

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

JASMIM JORDANA ARAUJO GONTIJO

EXTRAÇÃO, AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E ARMAZENAMENTO DE PÓLEN
DE PEQUI

MONTE CARMELO/MG

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JASMIM JORDANA ARAUJO GONTIJO

**EXTRAÇÃO, AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E ARMAZENAMENTO DE PÓLEN
DE PEQUI**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia Florestal, *Campus* Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Florestal.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Aparecida Alvarenga Arriel

MONTE CARMELO/MG

2026

JASMIM JORDANA ARAUJO GONTIJO

**EXTRAÇÃO, AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E ARMAZENAMENTO DE PÓLEN
DE PEQUI**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Engenharia
Florestal, *Campus* Monte Carmelo, da
Universidade Federal de Uberlândia, como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia Florestal.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Daniele Aparecida Alvarenga Arriel
Orientadora

Dr. Emmanuel Rezende Naves
Membro da Banca

Profa. Dra. Jacqueline Bonfim e Cândido
Membro da Banca

MONTE CARMELO/MG

2026

Dedico esta conquista aos meus pais, Idene e Eusebio, que são meu alicerce, minha referência de força e perseverança. Tudo o que sou carrega os ensinamentos e o amor que recebi de vocês.

Ao meu filho, Kauan, razão maior da minha caminhada. Que cada passo que eu dou seja exemplo para você e que esta vitória te mostre que, com coragem e fé, é possível transformar sonhos em realidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, fonte de toda a vida e sabedoria, que iluminou meus caminhos e me sustentou com sua infinita bondade, em sua imensidão, permitiu que eu encontrasse na espiritualidade e nos meus Orixás a força, a fé e a proteção necessárias para seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. Foi nessa conexão sagrada que encontrei equilíbrio e coragem para jamais desistir.

À minha mãe, Idene, e ao meu pai, Eusebio, por todo amor, dedicação e ensinamentos que moldaram quem eu sou. Obrigada por nunca me deixarem desistir, por serem minha base, meu apoio e minha segurança em todos os momentos. Aos meus irmãos, Thales e Klenette, por estarem sempre ao meu lado, oferecendo incentivo e apoio incondicional. Às minhas cunhadas, Larice e Hellen, pela parceria e carinho ao longo dessa caminhada.

Ao meu filho, Kauan, minha maior motivação e razão de cada esforço. Você é minha força diária, minha inspiração e o sentido mais profundo de todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Franciel, por todo amor, paciência e incentivo, especialmente nesta reta final, quando tantas vezes pensei em desistir. Obrigada por segurar minha mão e caminhar comigo. Aos meus queridos amigos que estiveram comigo nos momentos de cansaço e dúvida, oferecendo palavras de ânimo, risadas leves e apoio sincero. Cada gesto de carinho de vocês fez diferença nessa caminhada.

À minha orientadora, Dra. Daniele, pela paciência, dedicação, confiança e por compartilhar seus conhecimentos com generosidade. Sua orientação foi essencial para a concretização deste trabalho. A minha família e todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este sonho se tornasse realidade, minha sincera e eterna gratidão

RESUMO

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess.) é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro de grande importância ecológica e socioeconômica, cujo uso em programas de melhoramento genético está associado à viabilidade do pólen. Este estudo teve como objetivo estabelecer e otimizar protocolos para extração, germinação *in vitro* e armazenamento do pólen dessa espécie. Foram comparados três métodos de extração (antras removidas com tesoura, antras destacadas manualmente e liberação natural por imersão dos botões florais), cinco meios de cultura: (A) 10% de sacarose; (B) 15% de sacarose; (C) 20% de sacarose; (D) 10% de sacarose + 0,65 mM de ácido bórico; e (E) 10% de sacarose + 1,3 mM de ácido bórico; e três condições de armazenamento (temperatura ambiente ~25 °C, refrigeração ~8 °C e congelamento ~-15 °C), com a viabilidade avaliada ao longo de 131 dias. A imersão dos botões florais foi o método de extração mais eficiente, proporcionando maior rendimento e pureza do pólen. O meio contendo 10% de sacarose e 1,3 mM de ácido bórico apresentou a maior taxa de germinação (67,28%). Quanto ao armazenamento, a temperatura ambiente promoveu uma acentuada redução da viabilidade, com perda total após aproximadamente 42 dias, enquanto a refrigeração apresentou maior estabilidade durante todo o período experimental. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a refrigeração e o congelamento ($p \geq 0,05$), embora a refrigeração tenha demonstrado comportamento mais estável. Os resultados indicam que a combinação da imersão dos botões florais para extração, germinação em meio contendo 10% de sacarose e 1,3 mM de ácido bórico e armazenamento sob refrigeração constitui uma estratégia eficiente para o manejo do pólen de *C. brasiliense*, com potencial aplicação na conservação e no melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*; Conservação *ex situ*; Viabilidade polínica; Banco de germoplasma; Cerrado.

