora*: A review. *Food Chemistry*, p. 136825, 2023.

Capítulo I

Criopreservação de Pólen em Nitrogênio Líquido – Conhecimento e Desenvolvimento: Uma Revisão Sistemática.

RESUMO

A conservação dos recursos genéticos vegetais é uma prioridade global devido à sua importância para a segurança alimentar. O pólen é um recurso valioso tanto para a conservação de recursos genéticos quanto para o melhoramento de plantas. Sua preservação e uso estratégico são essenciais para enfrentar os desafios agrícolas e ambientais contemporâneos, como garantir a segurança alimentar e preservar a biodiversidade. Entre as estratégias de conservação, a criopreservação de pólen tem sido amplamente utilizada em várias culturas como uma ferramenta essencial para a troca e conservação de germoplasma, hibridação de plantas em diferentes locais e estações, superação da floração assíncrona e otimização da produção de sementes híbridas. Este estudo apresenta a primeira revisão sistemática da criopreservação de pólen, uma abordagem abrangente que abrange 40 anos de pesquisa, desde os primeiros estudos publicados em 1984 até os mais recentes em 2024. Compilamos pesquisas relevantes de cinco bases de dados (Web of Science, Scopus, CAB Direct, Springer e Science Direct) usando uma string de busca padronizada e critérios de inclusão e exclusão predefinidos. As informações coletadas sobre a criopreservação de pólen foram organizadas e apresentadas de forma clara, permitindo a comparação entre metodologias e protocolos para melhorar a compreensão dos estudos realizados em diferentes centros de pesquisa. Este trabalho contribui significativamente para o avanço da pesquisa sobre a conservação de pólen, servindo como uma estratégia complementar para a conservação de recursos genéticos vegetais.

Palavras-chave: criobancos, base de dados, nitrogênio líquido, conservação.

ABSTRACT

The conservation of plant genetic resources is a global priority due to its importance for food security. Pollen is a valuable resource for both genetic resource conservation and plant breeding. Its preservation and strategic use are essential to address contemporary agricultural and environmental challenges, such as ensuring food security and preserving biodiversity. Among conservation strategies, pollen cryopreservation has been widely used across various crops as an essential tool for germplasm exchange and conservation, plant hybridization across locations and seasons, overcoming asynchronous flowering, and optimizing hybrid seed production. This study presents the first systematic review of pollen cryopreservation, providing a comprehensive approach that spans 40 years of research, from the earliest studies published in 1984 to the most recent in 2024. We compiled relevant research from five databases (Web of Science, Scopus, CAB Direct, Springer, and Science Direct) using a standardized search string and predefined inclusion and exclusion criteria. The collected information on pollen cryopreservation was organized and presented clearly, enabling comparisons between methodologies and protocols to enhance the understanding of studies conducted at various research centers. This work significantly contributes to the advancement of pollen conservation research, serving as a complementary strategy for the conservation of plant genetic resources.

Keywords: cryobanks, database, liquid nitrogen, conservation.

1. Introdução

A conservação dos recursos genéticos vegetais é uma prioridade globalmente reconhecida e fundamental para a segurança alimentar, especialmente em tempos de mudanças climáticas, onde os processos biológicos são dinâmicos e enfrentam desafios bióticos e abióticos que podem afetar a agricultura (Mascher et al. 2019; Muluneh 2021). Assim, há a necessidade de adotar estratégias para conservar os recursos genéticos vegetais, que podem ser realizadas *in situ* ou *ex situ* (Coelho et al. 2020; González-Benito et al. 2020) e podem englobar várias técnicas.

Entre as estratégias *ex situ* utilizadas, a criopreservação de plantas se destaca como uma abordagem eficaz, pois não apenas permite a conservação de longo prazo, mas também oferece economia de espaço significativa e reduz a necessidade de atividades de manutenção. As temperaturas ultra-baixas reduzem significativamente o metabolismo celular, mantendo a viabilidade e a estabilidade genética dos tecidos preservados, o que é essencial para a regeneração e o resgate de plantas (Benson et al. 2008; Verzhuk et al. 2023). No entanto, para que a estratégia seja bem-sucedida, é necessário conhecimento para otimizar vários fatores, incluindo o tipo de estrutura vegetal a ser criopreservada, seu tamanho, estado fisiológico, necessidade de crioprotetores, conteúdo residual de água na amostra e a escolha da técnica mais adequada, entre outros (Souza et al. 2015; Walters e Pence 2020).

Atualmente, a criopreservação é uma das estratégias mais investigadas e utilizadas para obter duplicatas de segurança para a conservação de germoplasma de várias espécies, como gramíneas (Wang et al. 1994; Reed et al. 2006), plantas ornamentais (Kulus e Zalewska 2014; Kaviani e Kulus 2022; Song et al. 2022), plantas hortícolas (Nukari e Uosukainen 2007; Malik e Chaudhury 2019), espécies florestais (Häggman et al. 2008; Li et al. 2018), frutíferas (Benelli et al. 2013; Kaviani e Kulus 2022) e leguminosas (Cachitã e Crăciun 1995).

Qualquer tecido totipotente pode ser utilizado como fonte de material biológico para a criopreservação, como sementes (Walters et al. 2013; Generoso et al. 2019; Velasco-García et al. 2022), embriões somáticos (Gladfelter et al. 2021; Bradaï et al. 2023), raízes (Popova et al. 2021), ápices caulinares (Bekheet et al. 2020), ápices meristemáticos (Zuguo et al. 2006; Souza et al. 2018; Bettoni et al. 2021), suspensões celulares (Škrlep et al. 2008; Mustafa et al. 2011; Titova et al. 2021) e pólen (Souza et al. 2015, Silva et al. 2017; Ren et al. 2019b; Ejsmond et al. 2011).

O pólen é um conjunto de minúsculos grãos produzidos nas flores de angiospermas e gimnospermas, atuando como elementos reprodutivos masculinos ou microgametófitos. Sua principal função é liberar gametas masculinos no saco embrionário para fertilização, resultando no desenvolvimento de sementes e frutos em angiospermas (Borg et al. 2009) e na formação de sementes em gimnospermas. Na natureza, a polinização cruzada promovida pelo pólen gera e mantém a variabilidade genética das espécies, tanto entre quanto dentro das populações, permitindo a continuidade da evolução (Wilson e Zhang 2009). Além disso, o pólen desempenha um papel crucial na otimização de culturas, produção de sementes híbridas, melhoramento de plantas e criação de diversos produtos agrícolas (Ter Steeg et al. 2022).

Portanto, o desenvolvimento de tecnologias de conservação de recursos genéticos utilizando grãos de pólen tem demonstrado potencial como uma alternativa para preservar alelos críticos para o melhoramento genético (Dinato et al. 2020). Além disso, permite a hibridação de plantas em diferentes locais e épocas, além de reduzir a transmissão de doenças quando os polinizadores são vetores. Em particular, a criopreservação de grãos de pólen tem sido empregada para superar a assincronia de floração entre linhagens parentais de interesse de várias espécies de plantas (Dinato et al. 2020). Essa abordagem foi aplicada a vários gêneros, como *Dendrobium* (Vendrame et al. 2008), *Ananas* (Silva et al. 2017) e *Psidium* (Vishwakarma et al. 2021).

Neste contexto, este estudo apresenta a primeira revisão sistemática de pesquisas realizadas até o momento sobre a criopreservação de pólen. Ele reúne informações que abrangem um período significativo de 40 anos de pesquisa sobre criopreservação de pólen em nitrogênio líquido, desde os primeiros estudos publicados em 1984 até os mais recentes de 2024. A relevância desta revisão está em sua pesquisa metódica e robusta, oferecendo uma visão abrangente do conhecimento e dos avanços nesta área ao longo das últimas quatro décadas. Esta Revisão Sistemática aborda as principais tendências e avanços metodológicos na criopreservação de pólen, fornecendo tanto percepções históricas quanto atuais sobre o campo da criopreservação de pólen. Esses estudos podem influenciar pesquisas futuras e orientar aplicações práticas nesta área de estudo.

2. Materiais e Métodos

A revisão foi conduzida com base nas diretrizes PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), seguindo três etapas principais: planejamento,

execução e sumarização. Utilizamos o software de código aberto StArt (State of the Art through Systematic Review) v.3.3 Beta 03, que facilitou a importação de referências de bases de dados e a triagem de artigos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão predefinidos. O StArt também auxiliou na extração sistemática de artigos relevantes e na remoção de duplicatas. Todas as buscas foram realizadas em 18 de dezembro de 2023, e os resultados foram importados nos formatos BIBTEX ou RIS, compatíveis com o StArt. Documentos considerados relevantes e publicados após a etapa de seleção foram incluídos manualmente.

Na fase de planejamento, foi criado um protocolo para guiar todo o processo de revisão. Este protocolo definiu o título, objetivo, palavras-chave, perguntas de pesquisa, fontes de busca, o período coberto pela pesquisa e critérios de inclusão e exclusão para os artigos. A principal pergunta de pesquisa que orientou a revisão sistemática foi: Qual é o conhecimento existente sobre a criopreservação de grãos de pólen, e quais são as técnicas/métodos mais utilizados nessa estratégia? A partir disso, foram definidas perguntas secundárias, conforme descrito na Tabela 1.

A fase de execução consistiu em três fases: busca, seleção e extração. As buscas eletrônicas foram realizadas usando uma string de busca definida com as seguintes palavras-chave: ("Criopreservação" OU "conservação em nitrogênio líquido" OU "conservação a temperaturas negativas" OU "armazenamento em nitrogênio líquido" OU "conservação de longo prazo") E ("pólen" OU "grãos de pólen"). Esta string de busca foi projetada para abranger o maior número possível de artigos sobre o tema e foi utilizada para buscas em cinco bases de dados: Springer (<https://www.springer.com>); Scopus (<https://www.scopus.com>); ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com>); Web of Science (<https://www.webofscience.com>); e CAB Direct (<https://www.cabdirect.org>).

Inicialmente, na fase de seleção, foram lidos apenas o título, o resumo e as palavras-chave, e os artigos que continham os termos definidos na string de busca no título, resumo ou palavras-chave foram selecionados. Na fase de extração, os artigos completos foram lidos e aceitos de acordo com os critérios de inclusão (I) e exclusão (E) predefinidos: (I) artigos que continham no título, resumo ou palavras-chave os termos: ("criopreservação" OU "conservação em nitrogênio líquido" OU "conservação em temperaturas negativas" OU "armazenamento em nitrogênio líquido" OU "conservação a longo prazo") E ("pólen" OU "grãos de pólen"); (E) teses, dissertações, manuais, livros, trabalhos publicados em anais de conferências; (E) artigos de revisão; (E) trabalhos não escritos em inglês; (E) trabalhos sem

contribuição clara; (E) conteúdo fora do tema; e (E) texto completo inacessível. Na fase de sumarização, gráficos e mapas foram gerados para compor e enriquecer os resultados. As frequências dos artigos em relação às perguntas descritas na Tabela 1 foram calculadas.

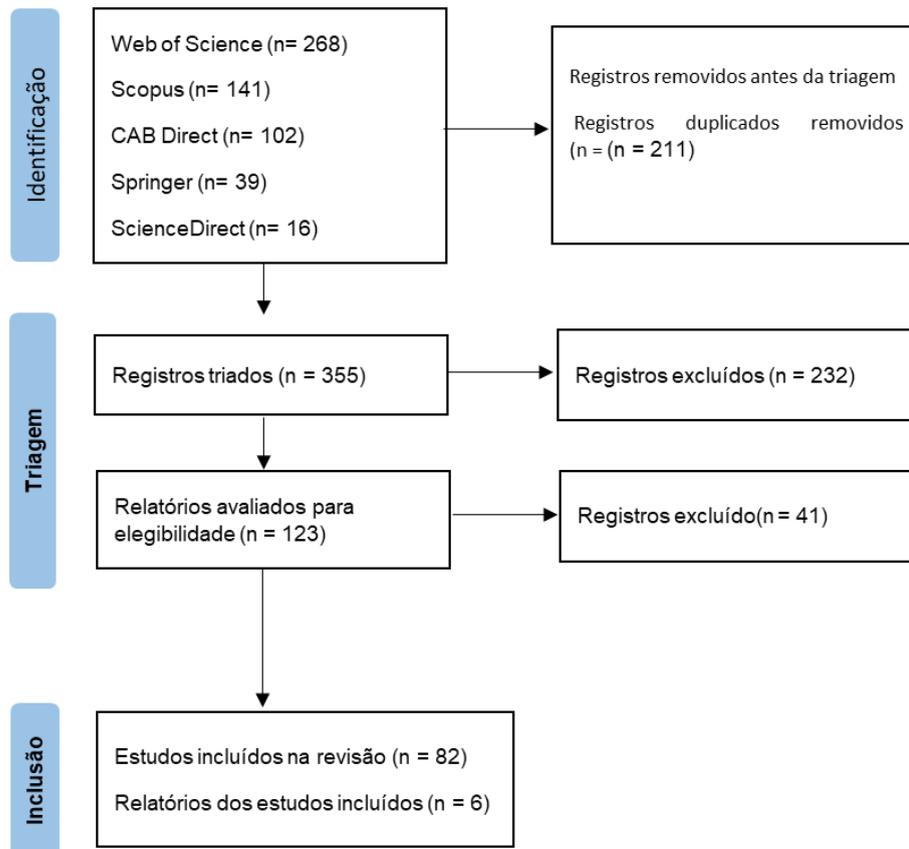
Tabela 1. Perguntas utilizadas na Revisão Sistemática para analisar os artigos encontrados sobre o tema Criopreservação de Pólen.

-
- Q1.** Quando começaram os estudos sobre criopreservação de pólen?
- Q2.** Quais periódicos publicaram artigos sobre criopreservação de pólen?
- Q3.** Quais países realizaram pesquisas sobre criopreservação de pólen até o momento?
- Q4.** Em quais culturas a técnica de criopreservação de pólen foi utilizada até agora?
- Q5.** Qual é o estágio de desenvolvimento floral utilizado para a coleta de pólen destinado à criopreservação?
- Q6.** Quais métodos de desidratação foram utilizados para a secagem do pólen?
- Q7.** Crioprotetores foram utilizados na criopreservação de grãos de pólen?
- Q8.** Por quanto tempo os grãos de pólen das espécies foram mantidos em nitrogênio líquido?
- Q9.** Quais são os principais métodos utilizados para testar a viabilidade do pólen nos estudos de criopreservação?
-

3. Resultados

3.1 Triagem dos Estudos

As buscas nas bases de dados eletrônicas utilizando o StArt resultaram na seleção de 566 artigos publicados até o momento. O Web of Science foi o maior contribuinte para esta revisão, fornecendo 268 artigos (47%). O Scopus contribuiu com 141 artigos (25%), seguido pelo CAB Direct com 102 (18%), Springer com 39 (7%) e Science Direct com 16 artigos (3%). Dentre esses, 211 foram duplicados, e 232 foram excluídos durante o processo de seleção de acordo com os critérios de exclusão predefinidos. Na fase de extração, 123 artigos foram revisados integralmente, dos quais 41 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão. Além disso, seis artigos foram incluídos manualmente na revisão por atenderem aos critérios estabelecidos para este estudo, embora tenham sido publicados após o período inicial de busca. Esses artigos adicionais foram incorporados até junho de 2024. Assim, 88 artigos foram incluídos na síntese qualitativa (Figura 1). Para fins de referência, o link para



manuscrtos e protocolos foi armazenado em uma biblioteca digital de acesso aberto em <https://doi.org/10.5281/zenodo.13279435> (acessado em 9 de agosto de 2024).

Figure 1: Diagrama de fluxo PRISMA para identificação e seleção dos estudos.

3.2 Histórico da criopreservação de pólen

O início dos trabalhos sobre criopreservação de pólen, segundo a nossa pesquisa, ocorreu em 1984, quando dois artigos pioneiros foram publicados em *Euphytica* e *American Potato Journal* (Crisp e Grout 1984; Towill 1984), abordando as culturas de brócolis (Brassicaceae) e batata (*Solanum*), respectivamente. Posteriormente, até 1988, houve uma publicação contínua de artigos sobre o tema em várias revistas, cobrindo novas culturas.

No entanto, após 1988, houve uma pausa de dois anos sem novas pesquisas, até que um novo artigo foi publicado em 1990. Esse padrão continuou até 1994 e 1996, quando novamente ocorreram lacunas nas publicações. A partir de 2000, houve um ressurgimento de interesse pela criopreservação de pólen, com um aumento significativo na publicação de artigos sobre o tema em várias revistas, cobrindo uma variedade de culturas, com novos artigos publicados a cada ano, exceto em 2001, 2004 e 2005.

Em 2019, houve um pico no número de publicações, com sete artigos, seguido por 2021 e 2023, cada um com seis artigos, e 2024 com sete artigos publicados até o momento, conforme mostrado na Figura 2. As revistas que se destacaram foram *Euphytica*, com 11 artigos sobre criopreservação de pólen, seguida por *Acta Horticulturae*, com oito artigos.

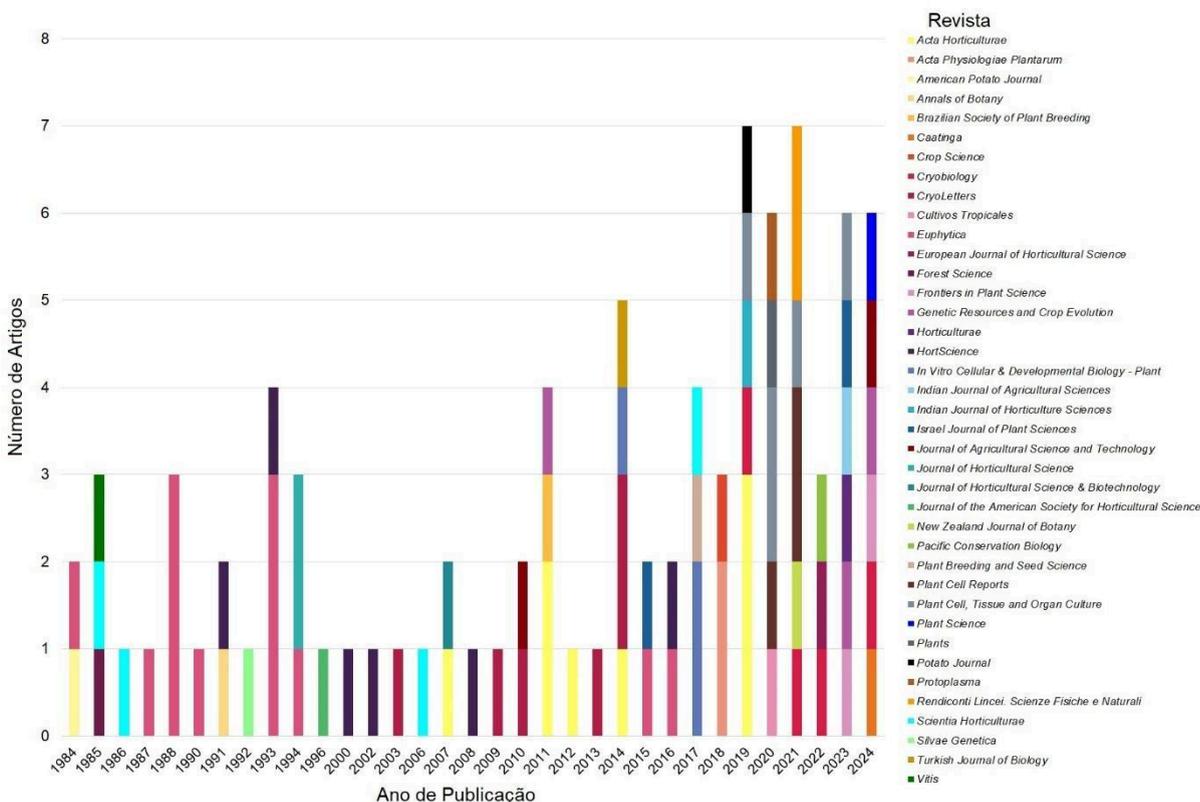


Figura 2. Número de artigos sobre criopreservação de pólen publicados até o momento, destacando o ano de publicação e o periódico. Esses dados são derivados da análise de 88 artigos identificados nesta revisão sistemática.

3.3 Principais países de pesquisa e culturas envolvidas na criopreservação de pólen

Estudos sobre criopreservação de pólen foram identificados em 19 países, com uma concentração significativa na China (21 artigos) e na Índia (19 artigos) (Figura 3). Outros países que contribuíram substancialmente para a pesquisa incluem os Estados Unidos (15 artigos) e o Brasil (8 artigos). Em relação às culturas investigadas, 37 famílias botânicas foram examinadas, com a maior frequência observada na família Poaceae, com 10 publicações, seguida por Rosaceae com oito e Solanaceae com sete. Os países com o maior número de artigos publicados, China, Índia e Estados Unidos, destacam-se pela ampla variedade de espécies estudadas, abrangendo uma diversidade de famílias botânicas.

Na categoria de plantas ornamentais, os três estudos mencionados foram realizados na China. Esses artigos (Xu et al. 2014; Jia et al. 2017; Ren et al. 2019b) focaram exclusivamente em espécies ornamentais, o que levou à inclusão de uma categoria separada na lista de famílias de plantas.