ABSTRACT

The pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) is a native species of the Brazilian Cerrado with significant ecological and socioeconomic importance, whose use in breeding programs is associated with pollen viability. This study aimed to establish and optimize protocols for pollen extraction, *in vitro* germination, and storage of this species. Three extraction methods were compared (anthers removed with scissors, anthers manually detached, and natural release by immersion of floral buds), five culture media: (A) 10% sucrose; (B) 15% sucrose; (C) 20% sucrose; (D) 10% sucrose + 0.65 mM boric acid; and (E) 10% sucrose + 1.3 mM boric acid; and three storage conditions (room temperature ~25 °C, refrigeration ~8 °C, and freezing ~-15 °C), with viability evaluated over 131 days. Immersion of floral buds was the most efficient extraction method, providing higher pollen yield and purity. The medium containing 10% sucrose and 1.3 mM boric acid showed the highest germination rate (67.28%). Regarding storage, room temperature led to a marked decline in viability, with total loss after approximately 42 days, whereas refrigerated conditions showed greater stability throughout the experimental period. No statistically significant differences were observed between refrigeration and freezing ($p \geq 0.05$), although refrigeration exhibited more stable behavior. The results indicate that the combination of floral bud immersion for extraction, germination in a medium containing 10% sucrose and 1.3 mM boric acid, and storage under refrigeration constitutes an efficient strategy for managing *C. brasiliense* pollen, with potential applications in conservation and genetic improvement.

Keywords: *Caryocar brasiliense*; *ex situ* conservation; pollen viability; germplasm bank; Brazilian Cerrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Exemplar adulto de <i>Caryocar brasiliense</i> em habitat natural.	12
Figura 2: Flor e folhas do pequizeiro.	13
Figura 3: Germinação <i>in vitro</i> de pólen de pequi em meio de cultura, mostrando grão com tubo polínico emitido. Aumento 100x.....	15
Figura 4: Localização geográfica da área de estudo no município de Monte Carmelo, Minas Gerais.....	18
Figura 5: Métodos de extração de pólen de <i>Caryocar brasiliense</i> testados. (A) Anteras removidas com tesoura de precisão; (B) Anteras destacadas manualmente com pinça; (C) Liberação natural: botões florais fechados imersos em água destilada até a antese; (D) coleta do pólen liberado.	19
Figura 6: Esquema representativo da metodologia de avaliação temporal sequencial empregada na análise dos meios de cultura.	21
Figura 7: Representação esquemática das três condições de armazenamento testadas no estudo.	22
Figura 8: (A) microtubos contendo pólen; (B) acondicionamento dos microtubos para armazenamento.....	23
Figura 9: Protocolos de avaliação de viabilidade com diferentes meios de armazenamento com tempo fixo de 4 horas de incubação.	25
Figura 10 Polén extraído por diversos meios. (A) Anteras removidas com tesoura de precisão; (B) Liberação natural: botões florais fechados imersos em água destilada até a antese; (C) Anteras destacadas manualmente com pinça.....	27
Figura 11 Viabilidade polínica (germinação <i>in vitro</i> em %) de <i>Caryocar brasiliense</i> armazenado em três condições (Temperatura Ambiente ~25 °C, Geladeira ~8 °C e Freezer ~-15 °C) ao longo de 131 dias. Pontos representam a média ± erro padrão. Linhas conectam as médias:.....	30
Figura 12: Tendência de variação da viabilidade polínica (%) de <i>Caryocar brasiliense</i> ao longo de 131 dias sob diferentes condições de armazenamento. As linhas representam o ajuste de regressão linear para cada condição.	33
Figura 13 Representação micrográfica (40X) da germinação <i>in vitro</i> de pólen de <i>Caryocar brasiliense</i> armazenado em Geladeira (8°C), após 131 dias de armazenamento.	34
Figura 14 Representação micrográfica (40X) da germinação <i>in vitro</i> de pólen de <i>Caryocar brasiliense</i> armazenado em Freezer (-15 °C), após 131 dias de armazenamento.	35

Figura 15 Representação micrográfica (40X) da germinação *in vitro* de pólen de *Caryocar brasiliense* armazenado em Temperatura ambiente (~25 °C) após 131 dias de armazenamento.

.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura testados para germinação <i>in vitro</i> de pólen de <i>Caryocar brasiliense</i>	20
Tabela 2: Germinação <i>in vitro</i> de pólen de <i>Caryocar brasiliense</i> em diferentes meios de cultura.	28
Tabela 3: Comparação múltipla (teste de Dunn) da viabilidade polínica média de <i>Caryocar brasiliense</i> entre diferentes condições de armazenamento ao longo de 131 dias.....	29
Tabela 4: Resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação da viabilidade polínica entre condições de armazenamento em cada tempo de avaliação.	31
Tabela 5: Comparação da viabilidade polínica entre geladeira (8 °C) e freezer (-15 °C) ao longo dos tempos de avaliação, com base no teste de Dunn (p-ajustado de Bonferroni).....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Pequi.....	12
2.2	Biologia Reprodutiva	13
2.3	Métodos de extração de pólen em espécies lenhosas.....	14
2.4	Avaliação da viabilidade polínica	15
2.5	Conservação e armazenamento de pólen	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Local de Estudo e Material Biológico.....	17
3.2	Avaliação de métodos de extração de pólen	18
3.3	Seleção do meios de cultura para a germinação <i>in vitro</i>	19
3.3.1	Preparo do meio de cultura e das lâminas.....	20
3.4	Avaliação do armazenamento e viabilidade do pólen ao longo do tempo.	22
3.4.1	Cronograma de avaliações	23
3.4.2	Classificação da viabilidade do pólen.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1	Avaliação dos métodos de extração de pólen	25
4.2	Germinação <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura	27
4.3	Viabilidade polínica durante o armazenamento	29
5	CONCLUSÕES.....	36
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é um dos principais centros de biodiversidade do mundo, abrigando cerca de 12.000 espécies vegetais, muitas delas endêmicas (NOVAES et al., 2013; FORZZA et al., 2021). Nesse bioma, destaca-se o pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.), uma espécie arbórea nativa e do Brasil, amplamente distribuída em formações savânicas do Cerrado. Embora o domínio do Cerrado se estenda para áreas da Bolívia e do Paraguai, a ocorrência natural da espécie é predominantemente registrada em território brasileiro, com importante papel ecológico na alimentação da fauna e elevada relevância socioeconômica, sendo utilizada por comunidades locais para consumo e geração de renda (LEITE et al., 2021; LEITE, 2024). O pequizeiro é imune ao corte e a espécie é protegida por legislação específica, como a Lei nº 10.883/1992 do estado de Minas Gerais, que restringe o corte e a exploração do pequizeiro nativo, visando sua conservação.

Os frutos do pequi servem como importante fonte nutricional para diversas populações do interior do Brasil, com uso consolidado na culinária regional. Pesquisas recentes apontam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em extratos derivados de diferentes partes da planta (VIEIRA et al., 2021). Essa combinação de atributos posiciona o pequi como recurso natural estratégico, com potencial para o desenvolvimento de produtos de valor agregado que abrangem desde alimentos funcionais até aplicações cosméticas e fitoterápicas. Contudo, para que esse potencial seja explorado de forma sustentável, é fundamental compreender a biologia reprodutiva da espécie.

O pequi apresenta sistema reprodutivo predominantemente alógamo e depende diretamente da atuação de polinizadores para a efetiva formação de frutos. Estudos indicam que a polinização de *C. brasiliense* é realizada principalmente por morcegos nectarívoros que visitam as flores durante o período noturno (GRIBEL; HAY, 1993). Investigações genéticas também demonstram elevados níveis de cruzamento entre indivíduos, evidenciando a importância do fluxo gênico mediado por polinizadores na manutenção da variabilidade genética da espécie (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001).

Apesar de representar uma estratégia evolutiva eficiente em ambientes naturais preservados, essa dependência de polinizadores específicos pode tornar a espécie sensível às alterações na paisagem. A fragmentação do Cerrado pode reduzir o fluxo gênico entre populações naturais e comprometer processos reprodutivos, especialmente quando há isolamento de indivíduos ou redução das populações de polinizadores (AMARAL et al., 2021). Esse cenário torna-se ainda mais preocupante diante da intensa conversão da vegetação nativa, uma vez que mais de 50% da cobertura original do Cerrado já foi transformada por atividades

agropecuárias e expansão urbana (MAPBIOMAS, 2023). Diante desse contexto, o desenvolvimento de estratégias voltadas ao manejo e conservação do pólen surge como alternativa relevante para apoiar programas de melhoramento genético e conservação da espécie. A utilização de pólen armazenado possibilita a realização de cruzamentos controlados entre indivíduos selecionados, superando limitações associadas à assincronia de floração ou à escassez de polinizadores naturais.

A etapa de extração do pólen representa um ponto crítico nesse processo, uma vez que métodos inadequados podem comprometer diretamente a viabilidade dos grãos coletados. Sendo assim técnicas apropriadas de coleta e manipulação são essenciais para preservar a integridade dos grãos de pólen e garantir seu potencial germinativo em avaliações experimentais (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992).

Após a extração, a avaliação da viabilidade polínica torna-se uma etapa indispensável. Entre os métodos disponíveis, a germinação *in vitro* é amplamente utilizada por permitir a observação direta do crescimento do tubo polínico em meios de cultura artificiais. A eficiência desse método depende diretamente da composição do meio de cultura, especialmente da presença de sacarose e micronutrientes que favorecem o desenvolvimento do tubo polínico, estudos clássicos demonstram que ácido bórico atua na integridade da parede celular e crescimento do tubo polínico (BREWBAKER; KWACK, 1963).