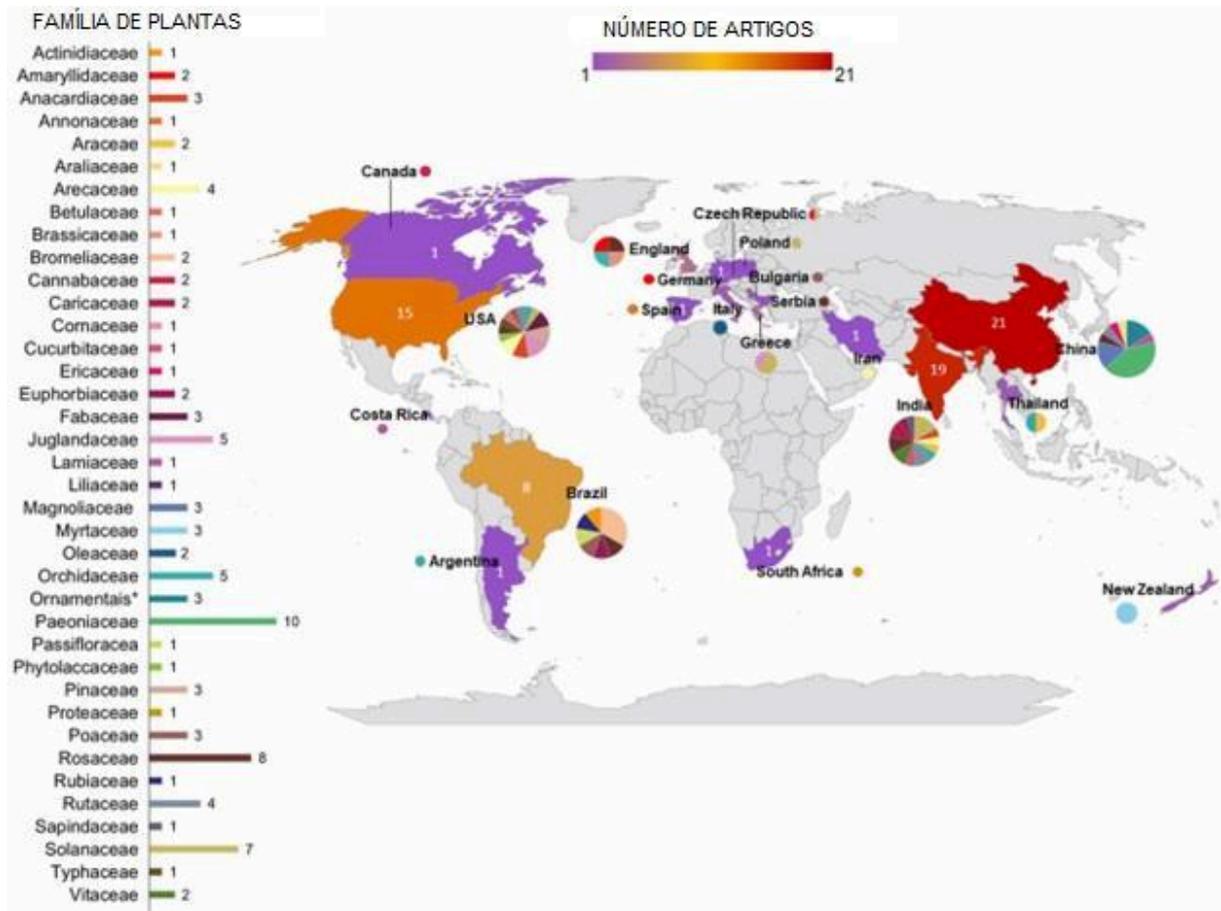


Figura 3. Número de artigos publicados até o momento sobre criopreservação de pólen em todo o mundo e principais famílias de plantas estudadas. Esses dados são derivados da análise de 88 artigos identificados nesta revisão sistemática. Os países mostrados em roxo têm o menor número de artigos. O vermelho indica países com o maior número de estudos publicados. O laranja representa países com valores intermediários entre 5 e 15 artigos publicados. A categoria ornamental incluiu as seguintes famílias: Bignoniaceae, Brassicaceae, Caprifoliaceae, Leguminosae, Liliaceae, Magnoliaceae, Oleaceae, Paeoniaceae, Rosaceae, Sapindaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae e Verbenaceae.

3.4 Estágio de desenvolvimento da flor para coleta de pólen

A escolha do estágio fisiológico adequado da flor no momento da coleta de pólen é crucial e depende de vários fatores, incluindo a espécie e as condições ambientais. Para a criopreservação de pólen, o estágio fisiológico mais comumente encontrado na literatura é a antese, relatada em 75% dos artigos, seguida pela pré-antese, identificada em 21% dos estudos. O estágio menos frequente (4%) envolveu flores em pós-antese. Na pré-antese, a flor está fechada e o botão floral não se abriu completamente, enquanto na antese, a flor está totalmente aberta e o pólen está maduro e disponível para coleta. Na pós-antese, a flor começa a murchar, e as anteras podem fornecer menos pólen.

3.5 Desidratação de grãos de pólen

Existem vários métodos para desidratar grãos de pólen para criopreservação. Nesta revisão sistemática, alguns dos principais métodos foram identificados. Os mais comuns incluem desidratação à temperatura ambiente e o uso de dessecadores com gel de sílica. Em 19 artigos, nenhum método de desidratação foi utilizado como pré-tratamento para a conservação dos grãos de pólen. Em muitos estudos, esses métodos também foram combinados para testar a melhor abordagem para otimizar os resultados na criopreservação de pólen.

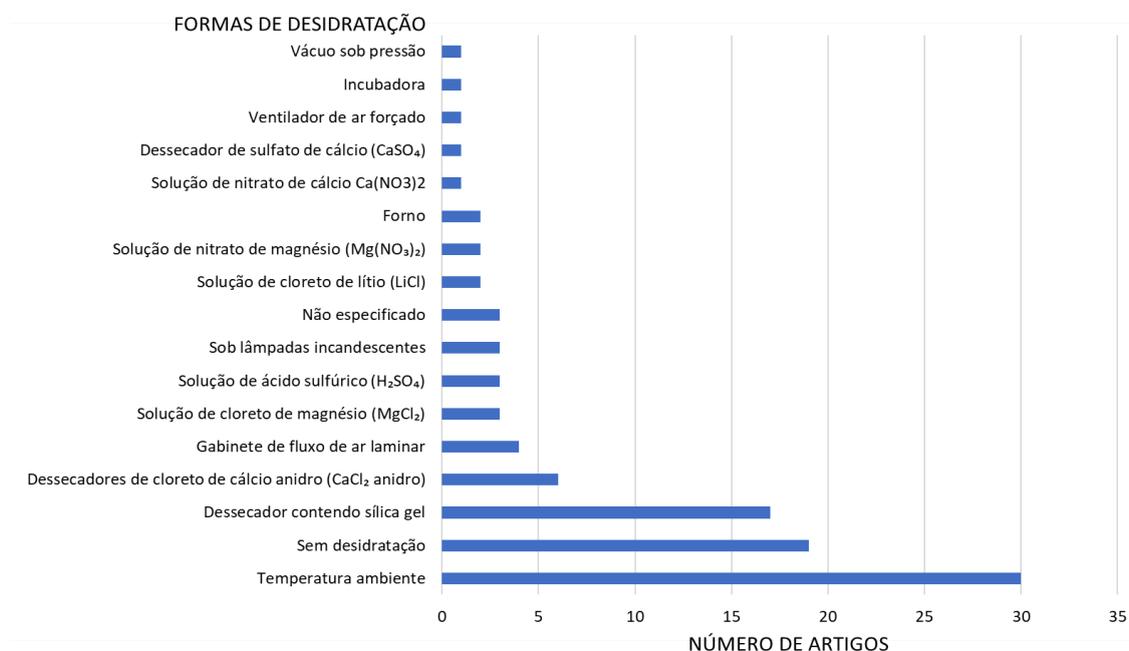


Figura 4. Métodos de desidratação de pólen em estudos de criopreservação de pólen realizados até o momento. Esses dados são derivados da análise de 88 artigos identificados nesta revisão sistemática.

3.6 Crioprotetores para criopreservação de pólen

O uso de crioprotetores é crucial na criopreservação de vários tecidos vegetais, garantindo a viabilidade e integridade celular durante os processos de congelamento e descongelamento (Roque-Borda et al. 2021). Investigamos a frequência de uso de crioprotetores na criopreservação de pólen. A maioria dos estudos não utilizou crioprotetores, representando 90% (75 artigos). Apenas em 10% dos estudos (8 artigos) os autores empregaram algum tipo de crioprotetor. Entre os crioprotetores utilizados, destacaram-se o DMSO, farinha de trigo torrada, PVS2, HSP70, gel de alginato de sódio, sacarose e glicerol.

Entre os estudos que utilizaram crioprotetores, apenas quatro demonstraram resultados positivos com este tratamento. Esses foram: farinha de trigo torrada em pólen de cannabis (Gaudet et al. 2020); HSP70 em *Paeonia lactiflora* (Ren et al. 2019a); glicerol em pólen de mamona (Tosun e Koyuncu 2007); e uma combinação de gel de alginato de sódio, solução de sacarose, glicerol e solução de PVS2, seguindo uma sequência metodológica sugerida por Jitsopakul et al. (2019) no pólen de *D. signatum* Rchb. f. Os estudos restantes relataram não haver necessidade de crioprotetores para evitar a formação de cristais de gelo e preservar a viabilidade do pólen durante a criopreservação.

3.7 Tempo de imersão do pólen em nitrogênio líquido em condições experimentais

Entre os estudos analisados, foram identificados 47 períodos distintos de imersão em nitrogênio líquido. Alguns desses períodos são relativamente curtos, como 5 minutos, conforme relatado em um artigo (Crisp e Grout 1984), enquanto outros não foram detalhados, sendo apenas mencionados como imediatos, significando que o material foi mergulhado em nitrogênio líquido e, em seguida, retirado imediatamente, como mostrado na Figura 5.

Os períodos mais comuns encontrados nos estudos de criopreservação de pólen foram de 12 meses, presentes em 25 artigos publicados, seguidos por 30 dias em 22 artigos e 6 meses em 17 artigos. Entre os artigos analisados, um estudo sobre nozes-pecãs relatou períodos de imersão de 1, 10, 11, 12 e 13 anos em nitrogênio líquido (Sparks e Yates 2002), sendo 13 anos o maior período de armazenamento encontrado. O menor período de imersão foi de 5 minutos (Crisp e Grout 1984), relatado em um artigo.

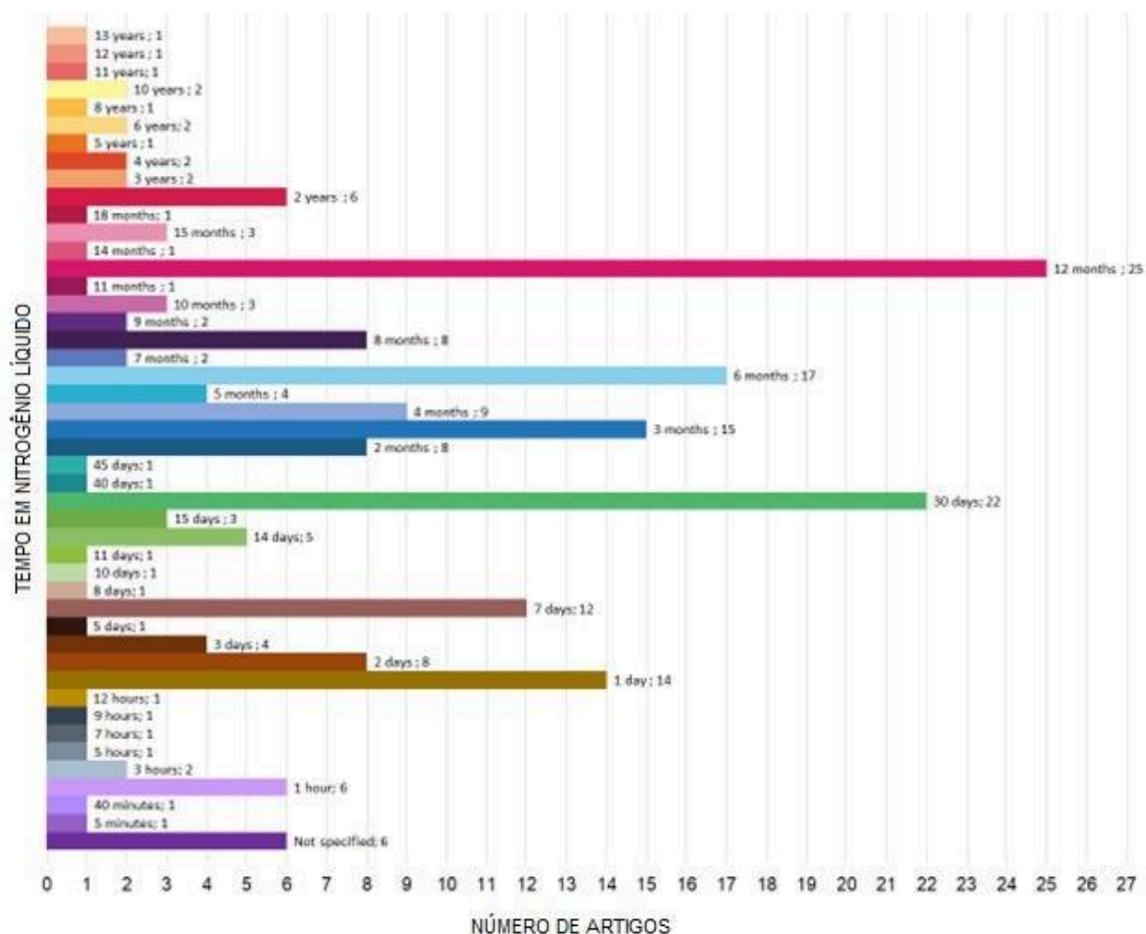
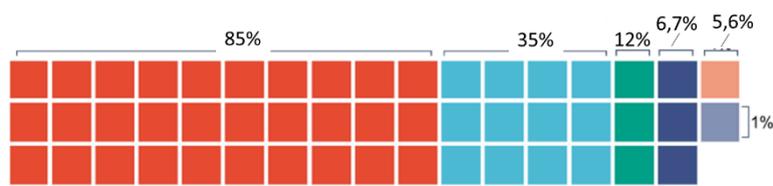


Figura 5. Tempo de imersão do pólen em nitrogênio líquido nos estudos de criopreservação de pólen realizados até a data. Esses dados são derivados da análise de 88 artigos identificados nesta revisão sistemática.

3.8 Principais métodos utilizados para testar a viabilidade do pólen em estudos de criopreservação

Os testes de viabilidade do pólen são métodos usados para avaliar o potencial do pólen de permanecer viável e germinar (Dafni & Firmage, 2000). Esses testes são cruciais em várias áreas da biologia vegetal, incluindo reprodução assistida, conservação de germoplasma e programas de melhoramento (Impe et al., 2020).

Na criopreservação de pólen, cinco métodos principais foram identificados (Figura 10), sendo a germinação *in vitro* em cultura o mais amplamente utilizado, aparecendo em 85% dos estudos analisados (76 artigos). O segundo método mais frequente foi a polinização em campo, empregada em 35% dos trabalhos (31 artigos). Embora a polinização em campo seja comumente utilizada para testar a fertilidade do pólen, foi incluída nesta lista porque todo



pólen fértil é necessariamente viável. O teste de coloração da Reação Fluorocromática (FCR) também foi encontrado em 12% dos estudos (11 artigos), seguido pelo teste de Acetocarmina, presente em 6,7% (6 artigos), e pelo teste de Tetrazólio (TTC), em 5,6% (5 artigos) e um artigo utilizou vermelho neutro (1%). Muitos artigos incorporaram mais de um desses métodos em seus estudos.

Figura 6. Testes de viabilidade do pólen mais comumente utilizados em estudos de criopreservação de pólen até o momento. Esses dados são provenientes da análise de 88 artigos identificados nesta revisão sistemática.

Considerando que o método de germinação *in vitro* em meio de cultura é amplamente utilizado, realizamos uma investigação sobre os reagentes mais comuns empregados na preparação desse meio. Descobrimos que 100% dos estudos (76 artigos) que utilizam esse método incluíam sacarose no meio de cultura, seguida pelo ácido bórico, presente em 72% dos trabalhos. Além disso, 46% dos estudos utilizaram nitrato de cálcio, 39% nitrato de potássio, 39% sulfato de magnésio, 19% ágar, 1% fosfato monopotássico, 1% polietileno glicol, 1% AIA (ácido indolacético) e 1% tiamina, conforme mostrado na Figura 7.

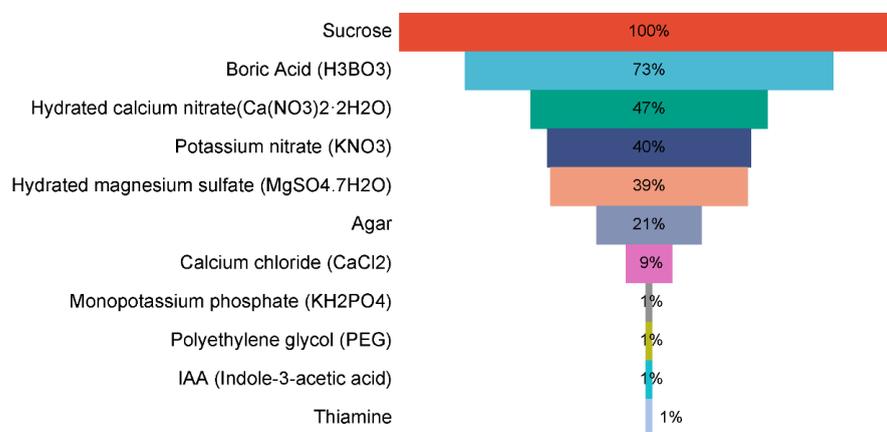


Figura 7. Principais reagentes utilizados na composição do meio de cultura para a germinação in vitro de grãos de pólen em estudos de criopreservação de pólen publicados até a presente data. Esses dados são oriundos da análise de 88 artigos identificados nesta revisão sistemática.

Em estudos de germinação in vitro de grãos de pólen para determinar a viabilidade do pólen, os parâmetros de tempo e temperatura de incubação podem variar dependendo da espécie vegetal (Volk, 2011). Nos trabalhos analisados, observou-se uma prevalência significativa de períodos de incubação de 4 e 24 horas, encontrados em 18 e 17 artigos, respectivamente. Em relação à temperatura de incubação, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ foi a mais comum, relatada em 28 estudos.

A combinação mais frequente foi um período de incubação de 4 horas a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, presente em 15 artigos. Esses resultados sugerem que essas condições proporcionaram um ambiente favorável para a germinação do pólen e o crescimento do tubo em a maioria das investigações. No entanto, vale ressaltar que um teste piloto é recomendado para otimizar o tempo e a temperatura de incubação ideais para a espécie a ser conservada.

4. Discussão

Esta Revisão Sistemática (RS) abrange 88 artigos sobre a conservação de pólen em nitrogênio líquido, explorando estratégias de criopreservação de 1984 a 2024, representando 40 anos de pesquisa neste campo. Ao incorporar um número substancial de publicações, nosso estudo visa sintetizar e discutir os principais achados, destacando tendências relevantes relacionadas ao tema proposto.

O artigo científico pioneiro sobre a criopreservação de pólen foi publicado por Crisp e Grout em março de 1984, intitulado "Armazenamento de pólen de brócolis em nitrogênio líquido," na revista *Euphytica*. Este trabalho descreveu um protocolo bem-sucedido para a criopreservação de pólen de brócolis, lançando as bases para pesquisas subsequentes sobre a criopreservação de pólen e seu potencial para a conservação de recursos genéticos vegetais.

O método de criopreservação desenvolvido neste estudo envolveu a coleta de pólen na antera e a imersão do pólen em nitrogênio líquido por 5 minutos, uma duração identificada como indefinida (Mumford e Grout, 1978). O pólen criopreservado foi utilizado para polinização em campo, onde a formação de sementes foi observada, e essas sementes foram

então submetidas a testes de germinação. Essas etapas são cruciais para validar um protocolo de conservação de pólen.

O tempo de imersão dos grãos de pólen em nitrogênio líquido é considerado indefinido porque o metabolismo celular diminui drasticamente à temperatura ultrabaixa de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, levando à cessação das reações químicas e degradação que normalmente ocorreriam ao longo do tempo. Portanto, enquanto o pólen permanecer imerso em nitrogênio líquido e for mantido em condições adequadas, ele pode teoricamente permanecer viável por um período indefinido, tornando o tempo de armazenamento essencialmente ilimitado (Mumford e Grout, 1978; Benson et al., 2008; Langedijk et al., 2023).

Essa redução no metabolismo celular, alcançada com um curto tempo de imersão em nitrogênio líquido, permitiu o teste de novos protocolos ou a avaliação de novas abordagens, como observado em muitos dos estudos analisados aqui, conforme indicado na Figura 8, com períodos de imersão inferiores a 24 horas.

Em maio do mesmo ano, um segundo artigo foi publicado, por Towill (1984) no *American Potato Journal*, intitulado "Formação de sementes com pólen de batata armazenado em baixas temperaturas." Este estudo foi realizado utilizando cultura de batata e introduziu novas abordagens para a criopreservação de pólen, marcando um avanço significativo no campo. O estudo incluiu armazenamento prolongado em nitrogênio líquido por períodos de 11 e 24 meses, processos de desidratação usando CaCl_2 anidro, bem como germinação *in vitro* em um meio de cultura específico e testes de polinização em campo, que resultaram na formação bem-sucedida de frutos e sementes viáveis.