A conservação do pólen por períodos prolongados também representa uma estratégia importante em programas de melhoramento e conservação genética. A longevidade polínica durante o armazenamento está associada a fatores como teor de umidade, temperatura e características fisiológicas específicas de cada espécie vegetal (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992). De modo geral, os grãos de pólen podem ser classificados quanto ao comportamento de armazenamento em ortodoxos e recalcitrantes. O pólen ortodoxo apresenta tolerância à dessecação, podendo ser armazenado por períodos mais longos sob condições de baixa umidade e temperatura, enquanto o pólen recalcitrante é sensível à perda de água, sendo rapidamente inviabilizado quando submetido à dessecação ou a temperaturas muito baixas (FRANCHI et al., 2011; TRAN et al., 2021). Nesse contexto, diferentes metodologias de conservação têm sido empregadas, incluindo armazenamento em temperatura ambiente, refrigeração, congelamento e criopreservação, sendo a eficiência dessas técnicas diretamente dependente das características fisiológicas do pólen de cada espécie (GUOLLO et al., 2021). Para espécies tropicais como o pequi, entretanto, ainda existem lacunas no conhecimento sobre protocolos eficientes de armazenamento, o que reforça a necessidade de estudos voltados ao desenvolvimento de técnicas adaptadas às particularidades dessas espécies.

Nesse contexto, o estabelecimento de protocolos eficientes e acessíveis para o manejo do pólen de *C. brasiliense* pode contribuir significativamente para a produção de sementes com maior qualidade genética, além de apoiar iniciativas de restauração ecológica e conservação da biodiversidade do Cerrado.

Diante das considerações apresentadas, este trabalho tem como propósito central otimizar protocolos integrados para o manejo do pólen de *C. brasiliense*. Para tanto, busca-se comparar diferentes métodos de extração, avaliar formulações de meios de cultura para germinação *in vitro* e determinar condições otimizadas de armazenamento de baixo custo que preservem a viabilidade polínica por períodos estendidos. Por meio dessa abordagem experimental, pretende-se gerar subsídios técnicos aplicáveis a programas de melhoramento genético e conservação da espécie, contribuindo simultaneamente para o uso sustentável dos recursos naturais do Cerrado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pequi

O *Caryocar brasiliense* Cambess pertencente à família Caryocaraceae e é uma das espécies arbóreas mais representativas do bioma Cerrado (Figura 1). A espécie apresenta ampla distribuição nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, ocorrendo principalmente em formações de Cerrado *sensu stricto* e cerradão. Além de sua importância ecológica, o pequi possui elevado valor econômico e cultural, sendo amplamente utilizado na alimentação e em cadeias produtivas regionais (AGUIAR et al., 2011; VIEIRA et al., 2021).



Figura 1: Exemplar adulto de *Caryocar brasiliense* em habitat natural.

Fonte: Autora (2025)

O pequizeiro é uma árvore de porte médio que pode atingir entre 6 e 10 metros de altura, apresentando tronco tortuoso e casca espessa e fissurada, características típicas de espécies adaptadas às condições ambientais do Cerrado. Suas folhas são compostas e trifolioladas, com folíolos coriáceos e margens serrilhadas. A face inferior dos folíolos apresenta pilosidade densa, conferindo aspecto esbranquiçado característico da espécie (ALMEIDA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2023).

2.2 Biologia Reprodutiva

As inflorescências do pequizeiro surgem geralmente entre os meses de setembro e novembro, formando panículas terminais compostas por numerosas flores hermafroditas. As flores apresentam coloração esverdeada a amarelada e possuem grande número de estames, característica que favorece a produção abundante de pólen (Figura 2).



Figura 2: Flor e folhas do pequizeiro.

Fonte: Autora (2025)

Embora as flores sejam hermafroditas, a espécie apresenta sistema reprodutivo predominantemente alógamo, com elevada taxa de cruzamento entre indivíduos, podendo variar em função da subespécie, ecótipo ou estrutura das populações. Estudos genéticos indicam que

C. brasiliense apresenta altos níveis de cruzamento, embora com variação entre populações e indivíduos, além de ocorrência de endogamia biparental, associada à limitação do fluxo gênico e ao comportamento dos polinizadores (COLLEVATTI et al., 2001a; COLLEVATTI et al., 2001b). O fluxo gênico é mediado principalmente por polinizadores, contribuindo para a manutenção da diversidade genética das populações naturais, ainda que com dispersão de pólen em distâncias relativamente curtas e estruturação genética espacial (COLLEVATTI; HAY, 2011).

A polinização de *C. brasiliense* está predominantemente associada à quiropterofilia, com participação importante de morcegos nectarívoros (GRIBEL; HAY, 1993). No entanto, esse padrão pode variar em função da subespécie, ecótipo e condições ambientais, incluindo atividade em diferentes períodos do dia (DIAS et al., 2017). Além dos morcegos, outros visitantes florais, como abelhas, aves nectarívoras, mariposas e besouros, também são registrados, atuando como polinizadores ocasionais ou secundários (MELO, 2001). A ocorrência de visitantes diurnos, especialmente aves e insetos, amplia as possibilidades de polinização da espécie (MELO, 2001). Essa diversidade de visitantes contribui para o aumento do sucesso reprodutivo, especialmente por favorecer a polinização cruzada (GRIBEL; HAY, 1993).

A produção de frutos apresenta variação interanual significativa, podendo ser influenciada por fatores ambientais, disponibilidade de polinizadores e características fisiológicas da planta (VIEIRA et al., 2021).

2.3 Métodos de extração de pólen em espécies lenhosas

A extração eficiente de pólen é uma etapa fundamental em estudos de biologia reprodutiva e em programas de melhoramento genético vegetal, pois a viabilidade do pólen influencia diretamente o sucesso da fecundação e a formação de frutos (LIU et al., 2023). Diferentes metodologias podem ser empregadas para a obtenção de pólen viável, sendo a escolha do método dependente das características morfológicas das flores e das anteras de cada espécie (WAN et al., 2024).

Em espécies lenhosas, a extração pode ser realizada por meio da remoção manual das anteras ou pela coleta direta do pólen liberado durante a antese. Após a coleta, as anteras podem ser submetidas à secagem controlada, processo que favorece a deiscência e a liberação dos grãos de pólen, além de contribuir para a redução de impurezas (HINE-GÓMEZ et al., 2019). Procedimentos que minimizam danos mecânicos durante a manipulação das estruturas florais

tendem a preservar melhor a integridade fisiológica dos grãos de pólen, favorecendo análises posteriores de germinação e viabilidade polínica (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992).

2.4 Avaliação da viabilidade polínica

A determinação do potencial germinativo do pólen constitui etapa essencial em estudos de biologia reprodutiva e em programas de melhoramento genético vegetal, uma vez que a viabilidade e a capacidade de germinação estão diretamente relacionadas ao sucesso da fecundação (FRAGALLAH et al., 2019). Entre os métodos disponíveis, a germinação *in vitro* é amplamente utilizada por permitir a avaliação direta da viabilidade do pólen, bem como a observação do crescimento do tubo polínico em condições controladas (PANDEY; KUMAR, 2013) (Figura 3).



Figura 3: Germinação *in vitro* de pólen de pequi em meio de cultura, mostrando grão com tubo polínico emitido. Aumento 100x

Fonte: Autora (2024).

Nesse método, os grãos de pólen são incubados em meios de cultura contendo fontes de energia e nutrientes que simulam as condições do estigma floral, conforme proposto no meio clássico de germinação *in vitro* desenvolvido por Brewbaker e Kwack (1963). Esse meio, geralmente composto por sacarose, ácido bórico e sais minerais, permite a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico em condições controladas. A composição do meio influencia diretamente a germinação e o crescimento do tubo polínico (BREWBAKER; KWACK, 1963; FRAGALLAH et al., 2019).

A sacarose e o ácido bórico são componentes amplamente utilizados em meios de cultura para germinação *in vitro* de pólen. A sacarose atua como fonte de energia e regulador osmótico, favorecendo a germinação dos grãos de pólen, enquanto o ácido bórico está relacionado à síntese da parede celular do tubo polínico e ao transporte de açúcares durante seu crescimento. Dessa forma, ambos desempenham papel fundamental no processo germinativo, influenciando diretamente a taxa de germinação e o desenvolvimento do tubo polínico (FRAGALLAH et al., 2019; SHI et al., 2023).

Testes colorimétricos utilizando corantes vitais também podem ser empregados para estimar a viabilidade polínica. Entre os principais métodos, destacam-se o uso de cloreto de tetrazólio (TTC), que avalia a atividade respiratória celular; fluoresceína diacetato (FDA), baseada na integridade da membrana e atividade enzimática; acetocarmim e orceína acética, que coram o material nuclear; além de soluções como lugol, que indicam a presença de amido nos grãos de pólen (ABDUL-BAKI, 1992; IMPÉ et al., 2020; BISWAS et al., 2020). Esses corantes reagem com componentes celulares específicos, permitindo distinguir grãos viáveis e inviáveis por meio de alterações de coloração. Entretanto, esses métodos podem superestimar a viabilidade real, uma vez que grãos de pólen com citoplasma íntegro nem sempre apresentam capacidade de germinação efetiva (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; IMPÉ et al., 2020).