Nos anos seguintes, a pesquisa sobre o tema continuou a avançar com a publicação de uma série de artigos em várias revistas, aplicando os métodos a novas espécies. Esses estudos mais recentes descreveram adaptações dos protocolos, uma vez que o sucesso da criopreservação está intimamente ligado a uma gama de variáveis. Estas incluem fatores genotípicos, o estágio fisiológico do pólen, métodos de desidratação e a escolha adequada dos métodos para avaliar a viabilidade do pólen.

Em relação à coleta de pólen para criopreservação, na maioria dos estudos investigados, o pólen foi coletado durante a antera floral (Figura 4), que é quando uma flor está totalmente aberta e suas estruturas reprodutivas estão expostas e prontas para a polinização. Diferentes estudos de biologia reprodutiva também descreveram que durante a antera, o pólen apresenta taxas de viabilidade mais altas, o que é importante para sincronizar com a abertura da flor, crucial para atrair polinizadores e garantir maior sucesso na

reprodução (Srikanth e Schmid, 2011; Cheng et al., 2021; Dellinger et al., 2023). Isso explica os achados aqui, onde a antera floral foi considerada favorável para a coleta de pólen na maioria dos estudos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos sobre viabilidade do pólen com *Tillandsia* (Bromeliaceae) (Souza et al., 2021) e *Lymania* (Mota et al., 2024), onde, após incubação em um meio de cultura específico, o pólen coletado durante a antera geralmente mostrou percentuais de germinação e comprimentos de tubo de pólen mais altos.

Após a coleta de pólen, outra etapa importante na criopreservação é o processo de desidratação. A maioria dos tecidos vegetais contém altos níveis de água intracelular e deve ser desidratada antes da exposição ao nitrogênio líquido (Walters e Pence, 2020; Faltus et al., 2024). De acordo com Dinato et al. (2020), os principais métodos para remover água congelável usados na desidratação do pólen são gel de sílica, soluções salinas saturadas, cabines de fluxo de ar e estufas. Esta revisão mostra que os métodos de desidratação mais comumente identificados nos artigos foram a exposição à temperatura ambiente e dessecadores contendo gel de sílica (Figura 5).

O gel de sílica é amplamente utilizado para a desidratação do pólen em estudos científicos devido à sua capacidade de absorver rapidamente a umidade do ambiente, mantendo a integridade e viabilidade do pólen, e por sua melhor repetibilidade em comparação com outros métodos (Silva et al., 2017; Souza et al., 2015; Souza et al., 2018; Dinato et al., 2020).

A desidratação adequada para criopreservação depende de alcançar um teor de água que assegure a formação de um estado vítreo, tanto durante o resfriamento quanto durante o descongelamento. Algumas plantas sobrevivem a temperaturas frias por meio do que é chamado de tolerância ao congelamento, onde a formação de gelo extracelular facilita a solidificação das células em um estado vítreo, auxiliando na sobrevivência após o descongelamento, em vez de danificar a formação de gelo intracelular. Um mecanismo semelhante pode ser empregado para grãos de pólen, especialmente quando eles sobrevivem à secagem e alcançam o estado vítreo; neste caso, pode-se afirmar que o pólen é tolerante à desidratação (Zachariassen e Kristiansen, 2000). A nucleação de moléculas de água leva à formação de cristais de gelo, que podem romper as membranas celulares, causando morte, o que pode ocorrer com o pólen se a desidratação for ineficiente na remoção da água congelável. A eficiência de um protocolo de desidratação é crucial para alcançar um nível aceitável de sobrevivência do explante, neste caso, o pólen. Portanto, os protocolos de criopreservação devem ser ajustados para levar em conta a quantidade de água osmótica ou

ligada para maximizar a viabilidade pós-descongelamento dos materiais (Ter Steeg et al., 2022).

A desidratação à temperatura ambiente geralmente envolve temperaturas irregulares, com interferência da umidade relativa e baixa reprodutibilidade. No entanto, de acordo com os estudos identificados aqui, tem sido eficaz em muitos casos. Isso pode estar ligado ao equilíbrio adequado de umidade no pólen, que é alcançado mais rapidamente em comparação com sementes, por exemplo (Franchi et al., 2011). Assim, o uso de dessecadores de gel de sílica pode controlar de maneira mais precisa a uniformidade do processo de desidratação (Sherlock et al., 2005). No entanto, a tolerância do pólen à desidratação também está relacionada à morfologia (Ejsmond et al., 2011; Matamoro-Vidal et al., 2016), o que muitas vezes requer estudos adicionais e otimização de protocolos (Ferreira et al., 2024; Faltus et al., 2024).

A desidratação do material a ser preservado também pode ser alcançada quimicamente, utilizando soluções crioprotetoras altamente concentradas, especialmente aquelas que contêm sacarose e glicerol (Bhat et al., 2012; Souza et al., 2018). De acordo com os artigos incluídos aqui, o uso de crioprotetores raramente é necessário, uma vez que seu uso não foi mencionado em 90% dos estudos. Dos 10% restantes de artigos, apenas metade (5%) mostrou resultados positivos com o uso de crioprotetores. Assim, a desidratação usando componentes físicos, especialmente gel de sílica, é o pré-tratamento recomendado para a grande maioria das espécies em estudos de criopreservação de pólen.

Outro aspecto importante da criopreservação é a duração da exposição do material ao nitrogênio líquido. O período mais longo estudado nesta revisão foi de 13 anos, envolvendo pólen de noz-pecã (Sparks e Yates, 2002), e o menor tempo de imersão em nitrogênio líquido foi de 5 minutos, conforme relatado no artigo de Crisp e Grout (1984). Os resultados confirmaram que armazenar pólen em nitrogênio líquido preservou a viabilidade da maior parte do pólen, comparável à do pólen coletado recentemente. Esses achados indicam que a técnica de criopreservação permite a preservação de materiais biológicos por períodos prolongados, e o nitrogênio líquido fornece um ambiente de armazenamento estável e previsível, essencial para a pesquisa científica e a conservação de recursos genéticos (Dinato et al., 2020; Verzhuk et al., 2023).

Na realidade, estudos mais definitivos sobre a manutenção da viabilidade do pólen ao longo de longos períodos de armazenamento (mais de 10 anos) ainda são limitados e requerem investigação adicional. No entanto, a criopreservação de pólen oferece benefícios

significativos em várias áreas de estudo. Períodos de armazenamento de curto prazo também podem ser empregados para fins como reprodução, intercâmbio ou melhoramento genético por meio da hibridização. Também é uma forma de avaliar rapidamente a eficácia do protocolo antes de investir recursos significativos em experimentos de longo prazo (Silva et al., 2017; Souza et al., 2018; Ferreira et al., 2024).

O tempo de imersão de materiais biológicos em nitrogênio líquido em ensaios experimentais, para garantir uma redução significativa no metabolismo celular, varia dependendo do tipo de material, do protocolo de criopreservação e das condições de armazenamento específicas. O tempo de imersão em nitrogênio líquido para desenvolvimento ou ajustes de protocolo deve assegurar uma quase completa cessação do metabolismo celular para prevenir a degradação do tecido congelado (Lambardi et al., 2008). Este procedimento é essencial para corroborar os resultados alcançados pelo trabalho proposto e para possibilitar a recomendação do protocolo. Se os resultados obtidos forem consistentes, podem ser aplicados para armazenar com sucesso esses materiais por longos períodos, mesmo décadas, em nitrogênio líquido (Dinato et al., 2020).

Um passo essencial no protocolo de criopreservação de pólen é o teste de viabilidade do pólen, que avalia se o pólen está vivo e capaz de germinar. Outro fator crítico é a fertilidade do pólen, que se refere à sua capacidade de alcançar a fertilização e produzir sementes viáveis (Dafni e Firmage, 2000). Os testes de fertilidade são frequentemente combinados com testes de viabilidade, como observado em vários estudos. Esses testes são fundamentais em áreas como reprodução assistida, conservação de germoplasma e programas de melhoramento genético.

Entre as técnicas mais comuns para avaliar a viabilidade do pólen estão a coloração, a germinação *in vitro* e a germinação estigmática (Dickinson et al., 2018; Impe et al., 2020; Weng et al., 2023). No entanto, em muitos casos, os resultados da coloração do pólen não se correlacionam com as taxas de germinação, uma vez que o pólen pode reter atividade metabólica, mas perder a capacidade de germinar (Wang et al., 2021). Em outras palavras, o pólen pode manter funções metabólicas básicas, como respiração e produção de energia, enquanto perde a capacidade de germinar e falha em iniciar ou completar o processo de crescimento do tubo polínico necessário para a fertilização.

Nos estudos de criopreservação de pólen analisados, cinco métodos principais foram identificados, sendo a germinação *in vitro* em um meio de cultura o mais proeminente, aparecendo em 61% dos artigos. Este método é amplamente utilizado porque fornece uma

estimativa rápida da viabilidade do pólen (Burke et al., 2004), permitindo a observação da germinação e do crescimento do tubo polínico, o que pode indicar potencial de fertilização. As estimativas de viabilidade obtidas por meio da germinação *in vitro* (Impe et al., 2020) são consideradas mais precisas em comparação com os métodos de coloração, que podem superestimar ou subestimar os resultados (Sulusoglu et al., 2014; Li et al., 2023).

O segundo método mais comum encontrado em nossa pesquisa foi a polinização *in vivo*, observada em 23% dos artigos publicados (26 artigos). Os testes de polinização *in vivo* são experimentos realizados para estudar os processos e mecanismos envolvidos na polinização diretamente no ambiente natural ou em condições controladas que simulam a natureza (Tosun e Koyuncu, 2007; Cheung et al., 2010). Esses testes são os mais confiáveis, pois podem identificar vários fatores importantes, como compatibilidade do pólen, barreiras reprodutivas (pré-zigóticas e pós-zigóticas) e produção de sementes e frutos (Pellegrino, 2016; Munguía-Rosas et al., 2023; Mota et al., 2023; Ferriol et al., 2023). Assim, o teste *in vivo* é considerado o método mais conclusivo para validar o protocolo, uma vez que avalia tanto a viabilidade quanto a fertilidade do pólen, já que todo pólen fértil é necessariamente viável.

Por outro lado, os testes de polinização *in vivo* são considerados mais trabalhosos em comparação com outros métodos de avaliação da viabilidade do pólen. Testes como a coloração por tetrazólio, a germinação *in vitro* e a análise de viabilidade microscópica podem ser realizados em condições laboratoriais controladas, apresentando menos variabilidade ambiental e biológica e exigindo menos tempo de monitoramento (Vishwakarma et al., 2021; Langedijk et al., 2023). O processo de polinização manual, que envolve remover o pólen do armazenamento em nitrogênio e aplicá-lo a flores receptivas, é demorado e delicado, exigindo conhecimento prévio do comportamento de hibridação convencional. Cada etapa deve ser realizada com cuidado para evitar danos à planta e garantir que não haja contaminação por outro pólen. Após a polinização, é necessário monitorar o desenvolvimento dos frutos e sementes, o que pode levar dias, semanas ou até meses, dependendo da espécie. Além disso, a polinização *in vivo* requer habilidade para garantir que o pólen seja aplicado corretamente e que a fertilização ocorra com sucesso (Du et al., 2019; Kadri et al., 2022; Wan et al., 2024).

No entanto, em muitos casos, os resultados da coloração do pólen não se correlacionam com a taxa de germinação, pois o pólen pode manter a capacidade metabólica, mas perder a capacidade de germinar (Wang et al., 2021). Em outras palavras, o pólen pode reter funções metabólicas básicas, como respiração e produção de energia, enquanto perde a

capacidade de germinar e falha em iniciar ou completar o processo de crescimento do tubo polínico necessário para a fertilização.

No melhoramento genético de espécies frutíferas, é crucial usar um método apropriado para determinar a viabilidade do pólen (Radičević et al., 2013). Devido à sua facilidade e eficácia, os testes de germinação *in vitro* têm sido amplamente utilizados para esse fim. Há uma relação linear entre a viabilidade do pólen e a capacidade de germinação em muitas espécies frutíferas, pois o pólen que não germina frequentemente apresenta baixo crescimento do tubo polínico, tornando-se ineficaz para a fertilização (Sulusoglu et al., 2014). Portanto, para avaliar a quantidade real de pólen viável, os testes de germinação *in vitro* são confiáveis e, assim, recomendados.

Para que o método de germinação *in vitro* seja eficaz, é essencial usar um meio de cultura apropriado para a espécie estudada. Mesmo que o pólen esteja na fase fisiológica adequada, ainda requer um meio de cultura específico para germinação e crescimento do tubo polínico. Como resultado, os pesquisadores têm investigado cada vez mais diferentes meios de germinação para o pólen (Lin et al., 2017; Ferreira et al., 2021; Li et al., 2023). Brewbaker e Kwack (1963) desenvolveram um dos primeiros meios de cultura abrangentes para pólen, adequado para 39 famílias de plantas, que tem sido amplamente utilizado em experimentos de germinação de pólen com várias espécies. Este meio contém diferentes concentrações de nitrato de cálcio, nitrato de potássio, sulfato de magnésio, sacarose e ácido bórico, sendo a sacarose, o ácido bórico e o nitrato de cálcio considerados os componentes mais essenciais para os grãos de pólen (Li et al., 2023). Isso está em linha com os achados desta revisão sistemática, na qual a sacarose foi mencionada em 100% dos artigos que utilizaram a germinação *in vitro*, seguida pelo ácido bórico e nitrato de cálcio, relatados em 72% e 46% dos estudos, respectivamente.

A sacarose é crucial para o crescimento do tubo polínico, uma vez que fornece a energia necessária e ajuda a manter o equilíbrio osmótico, prevenindo a desidratação prejudicial do pólen (Lin et al., 2017; Li et al., 2020). Além disso, a sacarose atua como um sinal químico que estimula a germinação e o crescimento do tubo polínico, imitando as condições naturais encontradas nos estigmas das flores (Hirose et al., 2014; Jia et al., 2022). O ácido bórico promove o crescimento e a alongação do tubo polínico, regulando o metabolismo do cálcio, o que contribui para a estabilidade da membrana, facilita a formação adequada do citoesqueleto e a deposição de pectina na parede celular, melhorando a taxa de germinação e a

viabilidade do pólen (Fang et al., 2019; Ren et al., 2022). Essas funções criam um ambiente favorável, essencial para o desenvolvimento saudável do pólen no meio de cultura.

A germinação do pólen é altamente sensível, não apenas aos componentes do meio de cultura, mas também a fatores como tempo e temperatura (Lin et al., 2017; Fragallah et al., 2019). Assim, em estudos de germinação *in vitro* do pólen, os parâmetros de tempo e temperatura de incubação podem variar dependendo da espécie, principalmente associados a diferenças genéticas e ao clima da origem da espécie (Lin et al., 2017; Beltrán et al., 2019). Portanto, uma gama de tempos e temperaturas de incubação pode ser encontrada, mesmo entre espécies da mesma família botânica (Beltrán et al., 2019). Nos trabalhos que compõem esta revisão sistemática, essa diversidade pode ser observada; no entanto, a combinação mais comum que predominou na maioria dos estudos foi: 4 horas de incubação a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. De acordo com Volk (2011), a faixa de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ é frequentemente recomendada para a maioria das espécies vegetais.

5. Mecanismos de Danos ao Pólen Durante a Criopreservação

O sucesso da criopreservação é, por vezes, limitado pela redução da viabilidade do pólen após o descongelamento. Os mecanismos subjacentes aos danos ao pólen durante a criopreservação são complexos, envolvendo vários fatores bioquímicos e celulares, como a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), a peroxidação lipídica e, mais recentemente, a morte celular programada (PCD) (Poobathy et al. 2013; Xu et al. 2014; Chen et al. 2015; Mittler 2017).

5.1 Danos Oxidativos e Estresse Induzido por ERO

Estudos mostram que o estresse oxidativo, mediado pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), é um dos principais mecanismos de danos ao pólen durante e após a criopreservação (Poobathy et al. 2013; Chen et al. 2015). Como moléculas sinalizadoras, as ERO desempenham um papel crucial no suporte à proliferação celular e à função fisiológica, tornando a manutenção de um nível basal de ERO essencial (Xu et al. 2014; Mittler 2017). No entanto, a produção excessiva de ERO é altamente reativa e tóxica (Mittler 2017). Durante o armazenamento criogênico, níveis elevados de ERO podem levar a danos celulares, como a oxidação de lipídios e proteínas de membrana, comprometendo a integridade celular e, conseqüentemente, a viabilidade do pólen (Ren et al. 2021; Ren et al. 2022). Um estudo

envolvendo 20 espécies de plantas ornamentais revelou variações significativas na viabilidade do pólen após o criarmazenamento, com algumas espécies apresentando danos oxidativos severos (Jia et al. 2017). A peroxidação lipídica e o aumento de ERO foram associados à redução da viabilidade do pólen em várias espécies, indicando que o estresse oxidativo é um fator-chave na deterioração pós-criopreservação.

Além disso, a capacidade antioxidante do pólen pode influenciar diretamente a extensão dos danos induzidos por ERO. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) desempenham um papel crucial na neutralização das ERO (Ren et al. 2021). Em estudos com *Paeonia suffruticosa*, foi demonstrado que cultivares com maior viabilidade pós-criopreservação apresentavam sistemas antioxidantes mais eficientes para eliminar ERO, levando a uma redução da peroxidação lipídica e a uma maior viabilidade pós-criopreservação (Ren et al. 2021).

5.2 Morte Celular Programada (PCD)

Estudos indicam que a morte celular programada (PCD) ocorre em resposta ao estresse causado pelo congelamento do pólen e pelo subsequente descongelamento (Ren et al. 2021; Ren et al. 2020). Em um estudo sobre o pólen de seis cultivares de *Paeonia suffruticosa*, a viabilidade pós-criopreservação variou, com algumas cultivares apresentando maior viabilidade do que o pólen fresco, enquanto outras mostraram uma redução significativa (Ren et al. 2020). No último grupo, foi observado um aumento na geração de ERO e atividade enzimática semelhante à caspase-3, uma enzima associada à via apoptótica da PCD. Esses achados sugerem uma correlação negativa entre a taxa de apoptose e a viabilidade do pólen, indicando que o processo de PCD está envolvido nas variações de viabilidade após a criopreservação.

5.3 O Papel dos Íons de Cálcio (Ca²⁺) na Morte Celular Programada (PCD)

Os íons de cálcio (Ca²⁺) desempenham um papel crucial na regulação de vários processos celulares, incluindo a PCD (Ren et al., 2021a; Ren et al., 2022a; Ren et al., 2022b). Estudos recentes sugerem que o aumento do Ca²⁺ intracelular pode desencadear a PCD no pólen durante a criopreservação (Ma et al. 2024). Em um estudo com pólen de *Paeonia lactiflora* 'Fen Yu Nu', foi observada um aumento significativo na concentração de Ca²⁺ após a

criopreservação, o que afetou diretamente a geração de ERO e a atividade de proteases semelhantes à caspase-3 e caspase-9, ambas envolvidas na ativação da PCD (Ren et al. 2022).

A regulação dos níveis de Ca^{2+} durante a criopreservação está intimamente associada à viabilidade do pólen. A aplicação do quelante de Ca^{2+} EGTA, que inibe a entrada de Ca^{2+} , reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuiu a atividade de enzimas relacionadas à PCD. Em contraste, níveis aumentados de Ca^{2+} intracelular, induzidos pelo transportador de Ca^{2+} A23187, aceleraram a PCD, levando a uma redução no potencial de membrana mitocondrial e ao aumento da apoptose. Esses resultados indicam que a modulação dos níveis de Ca^{2+} pode servir como uma estratégia eficaz para mitigar danos celulares e aumentar a viabilidade do pólen após a criopreservação (Ren et al. 2022).

5.4 Mecanismos Moleculares e Regulação de Proteínas

A criopreservação mostrou impactar as vias moleculares associadas à regulação de proteínas, influenciando a expressão gênica, bem como os mecanismos de tradução e pós-tradução (Xu et al. 2018). Em um estudo com *Magnolia denudata*, foram observadas alterações na expressão de genes relacionados à regulação de proteínas, como enoil-ACP redutase e desidrogenase putativa, tanto durante quanto após a criopreservação (Xu et al. 2018). Embora os níveis de mRNA desses genes tenham diminuído aproximadamente 50% após o armazenamento em LN, as alterações correspondentes na abundância de proteínas não se alinharam com as alterações nos níveis de mRNA, sugerindo que o controle da expressão gênica durante a criopreservação ocorre em nível translacional ou pós-traducional.

A discrepância observada entre os níveis de mRNA e proteínas sugere que, durante a criopreservação, o pólen pode ativar mecanismos moleculares específicos para regular a produção e função de proteínas, potencialmente como um meio de proteger a célula contra danos induzidos por estresse. A regulação translacional e pós-traducional pode ser uma estratégia crítica na resposta adaptativa das células de pólen ao estresse criogênico.

5.5 A Via Mitocondrial da PCD

A via mitocondrial da PCD é outra área crítica de investigação no contexto da criopreservação do pólen. As mitocôndrias desempenham um papel central na regulação da PCD, controlando o fluxo de Ca^{2+} e a geração de energia (Ren et al., 2021a; Ren et al., 2022a; Ren et al., 2022b). Estudos em *Paeonia lactiflora* mostraram que o acúmulo excessivo de Ca^{2+}

nas mitocôndrias, particularmente em cultivares com altos níveis de PCD após a criopreservação, desencadeia a abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP), levando a uma respiração celular comprometida e redução da produção de ATP. Em contraste, cultivares com menor PCD mostraram um controle mais eficiente da entrada de Ca^{2+} , preservando a função mitocondrial e mantendo a viabilidade do pólen (Ma et al. 2024). Esses resultados indicam que a via mitocondrial da PCD é ativada em resposta ao acúmulo de ERO e à disfunção do transporte de Ca^{2+} , destacando a importância da homeostase mitocondrial na manutenção da viabilidade celular durante a criopreservação.

6. Lacunas na Pesquisa sobre Criopreservação de Pólen

6.1 Espécies Silvestres

A maioria dos estudos sobre criopreservação de pólen concentra-se em um número relativamente pequeno de espécies, apesar de as famílias de plantas que produzem pólen, especialmente as angiospermas, abrangerem uma ampla diversidade. Este grupo inclui a maioria das plantas com flores. Os esforços de pesquisa são frequentemente direcionados a espécies de importância agrícola, deixando uma lacuna significativa nos dados sobre espécies silvestres, que podem ter requisitos diferentes para armazenamento e viabilidade.

A conservação de espécies de plantas silvestres desempenha um papel importante na preservação da biodiversidade, pois representam um reservatório genético essencial para a adaptação às mudanças climáticas e para a melhoria das espécies cultivadas. Essa diversidade genética é essencial para aumentar a resiliência das culturas, garantindo a segurança alimentar futura. Além disso, muitas plantas silvestres são fontes potenciais de novos medicamentos, alimentos e outros produtos economicamente valiosos. Vários estudos destacaram a importância das espécies silvestres, incluindo: espécies silvestres de *Solanum* (Anushma et al., 2023); espécies silvestres de *Luffa* (Nagar et al., 2023); berinjela e seus parentes silvestres (Rajasekharan et al., 2023); espécies silvestres de *Glycine* (Tyagi e Hymowitz, 2003); espécies silvestres de *Allium* (Senula e Keller, 2013); espécies silvestres de *Psidium* (Vishwakarma et al., 2021); acessões de abacaxi silvestre (Silva et al., 2017); e espécies silvestres de *Passiflora* L. (Ferreira et al., 2024).

6.2 Longevidade do Pólen em Armazenamento de Longo Prazo Além de Uma Década

Há uma falta significativa de dados sobre a longevidade do pólen durante o armazenamento prolongado. Embora pesquisas tenham demonstrado que o pólen pode manter sua viabilidade após a criopreservação, a maioria dos estudos foca em períodos relativamente curtos, geralmente de um a dois anos. Poucos estudos investigaram a viabilidade e/ou fertilidade do pólen após mais de uma década de armazenamento em nitrogênio líquido. Nesta revisão sistemática, apenas dois estudos com essa abordagem foram identificados, nos quais o pólen foi armazenado por dez a treze anos (Sparks e Yates, 2002; Ren et al., 2019). Ambos os estudos investigaram a viabilidade do pólen, e um deles incluiu aspectos morfológicos; no entanto, fatores críticos, como a fertilidade com formação de frutos, que são essenciais na conservação do pólen, não foram investigados.

Em geral, mais pesquisas sobre as diversas mudanças no pólen após a criopreservação de longo prazo precisam ser exploradas para expandir o alcance das aplicações da tecnologia de criopreservação de pólen. A falta de dados sobre esse aspecto pode limitar a compreensão mais profunda dos impactos do armazenamento prolongado nas estruturas celulares e na funcionalidade do pólen. Esse conhecimento é crítico para otimizar as condições de armazenamento e garantir a aplicação bem-sucedida da criopreservação tanto em esforços de conservação quanto em práticas agrícolas, onde a viabilidade e funcionalidade do pólen são essenciais para a reprodução e preservação genética.

6.3 Fertilidade e Crescimento das Plantas Geradas

Outro aspecto que recebeu atenção limitada no contexto da criopreservação de pólen é como essa condição de armazenamento pode influenciar a fertilidade e o crescimento das plantas resultantes. Embora a criopreservação tenha mostrado ser eficaz na preservação da viabilidade do pólen, uma lacuna significativa permanece em nossa compreensão de como essa técnica afeta o sucesso reprodutivo e a qualidade da progênie. Fatores como a taxa de germinação do pólen, sua capacidade de fertilização e o desenvolvimento de frutos e sementes viáveis devem ser investigados.

Em nossa revisão, identificamos apenas um estudo que abordou esse aspecto particular. Crisp e Grout (1984) avaliaram os efeitos da criopreservação no pólen de brócolis armazenado em nitrogênio líquido, examinando tanto a primeira quanto a segunda gerações de progênie derivadas da fertilização com pólen criopreservado. Seus resultados indicaram que o pólen manteve sua viabilidade após o descongelamento e produziu sementes com sucesso. No entanto, essas sementes exibiram vigor reduzido e longevidade diminuída.

Nenhuma alteração genética foi detectada nas plantas resultantes, sugerindo que os danos observados eram de natureza fisiológica, e não genética. Este estudo destaca a importância de investigar mais a fundo os impactos fisiológicos de longo prazo da criopreservação do pólen nas gerações subsequentes de plantas.

Isso sugere que a criopreservação do pólen é geralmente considerada um método seguro para a conservação genética. No entanto, estudos adicionais e pesquisas mais detalhadas são necessárias para obter uma compreensão mais profunda sobre os possíveis danos fisiológicos e genéticos não letais que podem resultar do armazenamento criogênico. Em outras palavras, investigar possíveis alterações que, embora não causam morte imediata ou inviabilidade, podem afetar o funcionamento normal do pólen ou das plantas que ele gera.

6.4 Criopreservação entre Pólen Bicelular e Tricelular

Embora tenha havido avanços significativos na criopreservação de pólen, poucos estudos abordaram especificamente o impacto dos diferentes estados de dispersão do pólen (bicelular ou tricelular) na eficácia desses processos de preservação. A maioria das pesquisas se concentrou em aspectos gerais da preservação do pólen, com ênfase na preservação da viabilidade e capacidade de fertilização ao longo do tempo, sem analisar plenamente as implicações estruturais. Uma análise mais aprofundada de como os estados de dispersão do pólen influenciam os resultados da criopreservação poderia levar a avanços significativos nas técnicas empregadas, potencialmente melhorando a eficiência e as taxas de sucesso do armazenamento de pólen a longo prazo.

O teor de umidade do pólen desempenha um papel crucial na determinação de sua viabilidade após armazenamento em temperaturas baixas e ultra-baixas (Impe et al., 2022). Esse fator é influenciado pelos estágios de desenvolvimento e maturação do pólen durante a dispersão, incluindo os tipos de pólen bicelular e tricelular (Bajaj, 1987).

O pólen bicelular e tricelular apresenta diferenças fundamentais em sua estrutura e desenvolvimento que podem afetar sua tolerância à criopreservação (Gaudet et al., 2020). O pólen bicelular, que é resistente à dessecação e considerado ortodoxo, geralmente pode suportar a dessecação até um teor de umidade de 11% (Towill, 1985). No entanto, quando o teor de umidade cai abaixo de 10%, a viabilidade do pólen diminui significativamente. Esse tipo de pólen ainda precisa completar uma segunda mitose no estilete durante o crescimento do tubo polínico para formar as duas células espermáticas (Saito et al., 2002; Williams et al., 2014). Em contraste, o pólen tricelular, que já contém ambas as células espermáticas e a

célula vegetativa pronta para a germinação (Saito et al., 2002; Franchi et al., 2002; Williams et al., 2014), é mais sensível à desidratação devido ao seu estágio de desenvolvimento mais avançado e maior complexidade celular (Towill et al., 2000). O metabolismo mais ativo do pólen tricolpado (Towill et al., 2000) o torna mais suscetível ao estresse, resultando em uma vida útil mais curta em comparação ao pólen bicelular (Impe et al., 2022).

A criopreservação, por outro lado, pode se mostrar uma alternativa promissora para estender a viabilidade do pólen tricolpado, que é mais sensível aos métodos de armazenamento convencionais. Ao minimizar a atividade metabólica por meio de temperaturas ultra-baixas, a criopreservação pode ajudar a mitigar a vulnerabilidade do pólen tricolpado ao estresse, preservando sua viabilidade por períodos mais longos do que os permitidos por técnicas de armazenamento tradicionais. Essa abordagem tem um potencial significativo para melhorar a conservação de longo prazo de espécies que possuem pólen tricolpado, particularmente aquelas de importância agrícola e ecológica.

7. Conclusão

A criopreservação de pólen mostrou-se uma ferramenta promissora para a conservação de germoplasma e para apoiar programas de melhoramento de plantas. Esta revisão sistemática revelou que, apesar dos avanços significativos no desenvolvimento de protocolos eficazes, a maioria dos estudos se concentra em um número limitado de espécies agrícolas economicamente importantes, destacando uma lacuna crítica no conhecimento sobre a criopreservação do pólen de espécies silvestres.

Além disso, a maioria dos estudos utiliza métodos como germinação *in vitro* e coloração, que, embora úteis, apresentam limitações em termos de precisão quando comparados a testes de fertilidade *in vivo*. O foco excessivo em estudos de curto prazo, com dados limitados sobre a longevidade do pólen armazenado por mais de uma década, representa outra lacuna a ser abordada em pesquisas futuras. A falta de compreensão dos impactos fisiológicos e funcionais do armazenamento de longo prazo, bem como os potenciais efeitos sobre a fertilidade e o crescimento das plantas resultantes, pode limitar a aplicação em larga escala da criopreservação.

Esta revisão também identificou que os mecanismos de danos ao pólen durante o armazenamento criogênico, como estresse oxidativo induzido pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica e morte celular programada (PCD), desempenham papéis centrais na redução da viabilidade do pólen. Estudos recentes sugerem

que a superprodução de ROS durante a criopreservação pode danificar lipídios e proteínas de membranas, comprometendo a integridade celular. Além disso, a atividade aumentada de enzimas relacionadas à apoptose, como a caspase-3, foi correlacionada com a diminuição da viabilidade do pólen. O papel dos íons de cálcio (Ca^{2+}) também foi destacado, pois um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} exacerba os danos celulares, desencadeando a PCD e acelerando a queda da viabilidade. Controlar esses fatores pode ser crucial para mitigar danos durante a criopreservação.

As perspectivas futuras incluem investigações mais aprofundadas sobre o impacto dos diferentes estágios de dispersão do pólen (bicelular e tricelular) em sua resposta à criopreservação, bem como investigações mais detalhadas sobre os mecanismos de danos induzidos pelo armazenamento criogênico. O desenvolvimento de novas técnicas para minimizar esses danos e melhorar ainda mais a eficiência da criopreservação de pólen é essencial.

Compreender os avanços e identificar lacunas existentes é crucial para aprimorar protocolos que permitam a inclusão de novas espécies, levando a ganhos significativos na conservação de recursos genéticos vegetais. Com mais pesquisas dedicadas a abordar essas lacunas e otimizar os protocolos existentes, a criopreservação de pólen pode desempenhar um papel cada vez mais central na conservação da biodiversidade e no apoio a programas de melhoramento de culturas.

REFERÊNCIAS

- Anushma PL, Rajasekharan PE, Singh TH (2023) Pollen cryobanking in wild solanums for conservation and utilization of nuclear genetic diversity. *Genet Resour Crop Evol* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01805-3>
- Bajaj YPS (1987) Cryopreservation of pollen and pollen embryos, and the establishment of pollen banks. *Int Rev Cytol* 107:397–420. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61083-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61083-9)
- Bekheet SA, Sota V, El-Shabrawi HM, El-Minisy AM (2020) Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method. *J Genet Eng Biotechnol* 18:1–8. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0016-1>
- Beltrán A, Valls N, Cebrián C, Zornoza FG, Breijo JR, Armiñana H, Merle H (2019) Effect of temperature on pollen germination for several Rosaceae species: Influence of freezing conservation time on germination patterns. *PeerJ* 7 <https://doi.org/10.7717/peerj.8195>
- Benelli C, De Carlo A, Engelmann F (2013) Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. *Biotechnol Adv* 31:175–185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.004>
- Benson EE, Johnston JW, Muthusamy J, Harding K (2008) Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. In: *Plant tissue culture engineering*. Springer, Dordrecht, pp 441–476. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_24
- Bettoni JC, Bonnart R, Volk GM (2021) Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 144:21–34. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01846-x>
- Bhat ZA, Dhillon WS, Shafi RHS, Rather JA, Mir AH, Shafi W, Wani TA (2012) Influence of storage temperature on viability and in vitro germination capacity of pear (*Pyrus* spp.) pollen. *J Agric Sci* 4:128. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n11p128>
- Borg M, Brownfield L, Twell D (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *J Exp Bot* 60(5):1465–1478. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern355>
- Bradaï F, Almagro-Bastante J, Sánchez-Romero C (2023) Effect of sucrose preculture and culture inoculum density on cryopreservation of olive somatic embryos. *Sci Hortic* 322:112385. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112385>

Brewbaker JL, Kwack BH (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am J Bot* 50:859–865. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1963.tb06564.x>

Burke JJ, Velten J, Oliver MJ (2004) In vitro analysis of cotton pollen germination. *Agron J* 96:359–368.

Cachitã CD, Crăciun C (1995) Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and clovers (*Trifolium* species). In: *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 280–291. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03096-7_19

Chen GQ, Ren L, Zhang J, Reed BM, Zhang D, Shen XH (2015) Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. *Cryobiology* 70:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.11.004>

Cheng C, Yu Q, Wang Y, Wang H, Dong Y, Ji Y, Ma N (2021) Ethylene-regulated asymmetric growth of the petal base promotes flower opening in rose (*Rosa hybrida*). *Plant Cell* 33(4):1229–1251. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab031>

Cheng FY (2007) Advances in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group. *Int J Plant Breed* 1(2):89–104.

Cheung AY, Boavida LC, Aggarwal M, Wu HM, Feijo JA (2010) The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy. *J Exp Bot* 61(7):1907–1915. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq062>

Coelho N, Gonçalves S, Romano A (2020) Endemic plant species conservation: biotechnological approaches. *Plants (Basel)* 9(3):345. <https://doi.org/10.3390/plants9030345>

Crisp P, Grout BWW (1984) Storage of broccoli pollen in liquid nitrogen. *Euphytica* 33(3):819–823. <https://doi.org/10.1007/BF00021908>

Custodio CC, Machado-Neto NB, Singer RB, Pritchard HW, Peaton PT, Marks TR (2020) Storage of orchid pollinia with varying lipid thermal fingerprints. *Protoplasma* 257(5):1401–1413. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01514-z>

Dafni A, Firmage D (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. In: *Pollen and pollination*. pp 113–132. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6306-1_6

Dellinger AS, Hanusch D, Oswald M, Fernández-Fernández D, Schönenberger J (2023) Using geometric morphometrics to determine the “fittest” floral shape: a case study in large-flowered, buzz-pollinated *Meriania hernandoi*. *Am J Bot* 110(6):1–15. <https://doi.org/10.1002/ajb2.16183>

Dickinson H, Rodriguez-Enriquez J, Grant-Downton R (2018) Pollen germination and pollen tube growth of *Arabidopsis thaliana*: in vitro and semi in vivo methods. *Bio-protocol* 8(16):2977–2977. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2977>

- Dinato NB, Santos IRI, Leonardecz E, Burson BL, Quarín CL, Paula AF, Fávero AP (2018) Storage of bahiagrass pollen at different temperatures. *Crop Sci* 58(6):2391–2398. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.03.0164>
- Dinato NB, Santos IRI, Vigna BBZ, Paula AF, Favero AP (2020) Perspective: Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. *CryoLetters* 41(3):115–127.
- Du G, Xu J, Gao C, Lu J, Li Q, Du J, Sun X (2019) Effect of low storage temperature on pollen viability of fifteen herbaceous peonies. *Biotechnol Rep* 21:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00309>
- Ejsmond MJ, Wrońska-Pilarek D, Ejsmond A, Dragosz-Kluska D, Karpińska-Kołaczek M, Kołaczek P, Kozłowski J (2011) Does climate affect pollen morphology? Optimal size and shape of pollen grains under various desiccation intensity. *Ecosphere* 2(10):1–15. <https://doi.org/10.1890/ES11-00147.1>
- Faltus M, Domkářová J, Svoboda P, Horáčková V, Nesvadba V, Klička V, Ptáček J, Bilavcik A, Zamecnik J (2024) Analysis of thermal characteristics of potato and hop pollen for their cryopreservation and cross-breeding. *Plants* 13(11):1578. <https://doi.org/10.3390/plants13111578>
- Fang KF, Du BS, Zhang Q, Xing Y, Cao QQ, Qin L (2019) Boron deficiency alters cytosolic Ca²⁺ concentration and affects the cell wall components of pollen tubes in *Malus domestica*. *Plant Biol* 21(2):343–351. <https://doi.org/10.1111/plb.12941>
- Ferreira MDS, Costa EMR, Cruz CRP, de Jesus ON, Souza FVD (2024) Strategy for establishing a pollen cryobank of wild species of *Passiflora* L. *Genet Resour Crop Evol*:1–14. <https://doi.org/10.1007/s10722-024-01935-2>
- Ferreira MS, Soares TL, Costa EMR, Silva RL, Jesus ON, Junghans TG, Souza FVD (2021) Optimization of culture medium for the in vitro germination and histochemical analysis of *Passiflora* spp. pollen grains. *Sci Hortic* 288:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110298>
- Ferriol M, Simó U, Mansanet CJ, Torres A, Picó B, Monforte AJ, Romero C (2023) Pre- and post-zygotic barriers contribute to reproductive isolation and correlate with genetic distance in *Cucumis*. *Plants* 12(4):926. <https://doi.org/10.3390/plants12040926>
- Fragallah SADA, Lin S, Li N, Ligate EJ, Chen Y (2019) Effects of sucrose, boric acid, pH, and incubation time on in vitro germination of pollen and tube growth of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* L.). *Forests* 10(2):1–16. <https://doi.org/10.3390/f10020102>
- Franchi GG, Piotto B, Nepi M, Baskin CC, Baskin JM, Pacini E (2011) Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. *J Exp Bot* 62(15):267–5281. <https://doi.org/10.1093/jxb/err154>
- Gaudet D, Yadav NS, Sorokin A, Bilichak A, Kovalchuk I (2020) Development and optimization of a germination assay and long-term storage for *Cannabis sativa* pollen. *Plants* 9(5):665. <https://doi.org/10.3390/plants9050665>

Generoso AL, Carvalho VS, Walter R, Campbell G, da Silva Araújo L, Santana JGS, da Cunha M (2019) Mature-embryo culture in the cryopreservation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) seeds. *Sci Hortic* 256:108638. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108638>

Gladfelter HJ, Johnston J, Wilde HD, Merkle SA (2021) Somatic embryogenesis and cryopreservation of *Stewartia* species. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 144:211–221. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01834-1>

González-Benito ME, Ibáñez MÁ, Pirredda M, Mira S, Martín C (2020) Application of the MSAP technique to evaluate epigenetic changes in plant conservation. *Int J Mol Sci* 21(20):2–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21207459>

Häggman H, Rusanen M, Jokipii S (2008) Cryopreservation of in vitro tissues of deciduous forest trees. In: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, New York, NY, pp 365–386.