2.5 Conservação e armazenamento de pólen

A conservação de pólen viável por períodos prolongados representa ferramenta importante em programas de melhoramento genético e conservação de recursos genéticos vegetais, permitindo a realização de cruzamentos entre indivíduos com períodos de floração distintos e a manutenção de bancos de germoplasma (BARNABÁS; KOVÁCS, 1997). A eficiência do armazenamento está relacionada ao comportamento fisiológico do pólen, previamente descrito na literatura, bem como às condições de temperatura e umidade adotadas. Diferentes estratégias têm sido empregadas, incluindo armazenamento em temperatura

ambiente, refrigeração, congelamento e criopreservação, com resultados variáveis entre espécies (NAGAR et al., 2023; TRAN et al., 2021). Para espécies do Cerrado, como *C. brasiliense*, ainda há lacunas quanto à definição de protocolos eficientes de conservação, especialmente considerando suas particularidades ecológicas e fisiológicas.

A longevidade do pólen durante o armazenamento depende de fatores como teor de umidade, temperatura e condições atmosféricas. Em geral, temperaturas reduzidas diminuem a atividade metabólica dos grãos de pólen, retardando processos de deterioração (BENSON, 2008).

O armazenamento refrigerado tem sido amplamente utilizado para conservação de pólen em curto e médio prazo, uma vez que temperaturas em torno de 4 °C reduzem a atividade metabólica dos grãos e retardam a perda de viabilidade, embora não a impeçam completamente ao longo do tempo (ĆALIĆ et al., 2021). Em temperaturas de congelamento (~-20 °C), a longevidade pode ser ampliada em algumas espécies, porém nem sempre há aumento significativo na viabilidade, podendo ocorrer danos associados a alterações físico-químicas intracelulares (ĆALIĆ et al., 2021). Por outro lado, a criopreservação em temperaturas ultrabaixas (-196 °C) permite a conservação por longos períodos, pois praticamente interrompe o metabolismo celular; entretanto, a formação de cristais de gelo e o estresse osmótico podem comprometer a integridade celular caso não sejam adotados protocolos adequados de desidratação e congelamento (DU et al., 2025; REN et al., 2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Estudo e Material Biológico

A pesquisa foi conduzida no município de Monte Carmelo, localizado na mesorregião do Triângulo Mineiro, estado de Minas Gerais (Figura 4). A região está inserida no bioma Cerrado e apresenta coordenadas geográficas aproximadas de 18°43'30"S e 47°29'56"W. O clima predominante é classificado como tropical de altitude (tipo Aw segundo Köppen), caracterizado por estações bem definidas com verão chuvoso e inverno seco com precipitação média anual situa-se em torno de 1.400 a 1.600 mm, com temperatura média anual próxima de 21 °C, com base nas normais climatológicas do INMET (2023).

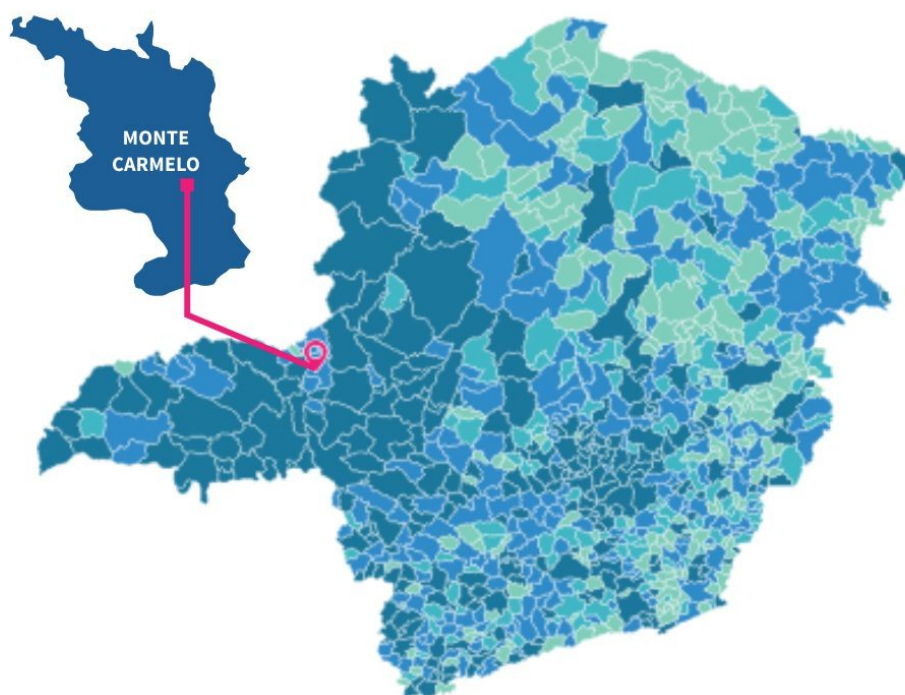


Figura 4: Localização geográfica da área de estudo no município de Monte Carmelo, Minas Gerais.

Fonte: Prefeitura Municipal de Monte Carmelo (2025).