Hirose T, Hashida Y, Aoki N, Okamura M, Yonekura M, Ohto C, Ohsugi R (2014) Analysis of gene-disruption mutants of a sucrose phosphate synthase gene in rice, *OsSPS1*, shows the importance of sucrose synthesis in pollen germination. *Plant Sci* 225:102–106. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.018>

<https://doi.org/10.2134/agronj2004.3590>

Impe D, Reitz J, Köpnick C, Rolletschek H, Börner A, Senula A, Nagel M (2020) Assessment of pollen viability for wheat. *Front Plant Sci* 10:1588. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01588>

Jia MX, Jiang XR, Xu J, Di W, Shi Y, Liu Y (2018) CAT and MDH improve the germination and alleviate the oxidative stress of cryopreserved *Paeonia* and *Magnolia* pollen. *Acta Physiol Plant* 40:1–10. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2612-0>

Jia MX, Shi Y, Di W, Jiang XR, Xu J, Liu Y (2017) ROS-induced oxidative stress is closely related to pollen deterioration following cryopreservation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 53:433–439. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9844-3>

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. *Front Plant Sci* 11(13):994214. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994214>

Jitsopakul N, Sangyojarn P, Homchan P, Thammasiri K (2019) Efficiency of aluminum cryo-plates for cryopreservation of *Dendrobium signatum* Rehb. F. pollinia. *Acta Hortic* 1234:279–286. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1234.36>

Kadri K, Elsafy M, Makhlof S, Awad MA (2022) Effect of pollination time, the hour of daytime, pollen storage temperature and duration on pollen viability, germinability, and fruit set of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv "Deglet Nour". *Saudi J Biol Sci* 29(2):1085–1091. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.062>

Karipidis CH, Douma D (2009) Tomato pollen storage at freeze and cryogenic temperature - effects on viability and fecundity. *Acta Hortic* 908:257–263. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.908.33>

- Karipidis CH, Lympios C, Passam HC, Savvas D (2007) Effect of moisture content of tomato pollen stored cryogenically on in vitro germination, fecundity and respiration during pollen tube growth. *J Horticult Sci Biotechnol* 82(1):29–34. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512195>
- Kaviani B, Kulus D (2022) Cryopreservation of endangered ornamental plants and fruit crops from tropical and subtropical regions. *Biology* 11(6):1–23. <https://doi.org/10.3390/biology11060847>
- Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – a review. *Sci Horticult* 168:88–107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.014>
- Lambardi M, Ozudogru A, Benelli C (2008) Cryopreservation of embryogenic cultures. In: Reed BM (ed). *Plant Cryopreservation, a practical guide*. Springer. pp 177–194.
- Langedijk NS, Kaufmann S, Vos E, Ottiger T (2023) Evaluation of methods to assess the quality of cryopreserved *Solanaceae* pollen. *Sci Rep* 13(1):7344. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34158-z>
- Li JW, Ozudogru EA, Li J, Wang MR, Bi WL, Lambardi M, Wang QC (2018) Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. *Biodivers Conserv* 27:795–814. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1481-y>
- Li M, Jiang F, Huang L, Wang H, Song W, Zhang X, Niu L (2023) Optimization of in vitro germination, viability tests and storage of *Paeonia ostii* pollen. *Plants* 12(13):2460. <https://doi.org/10.3390/plants12132460>
- Li SS, Yuan RY, Chen LG, Wang LS, Hao XH, Wang LJ, Du H (2015) Systematic qualitative and quantitative assessment of fatty acids in the seeds of 60 tree peony (*Paeonia section Moutan* DC.) cultivars by GC–MS. *Food Chem* 173:133–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.017>
- Lin Y, Wang Y, Iqbal A, Shi P, Li J, Yang Y, Lei X (2017) Optimization of culture medium and temperature for the in vitro germination of oil palm pollen. *Sci Horticult* 220:134–138. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.040>
- Lv W, Miao D, Miao R, Fan D, Meng J, Liu X, Sun L (2024) Advances in the omics research of *Rosaceae*. *Ornam Plant Res* 4:2–16. <https://doi.org/10.48130/opr-0024-0011>
- Ma W, Zhu M, Wan Y, Cai H, Sun Y, Jiao P, Liu Y (2024) Mitochondrial pathway of programmed cell death in *Paeonia lactiflora* pollen cryopreservation. *Plant Sci* 345:112107. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.112107>
- Malik SK, Chaudhury R (2019) Cryopreservation techniques for conservation of tropical horticultural species using various explants. In: *Conservation and utilization of horticultural genetic resources*. 579-594. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0_19
- Mascher M, Schreiber M, Scholz U, Graner A, Reif JC, Stein N (2019) Genebank genomics bridges the gap between the conservation of crop diversity and plant breeding. *Nat Genet* 51(7):1076-1081. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0443-6>

- Matamoro-Vidal A, Raquin C, Brisset F, Colas H, Izac B, Albert B, Gouyon PH (2016) Links between morphology and function of the pollen wall: an experimental approach. *Bot J Linn Soc* 180(4):478-490. <https://doi.org/10.1111/boj.12378>
- Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, Van Breusegem F (2022) Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23(10):663–679. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
- Mota SS, de Faro IAM, Cavalcante BP, de Souza FVD, Aona LYS, de Carvalho Costa MAP, de Souza EH (2023) Reproductive systems and hybridization of *Lymania* species (Bromeliaceae) endemic to Northeast Brazil threatened with extinction. *Sci Hortic* 322:112447. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112447>
- Mota SS, Faro IAM, Soares TL, de Almeida PS, de Souza FVD, Aona LYS, de Souza EH (2024) Pollen morphology and viability of *Lymania* (Bromeliaceae) species with ornamental potential. *Sci Hortic* 328:112890. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.112890>
- Muluneh MG (2021) Impact of climate change on biodiversity and food security: a global perspective - a review article. *Agriculture & Food Security* 10(1):1-25. <https://doi.org/10.1186/s40066-021-00318-5>
- Mumford PM, Grout BWW (1978) Germination and liquid nitrogen storage of cassava seed. *Ann Bot* 42(177):255-257.
- Munguía-Rosas MA, Parra-Tabla V, Rodríguez-Domínguez JM (2023) Partial and asymmetrical reproductive isolation between two sympatric tropical shrub species: *Cnidoscolus aconitifolius* and *C. souzae* (Euphorbiaceae). *Ecol Evol* 13(12). <https://doi.org/10.1002/ece3.10801>
- Mustafa NR, De Winter W, Van Iren F, Verpoorte R (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc* 6(6):715-742. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.144>
- Nagar A, Gowthami R, Sureja AK, Munshi AD, Verma M, Singh AK, Rajkumar S (2023) Simple cryopreservation protocol for *Luffa* pollen: enhancing breeding efficiency. *Front Plant Sci* 14:1268726. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1268726>
- Nukari A, Uosukainen M (2007) Cryopreservation in the Finnish national germplasm programme for horticultural plants. *Adv Hortic Sci* 21:232-234.
- Olmstead RG (2013) Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. *Bot J Linn Soc* 171:80-102. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01306.x>
- Pellegrino G (2016) Sympatric reinforcement of reproductive barriers between *Neotinea tridentata* and *N. ustulata* (Orchidaceae). *J Plant Res* 129:1061-1068. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0855-7>
- Petrucelli R, Giordano C, Salvatici MC, Beghè D, Rodolfi M, Fabbri A, Benelli C (2021) Characterization and conservation of “Olivo della Strega”: an ancient olive tree, precious

resource for natural and cultural heritage. *Rend Lincei Sci Fis Nat* 32:311-324. <https://doi.org/10.1007/s12210-021-00989-z>

Poobathy R, Sinniah UR, Xavier R, Subramaniam S (2013) Catalase and superoxide dismutase activities and the total protein content of protocorm-like bodies of *Dendrobium sonia*-28 subjected to vitrification. *Appl Biochem Biotechnol* 170:1066–1079. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0241-z>

Popova E, Shukla M, Kim HH, Saxena PK (2021) Root cryobanking: An important tool in plant cryopreservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 144:49-66. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01859-6>

Radičević SANJA, Nikolić DRAGAN, Cerović RADOSAV, Đorđević MILENA (2013) In vitro pollen germination and pollen grain morphology in some sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Romanian Biotechnological Letters* 18(3):8341-8349.

Rajasekharan PE, Ganeshan S, Thamizharasu V (1995) Expression of trifoliolate leaf character in *Citrus limonia* x *Poncirus trifoliata* hybrids through cryostored pollen. *Int J Hortic Sci* 70(3):485–490. <https://doi.org/10.1080/14620316.1995.11515319>

Rajasekharan PE, Ravi H (2023) Viability and fertility of cryopreserved pollen of Brinjal and its wild relatives. *Isr J Plant Sci* 70(3–4):233–243. <https://doi.org/10.1163/22238980-bja10084>

Rane P, Thakre M, Verma MK, Kumar C, Prakash J, Srivastava V, Shashank PR, Murukan N, Chawla G, Mandal PK, Kumar H, Jadhav AK, Varghese E, Patel VB, Singh SK (2024) Studies on pollen micro-morphology, pollen storage methods, and cross-compatibility among grape (*Vitis* spp.) genotypes. *Front Plant Sci* 15:1353808. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1353808>

Reed BM, Schumacher L, Wang N, D'Achino J, Barker RE (2006) Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation dehydration. *Crop Sci* 46(1):6-11. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0620>

Ren R, Gao J, Zhou H, Zhu M, Liu Y, Y (2022a) Changes of pollen viability after preservation of *Paeonia lactiflora* in different provenances. *Cryobiology* 105:10-19. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.01.001>

Ren R, Guo J, Ji Z, Yang X (2023) ROS-induced oxidative stress affects the viability of cryopreserved *Paeonia lactiflora* pollen with different moisture contents. *Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)* 155(1):117-126. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02558-8>

Ren R, Jiang X, Di W, Li Z, Li B, Xu J, Liu Y (2019a) HSP70 improves the viability of cryopreserved *Paeonia lactiflora* pollen by regulating oxidative stress and apoptosis-like programmed cell death events. *Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)* 139:53-64. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01661-z>

Ren R, Li Z, Jiang X, Liu Y (2020b) The ROS-associated programmed cell death causes the decline of pollen viability recovered from cryopreservation in *Paeonia lactiflora*. *Plant Cell Rep* 39:941-952. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02540-0>

- Ren R, Li Z, Li B, Xu J, Jiang X, Liu Y, Zhang K (2019b) Changes of pollen viability of ornamental plants after long-term preservation in a cryopreservation pollen bank. *Cryobiology* 89:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.07.00>
- Ren R, Li Z, Zhang L, Zhou H, Jiang X, Liu Y (2021b) Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia suffruticosa* pollen. *Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)* 144:233-246. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01794-6>
- Ren R, Li Z, Zhou H, Zhang L, Jiang X, Liu Y (2020a) Changes in apoptosis-like programmed cell death and viability during the cryopreservation of pollen from *Paeonia suffruticosa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)* 140:357-368. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01732-1>
- Ren R, Zhou H, Zhang L, Jiang X, Liu Y (2021a) Cryopreserved-pollen viability is regulated by NO-induced programmed cell death. *Plant Cell Rep* 40(12):2383-2395. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02779-1>
- Ren R, Zhou H, Zhang L, Jiang X, Liu Y (2022b) Ca²⁺ participates in programmed cell death by modulating ROS during pollen cryopreservation. *Plant Cell Rep* 41(4):1043-1057. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02836-3>
- Roque-Borda CA, Kulus D, Vacaro de Souza A, Kaviani B, Vicente EF (2021) Cryopreservation of agronomic plant germplasm using vitrification-based methods: An overview of selected case studies. *Int J Mol Sci* 22(11):6157. <https://doi.org/10.3390/ijms22116157>
- Senula A, Keller ERJ (2013) Pollen cryopreservation to support maintenance of a wild species collection of the genus *Allium*. In: II International Symposium on Plant Cryopreservation 1039:289–296. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1039.36>
- Sherlock G, Block W, Benson EE (2005) Thermal analysis of the plant encapsulation-dehydration cryopreservation protocol using silica gel as the desiccant. *CryoLetters* 26(1):45-54.
- Silva RL, Souza EH, Vieira LJ, Pelacani CR, Souza FVD (2017) Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. *Sci Hortic Amsterdam* 219:326-334. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.022>
- Škrlep K, Bergant M, De Winter GM, Bohanec B, Žel J, Verpoorte R, Camloh M (2008) Cryopreservation of cell suspension cultures of *Taxus× media* and *Taxus floridana*. *Biol Plant* 52:329-333. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0067-7>
- Song JY, Yi JY, Bae J, Lee JR, Yoon MS, Lee YY (2022) Genetic stability of cryopreserved ornamental *Lilium* germplasm. *Plant Genet Resour* 20(1):66-68. <https://doi.org/10.1017/S147926212200003X>
- Souza EH, Souza FVD, Rossi ML, Brancalleao N, Silva Ledo CA, Martinelli AP (2015) Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. *Euphytica* 204:13-28. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1273-3>

Souza FVD, de Souza EH, da Silva RL (2018) Cryopreservation of pollen grains of pineapple and other bromeliads. *Plant Cell Cult Protoc* 279-288. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_19

Souza SO, Oliveira RS, Aona LYS, Souza FVD, Soares TL, Rossi ML, de Souza EH (2021) Pollen morphology and viability of *Tillandsia* (Bromeliaceae) species by light microscopy and scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech* 84(3):441-459. <https://doi.org/10.1002/jemt.23601>

Sparks D, Yates IE (2002) Pecan pollen stored over a decade retains viability. *HortScience* 37(1):176-177.

Srikanth A, Schmid M (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci* 68:2013-2037. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0673-y>

Sulusoglu M, Cavusoglu A (2014) In vitro pollen viability and pollen germination in cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.). *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/657123>

Ter Steeg SEM, Struik PC, Visser RG, Lindhout P (2022) Crucial factors for the feasibility of commercial hybrid breeding in food crops. *Nat Plants* 8(5):463-473. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01142-w>

Titova MV, Popova EV, Shumilo NA, Kulichenko IE, Chernyak ND, Ivanov IM, Nosov AM (2021) Stability of cryopreserved *Polyscias filicifolia* suspension cell culture during cultivation in laboratory and industrial bioreactors. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 145:591-600. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02030-5>

Tosun F, Koyuncu F (2007) Investigations of suitable pollinator for 0900 Ziraat sweet cherry cv.: pollen performance tests, germination tests, germination procedures, in vitro and in vivo pollinations. *Hort Sci* 34(2).

Towill LE (1984) Seed set with potato pollen stored at low temperatures. *Am Potato J* 61:569-575. <https://doi.org/10.1007/BF02852966>

Towill LE (1985) Low temperature and freeze-/vacuum-drying preservation of pollen. In: Kartha KK (ed) *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 171–198

Tyagi RK, Hymowitz T (2003) Pollen from *Glycine* species survive cryogenic exposure. *CryoLetters* 24(2):119–124.

Vargas DP, Paiva R, Nogueira GF, Carvalho MAF, Silva DPC, Nery FC, da Silva GA, Porto JMP (2011) Effect of glycerol as a cryoprotectant for castor bean pollen for different storage periods. *Acta Hort* 908:97-100.

Velasco-García MV, Hernández-Arroyo DG, Muñoz-Gutiérrez L, Castillo-Martínez CR, Vallejo-Reyna MA, García-Campusano F (2022) Seed cryopreservation of *Cedrela odorata* L.: germination and early nursery establishment. *Rev Mex Cienc For* 13(69):31-55. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.1198>

- Vendrame WA, Carvalho VS, Dias JM, Maguire I (2008) Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. HortScience 43(1):264-267. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.1.264>
- Verzhuk V, Murashev S, Novikova L, Kiru S, Orlova S (2023) Conservation of the Bird Cherry (*Padus* Mill.) Germplasm by Cold Storage and Cryopreservation of Winter Cuttings. Biology 12(8):1071. <https://doi.org/10.3390/biology12081071>
- Vishwakarma PK, Vincent L, Vasugi C, Rajasekharan PE (2021) Effect of cryopreservation on pollen viability, fertility and morphology of different *Psidium* species. Cryobiology 98:112-118. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.017>
- Volk GM (2011) Collecting pollen for genetic resources conservation. Collecting plant genetic diversity: technical guidelines 1-10.
- Walt IVD, Littlejohn GM (1996) Storage and viability testing of *Protea* pollen. J Amer Soc Hort Sci 121(5):804-809.
- Walters C, Berjak P, Pammenter N, Kennedy K, Raven P (2013) Preservation of recalcitrant seeds. Science 339(6122):915-916. <https://doi.org/10.1126/science.1230935>
- Walters C, Pence VC (2020) The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. Plants People Planet 3:83-91. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10121>
- Wan X, Sun D, Gao C (2024) Flower opening dynamics, pollen-ovule ratio, stigma receptivity and stigmatic pollen germination (in-vivo) in *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai. Scientific Reports 14(1):7127. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57655-1>
- Wang X, Wu Y, Lombardini L (2021) In vitro viability and germination of *Carya illinoensis* pollen under different storage conditions. Sci Hortic 275:109662. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109662>
- Wang ZY, Legris G, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G (1994) Cryopreservation of embryogenic cell suspensions in *Festuca* and *Lolium* species. Plant Science 103(1):93-106. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)03982-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)03982-8)
- Weng Z, Deng Y, Tang F, Zhao L, Zhao L, Wang Y, Cao Q (2023) Screening and optimisation of in vitro pollen germination medium for sweetpotato (*Ipomoea batatas*). Plant Methods 19(1):93. <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01050-w>
- Wilson ZA, Zhang DB (2009) From Arabidopsis to rice: pathways in pollen development. J Exp Bot 60(5):1479-1492. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp095>
- Xie WJ, El-Tantawy AA, Li SF, Wang JH, Song J, Peng L, Chen SY (2022) Pollen germination, structures, and morphologic characters after anthers cryopreservation of *Rhododendron delavayi* Franch. Eur J Hort Sci:1-13. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2022/024>
- Xu J, Li B, Liu Q, Shi Y, Peng J, Jia M, Liu Y (2014) Wide-scale pollen banking of ornamental plants through cryopreservation. CryoLetters 35(4):312-319.

Xu J, Liu Q, Jia M, Liu Y, Li B, Shi Y (2014) Generation of reactive oxygen species during cryopreservation may improve *Lilium*× *siberia* pollen viability. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50:369-375. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9615-3>

Xu J, Liu Y, Li BL, Liu Q, Shi Y, Peng JG, Jia MX (2019) Comparing mRNA expression levels to protein abundance in *Magnolia denudata* pollen following cryopreservation. *Acta Horti* 1234:113-118. <https://doi.org/10.17660/ActaHort.2019.1234.14>

Zachariassen KE, Kristiansen E (2000) Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* 41(4):257-279. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2289>

Zhang XX, Shi QQ, Ji D, Niu LX, Zhang YL (2017) Determination of the phenolic content, profile, and antioxidant activity of seeds from nine tree peony (*Paeonia section* Moutan DC.) species native to China. *Int Food Res* 97:141-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.018>

Zuguo C, Xiaobiao X, Yipeng Z, Huiping Z (2006) Ultrastructure of in vitro stem apex of kivi in cryopreservation. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* 26(8):1600-1604.

Capítulo II

Estratégia para o estabelecimento de um criobanco de pólen de *Passiflora* spp. silvestres

Artigo publicado na Revista Genetic Resources and Crop Evolution: Strategy for establishing a pollen cryobank of wild species of *Passiflora* L. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-024-01935-2>

RESUMO

A criopreservação de pólen destaca-se como uma estratégia significativa na conservação da diversidade de espécies, servindo como ferramenta de melhoramento genético. Este estudo investigou fatores cruciais para a criopreservação do pólen, revelando resultados inéditos ligados às condições e períodos de desidratação, abrangendo peculiaridades das espécies avaliadas. São apresentados dados sobre a criopreservação de espécies de maracujá silvestre, delineando um protocolo inovador e eficiente para influenciar futuros estudos sobre criopreservação de pólen, reforçando o melhoramento genético e estabelecendo um criobanco para pólen de espécies silvestres do gênero. Foram avaliados grãos de pólen de oito espécies de *Passiflora*, submetidos à desidratação em dessecador com sílica gel e estufa a 35°C em intervalos de 0, 20, 40 ou 60 minutos. O material desidratado foi posteriormente criopreservado por 24 horas, seguido de testes de germinação *in vitro* e medições do comprimento do tubo polínico para determinar o tempo ideal de desidratação para cada espécie. Além disso, foi realizada polinização controlada utilizando pólen criopreservado por 24 horas. Este pólen apresentou taxas de germinação variando de 71% (*P. edmundoi*) a 28% (*P. misera*), enquanto o pólen fresco apresentou taxas de germinação de 89% (*P. edmundoi*) a 37% (*P. organensis*). Quanto ao desenvolvimento do tubo polínico para os grãos de pólen submetidos à criopreservação, foi observado um crescimento significativo em comparação com os grãos de pólen frescos. Testes de campo envolvendo polinização controlada utilizando pólen criopreservado resultaram em taxas de frutificação de 50% (*P. edmundoi*) a 40% (*P. gibertii*), produzindo sementes com percentuais de germinação variando de 67% a 99%. Estes resultados *in vitro* e *in vivo* destacam a eficácia da criopreservação como uma técnica para conservar conjuntos de genes haplóides dentro do banco criogênico.

Palavras-chave: Germinação *in vitro*; Tubo de pólen; Reprodução; Polinização; Reprodução; Maracujá.

ABSTRACT

Pollen cryopreservation stands out as a significant strategy in conserving species diversity, serving as a tool for genetic improvement. This study investigated critical factors for pollen cryopreservation, revealing novel findings related to dehydration conditions and durations, encompassing species-specific peculiarities. Data on the cryopreservation of wild passion fruit species are presented, outlining an innovative and efficient protocol that may influence future studies on pollen cryopreservation, reinforce genetic improvement efforts, and establish a cryobank for wild species of the genus. Pollen grains from eight *Passiflora* species were evaluated, subjected to dehydration in a desiccator with silica gel and an oven at 35°C for intervals of 0, 20, 40, or 60 minutes. The dehydrated material was then cryopreserved for 24 hours, followed by in vitro germination tests and pollen tube length measurements to determine the optimal dehydration time for each species. Additionally, controlled pollination using pollen cryopreserved for 24 hours was performed. This pollen showed germination rates ranging from 71% (*P. edmundoi*) to 28% (*P. misera*), while fresh pollen exhibited germination rates from 89% (*P. edmundoi*) to 37% (*P. organensis*). Regarding pollen tube development in the cryopreserved pollen grains, significant growth was observed compared to fresh pollen grains. Field tests involving controlled pollination with cryopreserved pollen resulted in fruiting rates of 50% (*P. edmundoi*) to 40% (*P. gibertii*), producing seeds with germination percentages ranging from 67% to 99%. These in vitro and in vivo results highlight the effectiveness of cryopreservation as a technique for preserving haploid gene pools within the cryogenic bank.

Keywords: In vitro germination; Pollen tube; Reproduction; Pollination; Breeding; Passion fruit.

1.Introdução

O gênero *Passiflora* engloba cerca de 570 espécies, amplamente distribuídas no Brasil, que é considerado um dos maiores centros de diversidade do gênero (Bernacci et al. 2024). Nesse sentido, o Brasil abriga 163 espécies espalhadas por todas as suas regiões, sendo 93 endêmicas (Bernacci et al. 2024). O Brasil também se destaca como o maior produtor e consumidor de maracujá in natura e processado em todo o mundo, contribuindo com aproximadamente 60% da produção global total (Mozzaquatro et al. 2022). Dado o seu valor econômico, extensa distribuição geográfica e diversidade de espécies, o cultivo do maracujá é amplamente utilizado para aumentar a renda, principalmente dos pequenos agricultores (Mletti, 2011; Cauz-Santos et al. 2017).

Porém, a expansão e a produtividade do maracujá têm sido restringidas por fatores como pragas e doenças (Coelho et al. 2016). Nesse cenário, existe uma demanda por híbridos que apresentem alta produtividade e qualidade de frutos para atender às necessidades dos produtores das diferentes regiões do Brasil. Isto requer pesquisa e desenvolvimento em diversos domínios do conhecimento, especialmente no melhoramento genético (Freitas et al. 2015; Ocampo et al. 2016).

O programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura (unidade de pesquisa da Embrapa Mandioca e Frutas) visa gerar variedades comerciais de *P. edulis* por meio de hibridização interespecífica com espécies silvestres portadoras de alelos de resistência a fatores bióticos e abióticos (Pereira et al. 2019; Lima et al. 2020; Pereira et al. 2019; Santos et al. 2019), além de alguns atributos agronômicos vantajosos da fruta (Santos et al. 2019). Além disso, a hibridização interespecífica também possibilitou o desenvolvimento de híbridos com potencial ornamental (Soares et al. 2015; Belo et al. 2018).

A realização de cruzamentos exige disponibilidade imediata de pólen armazenado viável, especialmente quando se cruzam espécies com floração assíncrona ou quando a

hibridização precisa ocorrer em locais diferentes e em momentos variados (Dinato et al. 2020). A criopreservação de pólen foi desenvolvida para diversas espécies, como visto em estudos realizados com acessos de abacaxi silvestre, *Lilium* spp. e *Paeonia suffruticosa* (Silva et al. 2017; Li et al. 2019; Ren et al. 2020). Embora a criopreservação de pólen tenha encontrado aplicação em diversas espécies de plantas, como frutas cítricas (Volk et al. 2015), orquídeas (Vendrame et al. 2008) e bromélias (Parton et al. 2002; Souza et al. 2015), entre outras, há não há relatos publicados até o momento sobre espécies de maracujá silvestre.

A criopreservação envolve o uso de nitrogênio líquido (-196 °C) ou vapor de nitrogênio (-165 °C a -190 °C), juntamente com outras técnicas como desidratação ou uso de crioprotetores para preservar materiais biológicos. A exposição ao nitrogênio líquido interrompe a divisão celular, permitindo o armazenamento de estruturas vegetais por longos períodos. Assim, a criopreservação mitiga o risco de perda de coleções devido a ataques de patógenos e condições ambientais imprevistas, reduzindo a probabilidade de perda por contaminação e variações genéticas que podem ocorrer durante os ciclos de subcultura de coleções mantidas in vitro (Wang et al. 2014; Li et al. . 2017; Wang et al. 2018). Atualmente, o transporte de amostras em nitrogênio líquido é viável através de crioshippers (tanques especializados), facilitando o intercâmbio internacional (Volk, 2011).

O sucesso na criopreservação está intrinsecamente ligado a vários fatores, incluindo fatores genotípicos, estágio fisiológico do pólen e da planta e conteúdo de água no material vegetal. Existe um nível de umidade ideal para cada espécie, exigindo o desenvolvimento de protocolos específicos (Borghazan et al. 2011; Kulus e Zalewska, 2014; Vishwakarma et al. 2021). A criopreservação de pólen se destaca pela relativa facilidade e alta eficiência (Souza et al. 2015; Silva et al. 2017; Dinato et al. 2020). Portanto, este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo inédito e eficiente para conservação de pólen de espécies silvestres de *Passiflora* através de técnicas de criopreservação, visando preservar a variabilidade alélica e promover avanços no programa de melhoramento genético do maracujá. Adicionalmente, investigamos fatores cruciais na criopreservação de pólen, revelando resultados inovadores em relação aos métodos e tempos de desidratação, considerando as especificidades das espécies estudadas. Os dados aqui apresentados servirão de base para orientar estudos futuros na área de criopreservação de pólen dentro do gênero, ampliando os esforços de melhoramento genético e conservação da biodiversidade.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material Vegetal

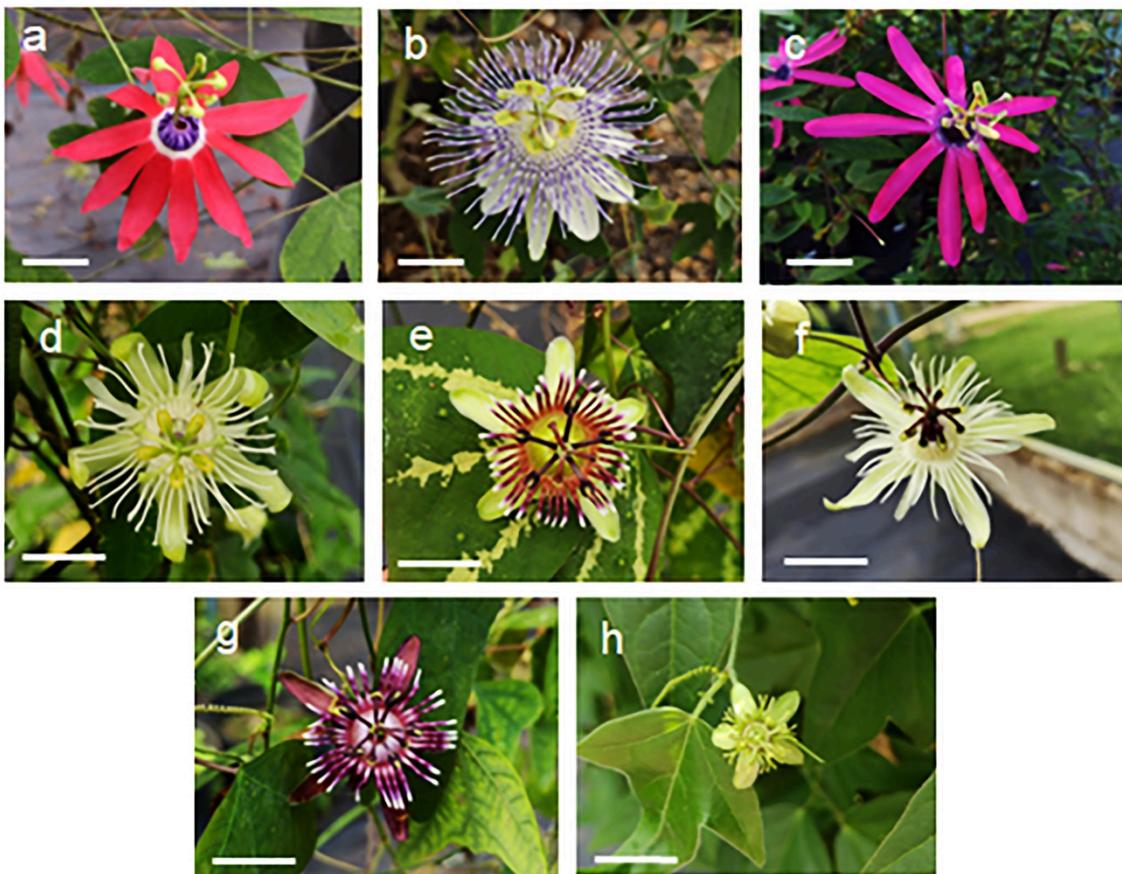
Foram utilizados grãos de pólen provenientes de oito espécies de *Passiflora* (Figura 1), que são mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* (BAG-Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, situada em Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12°40'42.5" S e 39°05'15.0" W, 222 metros). De acordo com a classificação de Köppen and Geiger (1928) o clima da região é uma transição do tipo Am a Aw (tropical subúmido a seco), com temperatura média anual do ar de 23,8°C, precipitação pluviométrica anual média de 1.224 mm, concentrada de junho a agosto, e umidade relativa média anual em torno de 80%.

As espécies utilizadas para este estudo foram: *Passiflora edmundoi* Sacco (BGP 472); *Passiflora gibertii* N. E. Brown (BGP148); *Passiflora kermesina* Link & Otto (BGP 452); *Passiflora misera* Kunth (BGP 495); *Passiflora organensis* Gardner (BGP 497); *Passiflora pohlii* Mast. (BGP 454); *Passiflora porophylla* Vell. (Embrapa seleção 01); e *Passiflora suberosa* L. (Embrapa seleção 02).

Figure 1. Images of the flowers of the 8 *Passiflora* species used in this study: A) *P. edmundoe*. B) *P. gibertii*. C) *P. kermesina*. D) *P. misera*. E) *P. phorofilla*. F) *P. organensis*. G) *P. pohlii*. H) *P. suberosa*. Scale bar: 20 mm.

2.2 Desidratação do pólen

A desidratação dos grãos de pólen foi realizada empregando-se duas abordagens distintas: 1) por meio de um dessecador contendo sílica gel e 2) estufa de temperatura



controlada (35°C). Para ambas as condições foram avaliados os intervalos de tempo de 20, 40 e 60 minutos. Para fins comparativos, foi utilizado um grupo controle com grãos de pólen não desidratados (recém-colhidos). Os intervalos de tempo foram estabelecidos com base no trabalho de criopreservação com grão de pólen das espécies *Luisia macrantha* e *Luffa* (Ajeeshkumar e Decruse 2013; Nagar et al. 2023). A quantificação do conteúdo de água dos grãos de pólen foi executada adotando a mesma metodologia empregada por Souza et al. (2015) e Silva et al. (2017).

Para a desidratação, foram utilizadas anteras completas de três flores em cada repetição, totalizando 15 anteras por repetição. Primeiramente, pequenas folhas de papel alumínio foram pesadas em uma balança de precisão com precisão de quatro casas decimais para estabelecer o peso da tara (Wt). Em seguida, as anteras contendo os grãos de pólen foram depositados em cada folha para uma segunda pesagem para determinar o peso úmido (Wm). As amostras (anteras com grãos de pólen nas folhas) foram desidratadas em dessecador contendo 500g sílica gel, e em Estufa com temperatura controlada (35° C) por 3 intervalos de tempo (20, 40, 60 minutos. Após isso, as folhas de alumínio foram dobradas em envelopes fechados com anteras e novamente pesadas para obtenção do peso seco (Pd). O conteúdo de água das amostras foi determinada pela seguinte equação: $M = [(Pu - Ps)/(Pu - Pt)] \times 100$, onde: M = teor de umidade das anteras com grãos de pólen (%); Pm = peso úmido (g); Pd = peso seco (g); Pt = peso da tara (g).

A avaliação da viabilidade dos grãos de pólen, tanto aqueles submetidos a diferentes períodos de desidratação quanto o grupo controle, foi realizada a partir de um teste de germinação in vitro. A germinação polínica foi considerada atingida quando o comprimento do tubo polínico excedeu ou igualou o diâmetro do próprio grão de pólen.

2.3 Teste de germinação dos grãos de pólen

Para a realização do teste de germinação, os grãos de pólen foram uniformemente dispersos em placas de Petri de dimensões 50 mm x 50 mm, com o auxílio de um pincel. O meio de cultura utilizado foi conforme protocolo otimizado por Ferreira et al. (2021). Composto por [0,03% Ca(NO₃)·4H₂O, 0,02% Mg(SO₄)·7H₂O, 0,01% KNO₃ e 0,01% H₃BO₃], complementado com 30% de sacarose, solidificado por meio de 0,8% de ágar e ajustado para pH 7,0. As placas de Petri, contendo os grãos de pólen, foram mantidas em ambiente com temperatura controlada (27 ± 1 °C) sob ausência de luz, pelo período de 24 horas, para propiciar a germinação polínica. O registro dos grãos de pólen germinados foi realizado em estereomicroscópio Leica EZ4 (Leica, Wetzlar, Alemanha).

A porcentagem de germinação foi calculada por meio da contagem de pelo menos 100 grãos de pólen por repetição, totalizando 300 grãos de pólen. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2x4 (método de desidratação - estufa e sílica x intervalos de tempo), para cada espécie. O comprimento (mm) dos tubos polínicos foi medido utilizando o software ImageJ 1.46r (Rasband 1997–2016), com base nas

imagens capturadas pelo estereomicroscópio. Vinte tubos polínicos foram selecionados aleatoriamente em cada placa de Petri, totalizando 60 repetições.

Os dados de porcentagem de germinação foram transformados para arcoseno ($\sqrt{x}/100$) antes da análise estatística, visando atender aos pressupostos da análise de variância. Para a comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey ($p \leq 0,01$), utilizando o programa estatístico R (2022).

2.4 Armazenamento em Nitrogênio Líquido

Para a criopreservação dos grãos de pólen desidratados e não desidratados (controle), foram acondicionados em invólucros de papel alumínio, devidamente dobrados, e inseridos em tubos criogênicos com nitrogênio líquido (-196°C) por um período de 24 horas.

Após a remoção dos tubos do nitrogênio líquido, as amostras de grãos de pólen foram avaliadas quanto à sua viabilidade, por meio da capacidade de germinação *in vitro*, bem como a medição do comprimento dos tubos polínicos. O objetivo deste procedimento foi identificar o período ideal de desidratação capaz de otimizar os resultados da criopreservação. Uma vez identificado o tempo mais adequado para a desidratação, um teste de polinização *in vivo* foi realizado nas condições de campo visando testificar a fertilidade dos grãos de pólen após o processo de congelamento.

2.5 Polinização *in vivo*

Foram utilizadas pelo menos 10 flores de cada espécie, que foram protegidas e emasculadas, evitando assim a interferência de agentes polinizadores externos e garantindo a pureza do processo. A polinização das flores foi realizada com os polens criopreservados. A eficiência foi verificada com base no número de frutos formados, número de sementes e sua viabilidade por teste de germinação. As sementes formadas foram submetidas ao teste de germinação em gerbox com duas folhas de papel germitest, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As avaliações foram realizadas a cada três dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições e 25 sementes por parcela. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados usando a função arcoseno ($\sqrt{x}/100$) antes da análise estatística, para satisfazer os pressupostos da análise de variância. Os dados foram submetidos à análise de variância e

as médias agrupadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$), utilizando o programa estatístico R (2022).

Figura 2. Representação esquemática das etapas realizadas para a criopreservação de grãos de pólen de diferentes espécies de *Passiflora*.

3 Resultados

3.1 Desidratação



Como esperado houve uma redução no conteúdo de água com o tempo de dessecação tanto em sílica gel quanto em estufa (Tabela 1). Houve também um comportamento similar para todos os acessos estudados em ambas as condições (Tabela 1).

Para a maioria das espécies aqui estudadas, não foi verificada diferenças significativas entre as duas abordagens de desidratação seja estufa ou de sílica gel. Entretanto, as espécies *P. edmundoe*, *P. misera* e *P. pohilli*, apresentam diferenças significativas entre a desidratação em sílica e aquela realizada em estufa, especificamente nos períodos de 40 e 60 minutos, 20 e 40 minutos e 60 minutos, respectivamente (Tabela 1). A desidratação com sílica gel resultou em grãos de pólen com um conteúdo de água ligeiramente mais elevado quando comparado com o processo de desidratação na estufa, nos tempos mencionados anteriormente (Tabela 1).

Table 1. Porcentagem de teor de água nos grãos de pólen após desidratação em estufa (35°C) e na sílica em diferentes intervalos de tempo (minutos).

Species	Intervalos de tempo de desidratação	Porcentagem de conteúdo de água dos grãos de pólen (%)	
		Estufa (35° C)	Sílica
<i>P. edmundoe</i>	0	44,7 a	44,7 a
	20	38,6 b	38,9 b
	40	32,1 c	35,0 c*
	60	30,3 c	33,9 c*
CV	2,4%		
<i>P. gibertii</i>	0	76,1 a	76,1 a
	20	72,6 a	69,6 b
	40	66,0 b	66,5 b
	60	60,7 c	62,1c
CV	4,1 %		
<i>P. kermesina</i>	0	49,8 a	49,8 a
	20	40,4 b	40,8 b
	40	38,2 b	36,7 c
	60	32,4 c	34,2 c
CV	4,12%		
<i>P. misera</i>	0	50,5 a	50,5 a
	20	37,5 b	43,4 b*
	40	35,3 b	38,8 c*
	60	31,9 c	33,7 d
CV	4,34 %		
<i>P. organensis</i>	0	58,6 a	58,6 a
	20	52,6 a	51,2 b
	40	43,5 b	47,0 c
	60	37,7 b	38,7 d
CV	7,9%		
<i>P. pohlii</i>	0	48,4 a	48,4 a
	20	41,3 b	41,0 b
	40	39,2 c	38,7 c
	60	31,5 d	36,3 d*

CV	2,16 %		
<i>P. porophyla</i>	0	56,7 a	56,7 a
	20	48,4 b	51,9 b
	40	41,0 c	40,6 c
	60	36,9 c	37,2 c
CV	8,45 %		
<i>P. suberosa</i>	0	45.8 a	45.8 a
	20	37.9 b	41.3 b
	40	33.8 c	38.0 c
	60	30.5 c	36.9 c
CV	4,93 %		

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente usando o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. * Indica variação significativa entre as duas formas de desidratação (forno e sílica).

Nos grãos de pólen recém-colhidos (controle), observaram-se variações no conteúdo percentual de água entre as espécies, sendo que o menor valor registrado foi de 44,7% para *P. edmundoe*, enquanto o valor mais elevado atingiu 76,1% para *P. gibertii*. Ao prolongar a duração da desidratação por 60 minutos, pôde-se observar uma tendência de diminuição nos percentuais do conteúdo de água para todas as espécies estudadas em ambas as condições, estufa ou sílica gel (Tabela 1). Dentro do conjunto de espécies investigadas, destacou-se *P. edmundoe*, que apresentou o menor conteúdo de água nos grãos de pólen, alcançando 30,3% após 60 minutos de exposição na estufa, ainda que esse valor seja muito próximo do que foi obtido por *P. suberosa*. Em contrapartida, *P. gibertii*, submetido ao mesmo período de exposição, registrou o maior valor, atingindo 62% após passar pelo processo de desidratação com sílica gel. É importante destacar que em relação à perda de água em cada acesso, nos diferentes intervalos de tempo, as discrepâncias foram muito sutis, seguindo um padrão semelhante (Tabela 1).

Para todas as espécies estudadas, os maiores percentuais de germinação in vitro foram obtidos em grãos de pólen recém-colhidos (Figura 3) exibindo valores que variaram entre 89% para *P. edmundoe* (Figura 3A) e 37% para *P. organenses* (Figura 3E). Contudo, mesmo após a desidratação a viabilidade dos grãos de pólen manteve-se boa nos diferentes períodos de desidratação (20, 40 e 60 minutos), tanto em sílica gel quanto em estufa (35°C). Esses

valores de germinação se apresentaram acima de 30% para todas as espécies investigadas, a única exceção foi observada em *P. misera* (Figura 3D), que revelou os índices mais baixos de germinação polínica, com 22,3% e 21,3% após 60 minutos de exposição em estufa e em sílica, respectivamente. Em contrapartida, *P. edmundoe* exibiu os maiores valores de germinação após o mesmo período de desidratação, registrando 84% e 73,3% após exposição em estufa e em sílica, respectivamente.

Para *P. edmundoe*, *P. kermesina* e *P. organensis* os tempos de desidratação em estufa sem passar pelo nitrogênio líquido praticamente não influenciaram a germinação, enquanto para todas as espécies a germinação diminuiu de forma significativa em ambas as condições (sílica e estufa), após a imersão em nitrogênio líquido deixando claro o efeito do congelamento. Para o comprimento do tubo polínico na desidratação de 40 min em estufa, foi observado tubos polínicos maiores depois da imersão em nitrogênio líquido, quando comparado a sílica gel (Figura 3).

3.2 Armazenamento em nitrogênio líquido

Nos testes de viabilidade *in vitro* dos grãos de pólen após a etapa de congelamento em nitrogênio líquido, foi observada uma interação significativa entre as condições de desidratação (estufa e sílica) e os intervalos de tempo (0, 20, 40 e 60 minutos) utilizados para cada espécie. Os maiores percentuais de germinação dos grãos de pólen submetidos à criopreservação foram observados nos tratamentos acima de 20 minutos de desidratação, com destaque para o tempo de 40 minutos em estufa, que registrou o melhor desempenho, contrastando com os demais tempos avaliados, tanto em estufa quanto em sílica (Figura 3).

Os resultados mais promissores da germinação *in vitro* após a criopreservação foram obtidos com *P. edmundoe* (Figura 3A), *P. gibretii* (Figura 3B) e *P. kermesina* (Figura 3C), cujos conteúdos de água antes do congelamento foram, 32,1%, 66,0% e 38,2% com taxas de germinação após a retirada do nitrogênio de 71%, 49% e 40,3% respectivamente.

As espécies *P. misera* (Figura 3D), *P. pohlii* (Figura 3F) e *P. suberosa* (Figura 3H) apresentaram germinação dos grãos de pólen após a criopreservação mesmo sem desidratação. Para *P. misera* (Figura 3D), não houve diferença estatística entre os grãos de pólen desidratados em diferentes tempos e os que não foram desidratados previamente à criopreservação. No entanto, em relação ao comprimento do tubo polínico, a desidratação por 40 minutos em estufa favoreceu o melhor resultado, em relação aos demais tratamentos

(Figura 3L). Esse tratamento apresentou 35,3% de conteúdo de água (Tabela 1) e germinação de 28% (Figura 3D). Na desidratação em sílica por 60 minutos, a germinação após congelamento em nitrogênio líquido apresentou decréscimo, enquanto os grãos de pólen desidratados nos demais intervalos de tempo não apresentaram diferença estatística na germinação polínica (Figura 3).