Para as coletas, foram selecionados indivíduos adultos de *C. brasiliense* em estágio reprodutivo ativo, distribuídos em fragmentos de Cerrado preservado nas áreas urbana e periurbana do município. Os critérios de seleção incluíram: porte arbóreo desenvolvido e ausência de sinais visíveis de estresse fisiológico ou ataques patogênicos significativos. As coletas foram realizadas após obtenção de autorização dos proprietários das áreas.

3.2 Avaliação de métodos de extração de pólen

As atividades de campo foram programadas considerando a fenologia floral específica do pequi, que apresenta antese predominantemente noturna. As coletas foram realizadas às 9h, tanto botões abertos quanto fechados.

Os métodos avaliados foram:

- a) Anteras removidas com tesoura de precisão (Figura 5A);
- b) Anteras destacadas manualmente com pinça (Figura 5B);
- c) Liberação natural: botões florais fechados imersos em água destilada até a antese, seguida de coleta do pólen liberado (Figura 5C e 5D)

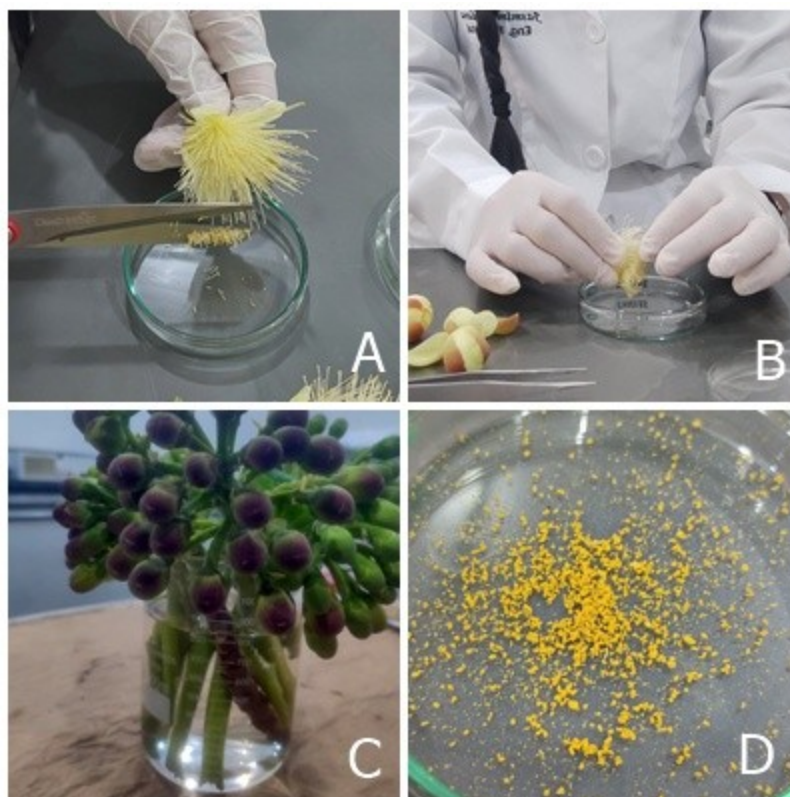


Figura 5: Métodos de extração de pólen de *Caryocar brasiliense* testados. (A) Anteras removidas com tesoura de precisão; (B) Anteras destacadas manualmente com pinça; (C) Liberação natural: botões florais fechados imersos em água destilada até a antese; (D) coleta do pólen liberado.

Fonte: Autora (2025).

A eficiência dos métodos foi avaliada com base em critérios qualitativos e observacionais:

- I. Quantidade de pólen liberado: avaliação visual comparativa;
- II. Pureza da amostra: presença de resíduos indesejados (pedaços de antera, tecidos florais);
- III. Viabilidade básica: confirmação da capacidade germinativa do pólen extraído por meio de teste de germinação *in vitro* no meio previamente selecionado como ótimo para a espécie (ver Seção 3.4)

3.3 Seleção do meios de cultura para a germinação *in vitro*

Foram testados cinco meios de cultura, amplamente utilizadas em estudos de germinação *in vitro* de pólen. Essas variações são frequentemente empregadas como

modificações do meio clássico proposto por Brewbaker e Kwack (1963), permitindo avaliar a influência da concentração de açúcares e micronutrientes sobre a germinação e o crescimento do tubo polínico (BREWBAKER; KWACK, 1963; PEREZ, 2017; NAGAR et al., 2023) (Tabela 1).