Para *P. pohlii* (Figura 3 F), ainda que não desidratados, os grãos de pólen apresentaram germinação superior a 20% após criopreservação. No entanto, seguindo uma tendência similar às demais espécies, o intervalo de 40 minutos em estufa propiciou a melhor resposta após criopreservação, em comparação aos demais tratamentos e intervalos de desidratação, com percentual médio de 37% de germinação.

No caso de *P. suberosa* (Figura 3H), o melhor resultado para a germinação (49,3%) após a criopreservação foi obtido sem nenhum tratamento de desidratação e com um conteúdo de água de 45,8% (Tabela 1). Para essa espécie, nas duas condições de desidratação utilizadas, o melhor resultado foi sem desidratar os grãos de pólen previamente.

O desenvolvimento do tubo polínico para os grãos de pólen submetidos à criopreservação revelou diferenças significativas no que diz respeito, tanto às condições quanto aos tempos de desidratação de cada espécie em análise. Para a maioria das espécies, foi observado um crescimento significativo do tubo polínico nos grãos de pólen após a criopreservação, em comparação com os grãos de pólen fresco (Figura 3).

Os maiores valores de comprimento de tubo polínico foram registrados na desidratação em estufa, com o tempo de 40 min para quase todas as espécies. Dentre esses, *P. edmundoe*, *P. gibretii*, *P. misera* e *P. pohlii* se destacam ao exibir um comprimento do tubo polínico semelhante ou superior aos grãos de pólen controle, com valores de 1,27 mm, 0,93 mm, 1,1 mm e 0,94 mm, respectivamente, para os grãos de pólen criopreservados, em relação a 1,28 mm, 0,91 mm, 0,74 mm e 0,89 mm do controle (Figura 3).

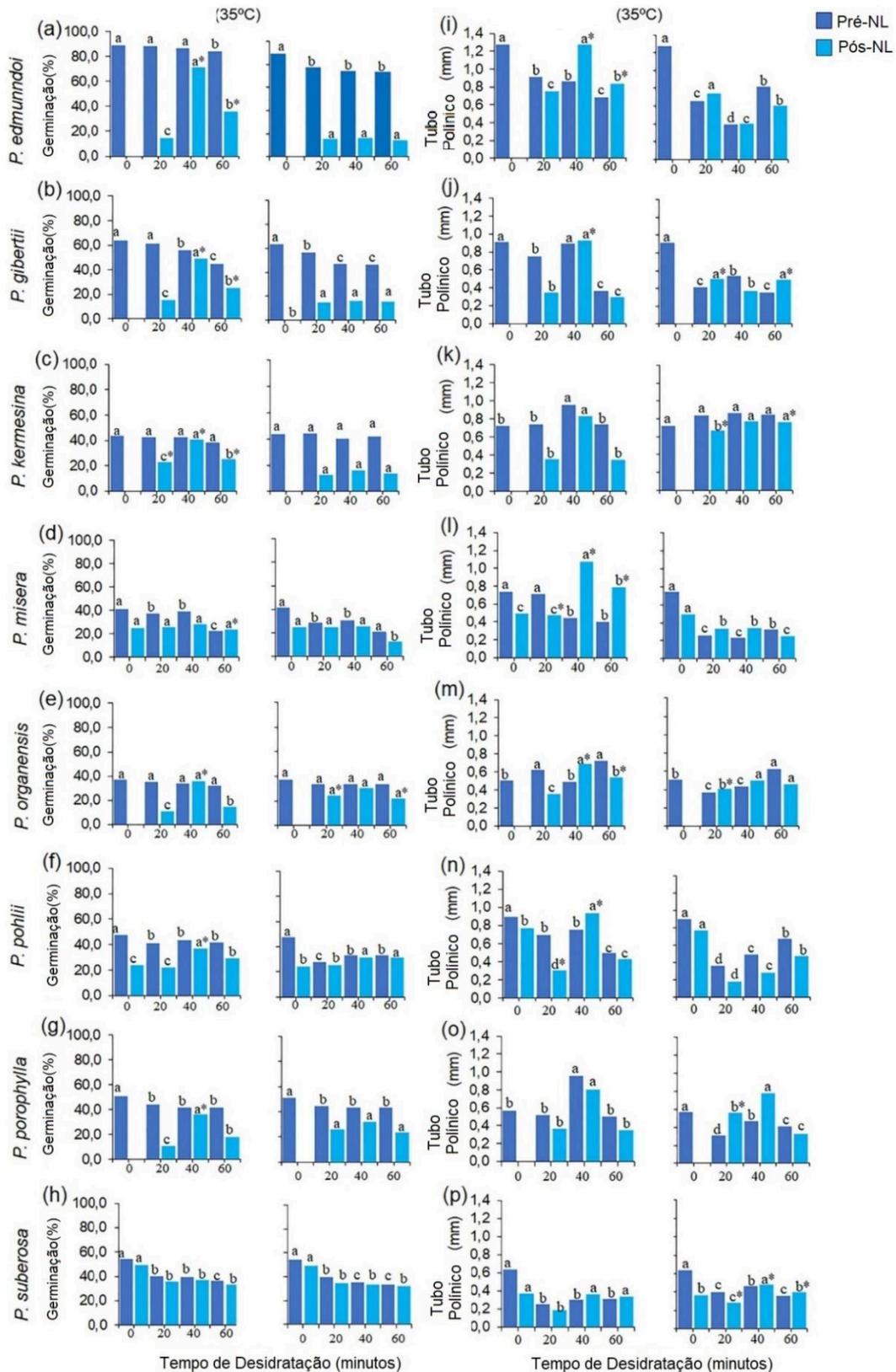


Figura 3. Gráfico da germinação e comprimento do tubo polínico nos dois métodos de desidratação (estufa e sílica) e em diferentes intervalos de tempo (0, 20, 40 e 60 minutos) antes e depois da NL. Letras iguais não diferem estatisticamente nos tempos de desidratação

dentro de cada tratamento (pré-NL e pós-LN). *Indica uma diferença significativa para métodos de desidratação pós-LN.

Para a etapa das polinizações em campo com grãos de pólen criopreservados, foram selecionados os resultados mais promissores obtidos após 24 horas de exposição ao nitrogênio líquido (Figura 4). Na maioria das espécies, os melhores resultados foram obtidos com a desidratação em estufa (35°C) por 40 minutos, com exceção de *P. suberosa*, que apresentou maior êxito após exposição ao nitrogênio líquido sem desidratação prévia dos grãos de pólen. Em 10 polinizações *in vivo* realizadas com grãos de pólen criopreservados, foram obtidos, para a maioria das espécies analisadas, resultados superiores a 50% de vingamento nas polinizações (Tabela 2), com subsequente frutificação e formação de sementes viáveis (Figura 5). No ensaio de viabilidade das sementes, foi constatada uma média de germinação que variou entre 70% e 100% para as sementes controle e 67% e 99% para as sementes oriundas de pólen criopreservado (Tabela 3). Importante ressaltar que não houve diferença estatisticamente significativa entre a germinação das sementes do grupo controle e das sementes provenientes dos grãos de pólen submetidos à criopreservação.

Tabela 2. Porcentagem de frutos formados após polinizações de campo com grãos de pólen criopreservados e o número subsequente de sementes geradas.

Espécies	Frutos Formados (%)*	Número de sementes
<i>P. edmundoi</i>	50	395
<i>P. gibertii</i>	40	280
<i>P. kermesina</i>	50	560
<i>P. misera</i>	50	163
<i>P. organensis</i>	60	156
<i>P. pohlii</i>	60	143
<i>P. porophyla</i>	70	181
<i>P. suberosa</i>	60	132

* Foram polinizadas dez flores de cada espécie.

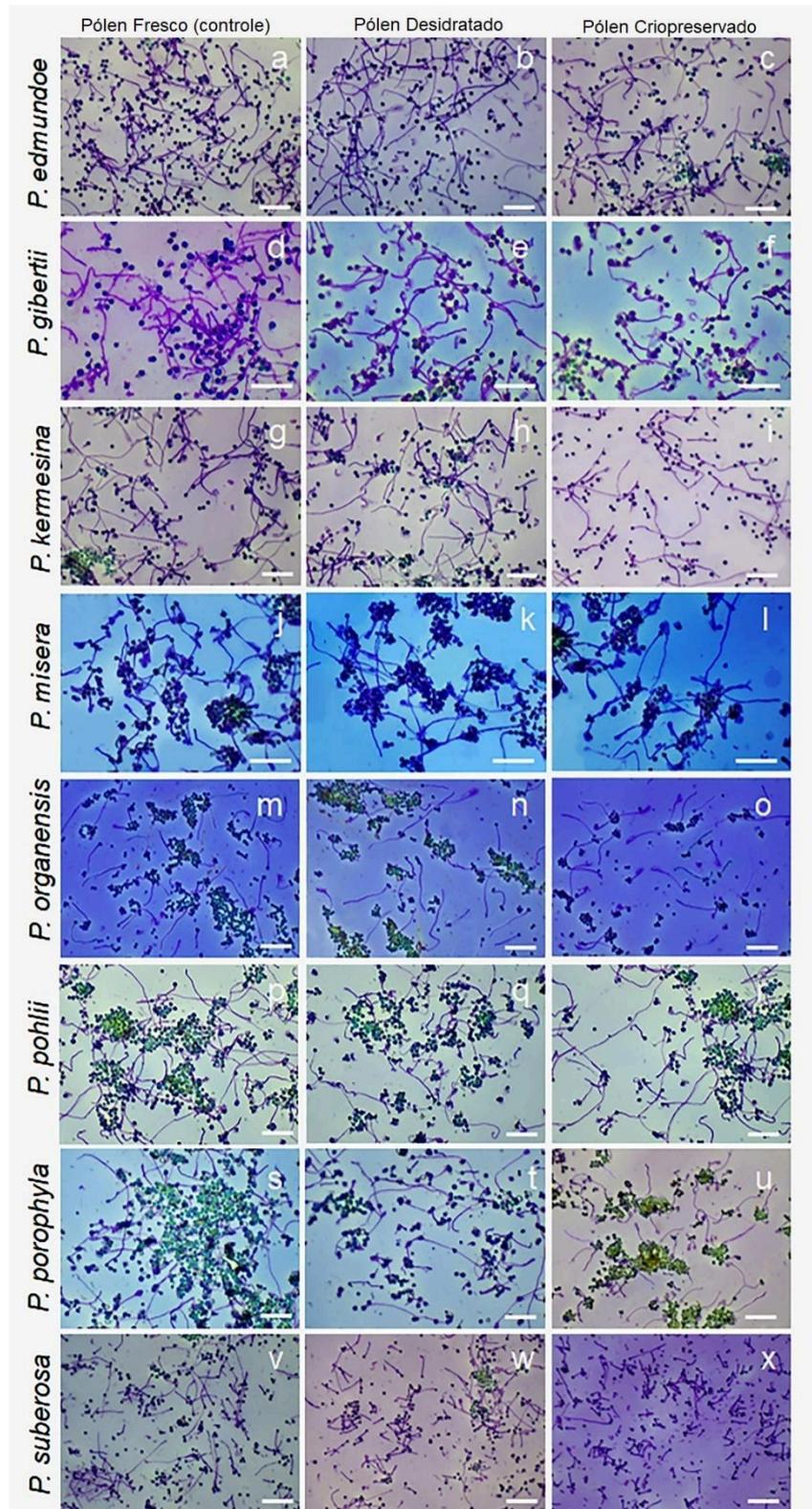


Figura 4. Germinação in vitro de grãos de pólen: fresco; após desidratação; após 24 h em nitrogênio líquido.

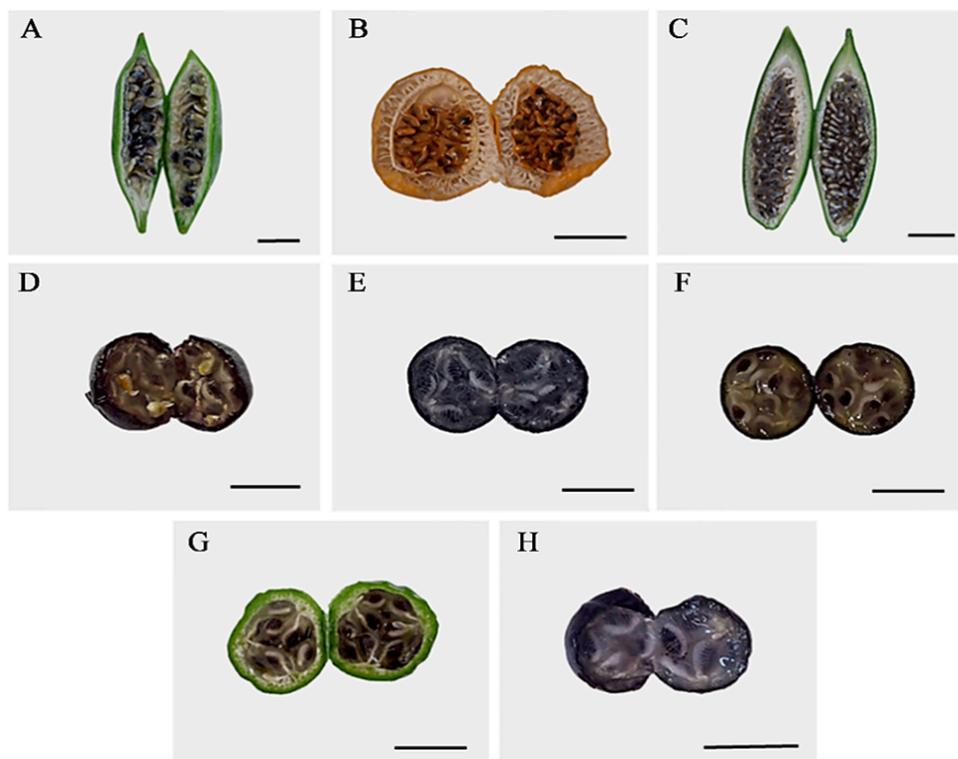


Figura 5. Imagens dos frutos das 8 espécies de *Passiflora* formados por polinização com pólen criopreservado: A) *P. edmundoe*; B) *P. gibertii*; C) *P. kermesina*; D) *P. misera*; E) *P. porophylla*; F) *P. organensis*; G) *P. pohlii*; H) *P. suberosa*; Barra de escala: 10 mm.

Tabela 3. Germinação de sementes obtidas de grãos de pólen frescos (controle) e sementes de grãos de pólen criopreservados (crio) por 24 horas.

	<i>P.</i> <i>edmundoe</i>	<i>P.</i> <i>giberti</i>	<i>P.</i> <i>kermesina</i>	<i>P.</i> <i>misera</i>	<i>P.</i> <i>organensis</i>	<i>P.</i> <i>pohlii</i>	<i>P.</i> <i>porophylla</i>	<i>P.</i> <i>suberosa</i>
Control	70%	95%	84%	92%	100%	90%	96%	96%
Crio	67%	99%	69%	91%	99%	88%	93%	98%
CV %	10.24	8.61	12.88	10.87	4.61	12.81	6.75	10.11

4 Discussão

O pólen é uma fonte útil de diversos alelos dentro de um pool genético e, portanto, pode ser uma estrutura eficaz para ser conservada em bancos de genes. A facilidade de armazenamento e transporte, pode proporcionar aos pesquisadores mais opções para

planejamento em seus programas de melhoramento genético. Uma dessas opções é para solucionar a assincronia de florescimento (Rajasekharan e Ravi, 2023), que pode se tornar uma barreira para hibridações de interesse, e que ocorre entre várias espécies de *Passiflora* (Soares et al., 2018). Adicionalmente, mesmo entre espécies da mesma família, variações consideráveis, frequentemente associadas ao tamanho, cores e à morfologia polínica, são comuns (Soares et al., 2015). Além disso, é uma forma de conservar alelos, como estratégia complementar aos bancos de germoplasma de uma determinada cultura ou espécie. Dentre as formas de se conservar pólen, a criopreservação vem ganhando destaque, por ser de longo prazo e manter a viabilidade e a longevidade do pólen (Souza et al., 2015; Silva et al., 2017; Dinato et al., 2020).

Entretanto, independente da finalidade ou método de conservação, uma premissa para o armazenamento eficiente dos grãos de pólen é a manutenção da viabilidade, uma vez que diversos fatores afetam a longevidade dos grãos de pólen. Dentre esses fatores, destacam-se o teor de água, a temperatura de armazenamento, as condições de campo e a umidade no momento da coleta (Volk, 2011). Além de aspectos fundamentais como viabilidade e longevidade, a pesquisa sobre conservação do pólen envolve questões como tempo de desidratação, temperatura, umidade e condições de armazenamento para otimizar a conservação (Ajeeshkumar e Decruse, 2013).

O estudo apresentado aqui, aborda esses fatores e mostra os resultados de criopreservação dos grãos de pólen, cujas variações estão intrinsecamente ligadas às condições de desidratação, considerando intervalos de tempo diferentes, mas também às peculiaridades das espécies avaliadas. Esta diversidade resulta da complexidade morfológica dos grãos de pólen, que se caracterizam por diferentes formas, tamanhos, cores e ornamentações da exina, variando de acordo com cada espécie, gênero e família (Mert, 2010; Fazal et al., 2013; Silvério; Mariath, 2014; Mezzonato-Pires et al., 2015; Silva et al., 2016). Esta complexidade é particularmente notável no caso de Passifloraceae, dada a grande variabilidade fenotípica dos grãos de pólen, abrangendo características ainda pouco exploradas sob a perspectiva sistemática e filogenética (Dettke e Santos, 2009).

As duas condições de armazenamento estudadas, a estufa (35°C) e a sílica gel mostram um comportamento similar dentro de cada espécie, em relação aos conteúdos de água (Tabela 1). Em ambas as condições, o conteúdo de água diminui à medida que aumenta o tempo de desidratação. Entretanto a sílica parece ser menos eficiente para desidratar os

grãos de pólen de *P. edmundoe*, *P. misera* e *P. pohlii* (Tabela 1) com uma diferença significativa em relação à estufa.

O processo de desidratação de grãos de pólen precisa ser ainda mais acurado quando for para criopreservar, a fim de evitar a formação de cristais de gelo que é letal para a estrutura. Vários estudos apontam que um conteúdo de água em torno de 30% seria ideal (Towill, 2002) para criopreservação, mas os resultados obtidos com *Passiflora* neste trabalho deixam evidente que, mesmo dentro do próprio gênero isso é muito variável. Neste trabalho, o tempo de desidratação de 40 min em estufa, promoveu os melhores resultados pós-criopreservação, variando de 32% a 66% para os valores de conteúdo de água. Até os tempos de desidratação são muito variáveis entre as espécies ou cultivos e mesmo entre genótipos ou variedades.

Silva et al. (2017) relatam que, para a criopreservação de grãos de pólen de acessos de abacaxi silvestre, o tempo ideal de desidratação em sílica gel foi de 6 horas, enquanto para algumas espécies de bromélias da mesma família, apenas 3 horas são necessárias (Souza et al, 2015). Para ambos os trabalhos citados acima o conteúdo de água para resultados positivos ficou em torno de 30% em ambos os tempos. Este estudo ratifica essa observação, uma vez que espécies do mesmo gênero exibem comportamentos diversos em relação ao conteúdo de água inicial, após a desidratação e a resposta germinativa, principalmente após a criopreservação. A existência dessas variações enfatiza a necessidade de ajustes em etapas do processo ou protocolos mais específicos de criopreservação (Ganeshan et al., 2008; Borghezan et al., 2011; Kulus e Zalewska, 2014; Vishwakarma et al., 2021).

O sucesso da criopreservação de grãos de pólen é atribuído ao seu preparo em relação, principalmente, ao seu conteúdo de água. O objetivo é evitar a formação de cristais de gelo, que danificam as membranas celulares, originando a morte celular, representando um desafio considerável na criopreservação (Benson, 2008). A associação de baixa umidade e temperaturas ultrabaixas (-196°C), resulta na redução significativa do metabolismo celular, o que contribui para maior preservação dos grãos de pólen (Benson, 2008). Chander et al. (2019) destaca que um baixo conteúdo de água durante a criopreservação reforça a integridade coligativa, osmótica e estrutural das células, contribuindo para a manutenção da qualidade física do pólen, importante para a etapa do descongelamento e a manutenção da viabilidade polínica.

Portanto, a avaliação de diferentes tempos de desidratação é fundamental, visando a sincronização do teor de água do grão de pólen com a eficácia da germinação in vitro (Silva et

al., 2017). Neste contexto, este estudo demonstrou que os melhores resultados no teste de viabilidade *in vitro* após a criopreservação são alcançados com teor de água variando de 32,1% (*P. edmundoe*) a 45,8% (*P. suberosa*), enquanto para *P. gibertii* esse valor é 66,0%. Embora a sugestão seja que o teor de água seja inferior a 30% para uma criopreservação bem sucedida, ainda não existem estudos que estabeleçam um valor mínimo que possa ser aplicado universalmente para manter a viabilidade do pólen em diferentes espécies.

Adicionalmente, os resultados provaram a importância da desidratação para a germinação e o crescimento do tubo polínico após a criopreservação em grande parte das espécies. Somente *P. pohli*, *P. misera* e *P. suberosa* exibiram boa germinação com grãos de pólen frescos, dispensando a desidratação. Embora casos de boa germinação com grãos de pólen fresco sejam incomuns nos estudos de criopreservação de pólen, Ouyang et al. (2010) defendem que a germinação do pólen fresco de *Dendrobium densiflorum* (com um teor de água de 43,26% e sem desidratação) após exposição ao nitrogênio líquido, permaneceu igual à do grupo de controle que não foi exposto ao nitrogênio líquido. Este estudo respalda essa perspectiva, especialmente em relação a *P. suberosa*, que apresentou uma germinação polínica mais bem-sucedida após a criopreservação dos grãos de pólen sem desidratação prévia. O pólen fresco de *P. suberosa* apresentou conteúdo de água de 45,8%, com uma média de germinação polínica de 49,3%. Isso ressalta ainda mais a importância dos estudos de criopreservação, que podem demandar elaboração de protocolos extremamente específicos.

Na escolha da temperatura de 35°C para a etapa de desidratação dos grãos de pólen em estufa, foi considerado o contexto tropical e subtropical predominante do maracujá, que exibe uma boa adaptação a temperaturas mais altas. Essa escolha é respaldada por Lima e Borges (2004), que afirmam que a temperatura ideal para a polinização do maracujá varia de 18° C a 35° C, sendo essa faixa de temperatura considerada ótima para o desenvolvimento dos grãos de pólen e para a atividade dos insetos polinizadores, como abelhas e outros insetos voadores.

Na investigação em questão, o tempo de imersão em nitrogênio líquido estabelecido foi de 24 horas. Os resultados obtidos demonstraram promissor avanço nos esforços de conservação em longo prazo dos grãos de pólen de *Passiflora*. Essa constatação está identificada com a teoria proposta por Lambardi et al. (2008), a qual argumenta que o metabolismo celular diminui drasticamente, ou seja, as atividades biológicas do pólen são paralisadas em um nível basal, em questão de poucas horas após a exposição ao nitrogênio líquido. Outros estudos corroboram com essa teoria, como evidenciado por Souza et al. (2015) em *Aechmea bicolor*, Karun et al. (2014) em *Cocos nucifera L.* e Silva et al. (2017) em

pesquisas que envolveram acessos de abacaxi silvestre. Em tais estudos, diferentes intervalos de tempo de criopreservação foram testados, e não foram observadas diferenças significativas na viabilidade do pólen quando comparados aos testes após 24 horas de imersão em nitrogênio líquido.

Os resultados da pesquisa aqui apresentados sobre a criopreservação de pólen sugerem uma abordagem promissora para a conservação de alelos das espécies de *Passiflora*. Após ser armazenado por 24 horas em nitrogênio líquido, o pólen manteve uma taxa satisfatória de germinação *in vitro* e permaneceram viáveis mesmo quando expostos a temperaturas extremamente baixas. Além disso, o percentual de germinação observado no pólen criopreservado sugere a possibilidade de uma longa vida útil, o que, por sua vez, asseguraria a disponibilidade de pólen viável à longo prazo (Rajasekharan e Ganeshan, 2019).

No estudo conduzido por Silva et al. (2017), destacou-se que a conservação em nitrogênio líquido resultou em um aumento significativo nos percentuais de germinação para a maioria dos acessos, em comparação com a viabilidade dos grãos de pólen fresco. Os autores sugeriram que esse efeito positivo poderia ser atribuído à influência da temperatura ultra-baixa ou à desidratação. Em nossa pesquisa, observou-se que, ao contrário do mencionado no trabalho de Silva et al., a conservação em nitrogênio líquido não promoveu um aumento nos percentuais de germinação polínica das espécies quando comparada aos grãos de pólen frescos. Entretanto, é relevante ressaltar que a conservação manteve níveis consistentes de germinação, resultando em desempenho satisfatório durante os ensaios de polinização em campo.

As polinizações *in vivo*, são determinantes para corroborar os resultados obtidos com a criopreservação, e deixaram evidente o potencial de uso do pólen criopreservado como ferramenta importante para o melhoramento genético do maracujazeiro. À semelhança desse trabalho, a eficácia do pólen criopreservado de diversas espécies também foi corroborada por meio de estudos de polinização em campo, culminando na subsequente frutificação e na formação de sementes viáveis. Isso foi evidenciado em pesquisas realizadas em mangueiras (Ganeshan et al., 2003; Chaudhury et al., 2010), abacaxizeiro (Silva et al., 2017) e goiabeiras (Vishwakarma et al., 2021).

5. Conclusão

Até o presente momento, este estudo representa um marco pioneiro ao abordar a desidratação e criopreservação de pólen de espécies silvestres pertencentes ao gênero

Passiflora, e conservadas em um banco de germoplasma que é a base de um programa de melhoramento genético de maracujazeiro.

A desidratação em estufa a 35° C por 40 min foi o método mais eficaz, para a redução do conteúdo de água de grãos de pólen das espécies avaliadas.

Somente no caso de *P. suberosa* obteve uma germinação polínica satisfatória após o congelamento em nitrogênio líquido, dispensando uma etapa prévia de desidratação dos grãos de pólen.

A criopreservação de grãos de pólen de oito espécies de *Passiflora* foi bem-sucedida com subsequente formação de frutos e, finalmente, a produção de sementes viáveis após a polinização.

Os resultados obtidos nesta pesquisa têm impacto significativo na preservação de alelos de interesse, constituindo um alicerce importante em programas de melhoramento genético ampliando a capacidade de realizar cruzamentos entre genótipos com padrões desconhecidos de floração. Dessa maneira, a pesquisa viabiliza um amplo espectro de hibridização, permitindo a obtenção de novos genótipos robustos e tolerantes.

REFERÊNCIAS

- Ajeeshkumar, S.; Decruse, S. William., 2013. Fertilizing ability of cryopreserved pollinia of *Luisia macrantha*, an endemic orchid of Western Ghats. *CryoLetters*. 34, 20-29.
- Belo, G. O.; Souza, M. M.; Silva, G. S.; Lavinsky, M. P., 2018. Hybrids of *Passiflora*: *P. gardneri* versus *P. gibertii*, confirmation of paternity, morphological and cytogenetic characterization. *Euphytica*. 214, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-2021-2>.
- Benson, E.E.; Johnston, J.W.; Muthusamy, J.; Harding K., 2008. Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. In: *Plant tissue culture engineering*. Springer, Dordrecht, p. 441-476. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_24
- Bernacci, L.C.; Nunes, T.S.; Mezzonato, A.C.; Milward-de-Azevedo, M.A.; D.C. Imig; Cervi, A.C. (in memoriam) *Passiflora in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12506>>. Acesso em: 26 nov. 2024
- Borghezan, M.; Clauman, A. D.; Steinmacher, D. A.; Guerra, M. P.; Orth, A. I., 2011. In vitro viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. chev). *Crop breeding and applied biotechnology*, v. 11, p. 338-344. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332011000400007>.
- Cauz-Santos, L. A.; Munhoz, C. F.; Rodde, N.; Cauet, S.; Santos, A. A.; Penha, H. A.; Dornelas, M. C.; Varani, A. M.; Oliveira, G. C. X.; Bergès, H.; Vieira, M. L. C., 2017. The chloroplast genome of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) assembled from long sequence reads: structural organization and phylogenomic studies in Malpighiales, *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, v. 8, p.1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00334>.
- Chander, S.; Rajasekharan, P. E.; Kurian, Reju M., 2019. Pollen storage studies in sugar apple (*Annona squamosa* L.) cv. Balanagar, *Israel Journal of Plant Sciences*, v. 66, n. 3-4, p. 196-202. <https://doi.org/10.1163/22238980-20191080>.
- Chaudhury, R., Malik, S. K., Rajan, S., 2010. An improved pollen collection and cryopreservation method for highly recalcitrant tropical fruit species of mango (*Mangifera indica* L.) and litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *CryoLetters*. 31, 268-278.
- Coelho, M. S. E.; Bortoleti, K. C. A.; Araújo, F. P.; Melo, N. F., 2016. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parentes. *Euphytica*, Wageningen, v. 210, p. 93–104. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1704-4>.
- Dettke, G. A., & Santos, R. P. D., 2009. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L.(Passifloraceae). *Acta Botanica Brasílica*, 23, 1119-1128. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000400021>.

Dinato, N. B.; Imaculada Santos, I. R.; Zanotto Vigna, B. B.; De Paula, A. F.; Fávero, A. P., 2020. Pollen Cryopreservation for Plant Breeding and Genetic Resources Conservation. *Cryoletters*. 41, 115-127.

Dinato, N. B.; Santos, I. R. I.; Leonardecz, E.; Burson, B. L.; Quarin, C. L.; Paula, F.; Favero, A. P., 2018. Storage of Bahiagrass pollen at different temperatures. *Crop Science*. 58, 2391-2398. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.03.0164>.

Fazal, H.; Ahmad, N.; Abbasi, B. H., 2013. Identification, characterization, and palynology of high-valued medicinal plants. *Scientific World Journal*. 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/283484>.

Ferreira, M. S., Soares, T. L., Costa, E. M. R., da Silva, R. L., Jesus, O. N., Junghans, T. G., Souza, F. V. D., 2021. Optimization of culture medium for the in vitro germination and histochemical analysis of *Passiflora* spp. pollen grains. *Scientia Horticulturae*. 288, 110298. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110298>.

Freitas, J. C. O.; Viana, A. P.; Santos, E. A.; Silva, F. H.; Paiva, C. L.; Rodrigues, R.; Souza, M. M.; Eiras, M., 2015. Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV). *Tropical Plant Pathology, Heidelberg*. 40, 291-297. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0048-2>.

Ganeshan, S.; Rajasekharan, P. E.; Shashikumar, S.; Decruze, W., 2008. Cryopreservation of Pollen, In: Reed, B. M. (Eds.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. New York: Springer. 443-464. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_17.

Ganga, R. M. D.; Ruggiero, C.; Lemos, E. G. M.; Grili, G. V. G.; Gonçalves, M. M.; Chagas, E. A.; Wickert, E., 2004. Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores moleculares Aflp. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26, 494-498. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000300029>.

Karun, A., Sajini, K. K., Niral, V., Amarnath, C. H., Remya, P., Rajesh, M. K., Engelmann, F., 2014. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation. *CryoLetters*. 35, 407-417.

Kulus, D.; Zalewska, M., 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. *Scientia Horticulturae*. 168, 88-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.014>.

Lambardi, M.; Ozudogru, A.; Benelli, C. Cryopreservation of Embryogenic cultures., 2008. In: Reed, B.M (ed). *Plant Cryopreservation, a practical guide*. Springer, New York. 177-194. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_9.

Lima, L.K.D.S.; Jesus, O.N.; Soares, T.L.; Santos, I.S.; Oliveira, E.J.; Coelho Filho, M. A., 2020. Crescimento, respostas fisiológicas, anatômicas e nutricionais de duas espécies fenotipicamente distintas de maracujá (*Passiflora* L.) e seus híbridos em condições salinas. *Scientia Horticulturae*. 263, 109037. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109037>.

Li, J.W.; Ozudogru, E. A.; Li, J.; Wang, M-R.; Bi, W. L.; Lambardi, M.; Wang, Q-C., 2017. Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. *Biodiversity and Conservation*. 27, 795–814. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1481-y>.

- Li, J. W.; Zhang, X. C.; Wang, M. R.; Bi, W. L.; Faisa, M.; Silva, J. A. T.; Volk, G. M.; Wang, Q. C., 2019. Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of *Lilium* spp., 2017. *Plant Methods*. 15, 125- 136. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0506-9>.
- Lima, A. A.; Borges, A. L., 2004, Exigências Edafoclimáticas. In: Maracujá: produção e qualidade na passicultura. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 37-44.
- Meletti, L. M. M.; Soares-Scott, M. D.; Bernacci, L. C.; Alvares, V.; Azevedo Filho, J. A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá ornamental, 2011. *Ornamental Horticulture*. 17, 87-95. <https://doi.org/10.14295/rbho.v17i1.721>.
- Mert, C. Anther and pollen morphology and anatomy in walnut (*Juglans regia* L.), 2010. *Hortscience*. 45, 757-760. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.5.757>.
- Mezzonato-Pires, A. C.; Milward-De-Azevedo, M. A.; Mendonça, C. B. F.; Gonçalves-Esteves, V., 2015. Pollen morphology and detailed sexine of *Passiflora subgenus Astrophea* (Passifloraceae), *Plant Systematics and Evolution*. 301, 2189-2202. <https://doi.org/10.1590/1677-941X-ABB-2022-0122>.
- Mozzaquatro, J.; César, I. A.; Pinheiro, A. E. B.; Caldas, E. D., 2022 Pesticide residues analysis in passion fruit and its processed products by LC–MS/MS and GC–MS/MS: Method validation, processing factors and dietary risk assessment. *Food Chemistry*. 375, 131643. 10.1016/j.foodchem.2021.131643.
- Ocampo, J; Arias, J. C.; Urrea, R., 2016. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. *Euphytica*, Dordrecht. 209, 395-408. 10.1007/s10681-016-1647-9.
- Ouyang, Ying; Bingling, Li, And YAN, Liu. , 2010. Preservation of *Dendrobium densiflorum* pollen *Journal of Beijing Forestry University*. 32, 151-154.
- Pacini, E.; Hesse, M. Types of pollen dispersal units in orchids, and their consequences for germination and fertilization, 2002. *Annals of Botany*. 89, 653-664. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf138>.
- Panelli, M. F.; Pierine, D. T.; Souza, S. L. B.; Ferron, A. J. T.; Garcia, J. L.; Dos Santos, K. C.; Belin, M. A. F.; Lima, G. P. P.; Borguini, G.; Minatel, I. O.; Cicogna, A. C.; Francisqueti, F. V.; Corrêa, C. R., 2018. Bark of *Passiflora edulis* Treatment Stimulates Antioxidant Capacity, and Reduces Dyslipidemia and Body Fa in Db/Db Mice. *Antioxidants*. 7, 120. <https://doi.org/10.3390/antiox7090120>.
- Parton, E.; Vervaeke, I.; Delen, R.; Vandebussche, B.; Deroose, R., 2002. Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*. 125, 155 - 161. <https://doi.org/10.1023/A:1015884019619>.
- Pereira, P. P. A.; Lima, L. K. S.; Soares, T. L.; Laranjeira, F. F.; Jesus, O. N.; Girardi, E. A., 2019. Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of *Fusarium* wilt resistance in *Passiflora* spp. *Crop Protection*, Oxford. 121, 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.018>.

- Rajasekharan, P.E.; Ganeshan, S., 2019. Current perspectives on pollen cryopreservation in horticultural species, In III International Symposium on Plant Cryopreservation. ActaHortic. 1234, 47–56. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1234.6>.
- Rajasekharan, P. E.; Ravi, Harsha., 2023. Viability and fertility of cryopreserved pollen of Brinjal and its wild relatives. Israel Journal of Plant Sciences. 1, 1-11. <https://doi.org/10.1163/22238980-bja10084>.
- R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/> (Accessed Dec 12, 2021).
- Ren, R.; Li, Z., Zhang; L., Zhou; H., Jiang; X., Liu, Y., 2020. Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia sufruticosa* pollen. Plant Cell Tissue and Organ Culture, Cham. 140, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01794-6>.
- Santos, V. O. D.; Viana, A. P.; Preisigke, S. D. C.; Santos, E. A., 2019. Characterization of a segregating population of passion fruit with resistance to Cowpea aphid borne mosaic virus through morpho-agronomic descriptors. Genetics and Molecular Research, Londres. 18, 1-13.
- Silva, V. J. D.; Ribeiro, E. M.; Luiz-Ponzo, A. P.; Faria, A. P. G., 2016. Ultrastructure and pollen morphology of Bromeliaceae species from the Atlantic Rainforest in Southeastern Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 88, 439-449. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620140715>.
- Silva, R. L.; Souza, E. H.; Vieira, L. J.; Pelacani, C. R.; Souza, F. V. D., 2017. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. Scientia Horticulturae, Amsterdam. 219, 326-334. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.022>.
- Silvério, A.; Mariath, J. E.A., 2014. Comparative structure of the pollen in species of *Passiflora*: insights from the pollen wall and cytoplasm contents. Plant Systematics and Evolution. 300, 347-358. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0887-6>.
- Soares, T. L.; Jesus, O. N.; Souza, E. H.; Oliveira, E. J., 2015. Reproductive biology and pollen-pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. Scientia Horticulturae, Amsterdam. 197, 339-349. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.045>.
- Sousa, V. A.; Schemberg, E. A.; Aguiar, A. V., 2010. Germinação in vitro do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). Scientia Forestalis. 38, 147-151.
- Souza, E. H.; Souza, F. V. D.; Rossi, M. L.; Brancalleão, N.; Silva Ledo, C. A.; Martinelli, A. P., 2015. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. Euphytica, Dordrecht. 204, 13-28. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1273-3>.
- Towill, L. E., 2002. Cryopreservation of Plant Germplasm II, Biotechnology in Agriculture and Forestry, (eds) Towill, L.E.; Bajaj. Y. P. S., Springer, Berlin. 50, 3-21. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04674-6_1.

- Vendrame, W. A.; Carvalho, V. S.; Dias, J. M. M.; Maguire, I., 2008. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. HortScience. 43, 264–267. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.1.264>.
- Vishwakarma, P. K.; Vasugi, C.; Vincent, L.; Rajasekharan, P., 2021. Effect of cryopreservation on pollen viability, fertility and morphology of different *Psidium* species. Cryobiology. 98, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.017>.
- Volk, G. M.; Bonnart, R.; Shepherd, A.; Krueger, R. R.; Lee, R., 2015. Cryopreservation of *Citrus* for long-term conservation. Acta Horticulture. 165, 187–191.10.17660/ActaHortic.2015.1065.19.
- Volk, G. M., 2011. Collecting pollen for genetic resources conservation. Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. 1-10.
- Wang, B.; Wang, R. R.; Cui, Z. H.; Bi, W. L.; Li, J. W.; Li, B. Q.; Ozudogru, A. E.; Volk, G. M.; Wang, Q. C., 2014. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. Biotechnology Advances. 32, 583-95. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.003>.
- Wang, M. R.; Longo, C.; Silva, J. A. T.; Volk, G.M.; Wang, Q. C., 2018. Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects. Plant Cell Reports. 37, 689-709. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2249-x>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, os dois capítulos desta tese ofereceram uma visão abrangente sobre a criopreservação de pólen. O primeiro capítulo abordou aspectos experimentais relacionados a criopreservação de pólen de oito espécies silvestre do gênero *Passiflora*, enquanto o segundo capítulo proporcionou uma análise sistemática do conhecimento existente na área a partir de 40 anos de pesquisa. Juntos, esses capítulos contribuem para o avanço do conhecimento e das práticas na criopreservação de pólen, promovendo mais uma alternativa para a conservação dos recursos genéticos vegetais e o melhoramento genético de plantas.

O estudo experimental realizado é pioneiro ao abordar as etapas fundamentais para a criopreservação de pólen de espécies silvestres de *Passiflora* conservadas em um banco de germoplasma associado diretamente ao melhoramento genético do maracujazeiro. A desidratação a 35°C por 40 minutos em estufa foi o método mais eficaz para reduzir o teor de água nos grãos de pólen das espécies analisadas. Para *P. suberosa*, foi possível obter germinação polínica satisfatória após o congelamento em nitrogênio líquido, sem necessidade de desidratação prévia. A criopreservação foi bem-sucedida nas oito espécies, resultando na formação de frutos e produção de sementes viáveis. Esses resultados são fundamentais para a preservação de alelos de interesse e ampliam a capacidade de cruzamentos em programas de melhoramento genético, permitindo a criação de novos genótipos mais robustos e tolerantes.

A revisão sistemática sobre criopreservação de pólen realizada, incluiu a análise de artigos publicados ao longo de 40 anos de pesquisa. Esta revisão marca a primeira revisão sistemática sobre o tema. Nela, exploramos informações importantes sobre as técnicas da criopreservação de pólen, o que nos permitiu comparar informações entre diferentes centros de pesquisa e obter uma visão ampla sobre as etapas mais determinantes da técnica e seus resultados, destacando protocolos eficientes e parâmetros importantes. Essa revisão forneceu uma abordagem sobre o conhecimento e desenvolvimento dessa estratégia ao logo desses anos. Foram identificados 566 artigos, dos quais 88 foram selecionados para compor esta revisão.

A revisão sistemática destacou a importância de métodos eficazes para avaliar a viabilidade polínica e aponta para a necessidade de estudos mais profundos sobre o comportamento do pólen depois da criopreservação. Embora métodos como germinação *in vitro* e coloração sejam amplamente utilizados, eles são menos precisos que os testes de

polinização in vivo. Além disso, há uma escassez de dados sobre os efeitos do armazenamento prolongado, superior a uma década. Atualmente, o foco está em espécies agrícolas, com a necessidade de estudos mais abrangentes que incluam espécies selvagens.

Fatores como estresse oxidativo e morte celular programada (PCD) são considerados as principais causas da redução da viabilidade polínica. Embora alguns estudos tenham avançado na compreensão dos mecanismos de dano durante a criopreservação, essa área ainda demanda investigações mais aprofundadas. Futuras pesquisas devem se concentrar na otimização de protocolos para minimizar os danos observados e expandir a aplicação da criopreservação de pólen a uma maior variedade de espécies. Essa ampliação terá um impacto significativo na conservação de recursos genéticos vegetais e no melhoramento genético de plantas.