Tabela 1: Composição dos meios de cultura testados para germinação *in vitro* de pólen de *Caryocar brasiliense*

Meio	Sacarose (%)	Ácido bórico (H ₃ BO ₃) (mM)	Ágar (%)	Descrição da formulação
A	10	0	8	Controle com sacarose 10%
B	15	0	8	Controle com sacarose 15%
C	20	0	8	Controle com sacarose 20%
D	10	0,65	8	Sacarose 10% + baixa concentração de Bórico
E	10	1,3	8	Sacarose 10% + alta concentração de Bórico

3.3.1 Preparo do meio de cultura e das lâminas

Os meios foram preparados com ágar bacteriológico a 8% como agente solidificante, autoclavados a 121°C por 15 minutos e mantidos em banho-maria a 50–55 °C para evitar solidificação precoce. Com auxílio de pipeta, uma gota de meio foi depositada sobre cada lâmina de microscopia limpa, formando uma camada uniforme de aproximadamente 2 mm de espessura. A solidificação ocorreu em temperatura ambiente.

Uma pequena quantidade de pólen foi depositada sobre a superfície do meio solidificado com auxílio de um pincel fino esterilizado. As lâminas foram acondicionadas em caixas de acrílico, mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e a germinação foi avaliada às 2, 4 e 6 horas após o início da incubação. Considerou-se germinado o grão de pólen que apresentou tubo polínico com comprimento igual ou superior ao seu diâmetro (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992). Em cada avaliação, as lâminas foram fotografadas utilizando microscópio trinocular equipado com sistema de captura de imagens, marca Motic, com um aumento de 40x.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (meios), quatro repetições, correspondentes a quatro campos microscópicos distintos avaliados em cada lâmina (Figura 6).

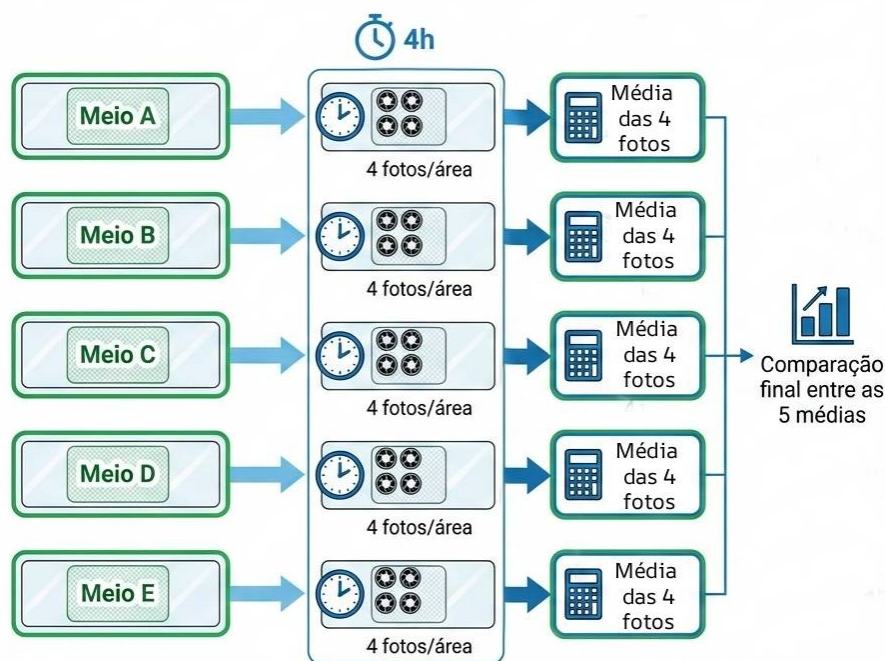


Figura 6: Esquema representativo da metodologia de avaliação temporal sequencial empregada na análise dos meios de cultura.

Fonte: Autora (2026).

Para a caracterização do desempenho germinativo, os dados foram submetidos ao cálculo da média aritmética das quatro repetições por tratamento. Embora tenham sido avaliados intervalos de 2, 4 e 6 horas, optou-se pela padronização das análises em 4 horas de incubação em todo o trabalho, tempo este suficiente para a emissão e visualização do tubo polínico sem prejuízo à contagem individual. A porcentagem de germinação para cada combinação meio foi calculada mediante a fórmula:

$$G(\%) = \left(\frac{N_g}{N_T} \right) \times 100$$

Onde onde G representa a germinação percentual, N_g o número de grãos germinados e N_t o total de grãos avaliados naquela avaliação.

Os pressupostos da ANOVA (normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias) foram verificados, respectivamente, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett. Como os dados originais não atenderam a esses pressupostos, optou-se pela transformação arcseno da raiz quadrada da proporção ($\arcsen pp$), onde pp é a proporção germinativa. Esta transformação é recomendada para dados percentuais, pois estabiliza a variância e aproxima a distribuição à normalidade (PIMENTEL GOMES, 2009; ZAR, 2010).

Após a transformação, os pressupostos foram reavaliados e atendidos, permitindo a aplicação da análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software R versão 4.3.1.

3.4 Avaliação do armazenamento e viabilidade do pólen ao longo do tempo.

As condições de armazenamento testadas foram (Figura 7):

1. **Temperatura ambiente** ($25 \pm 2^\circ\text{C}$);
2. **Geladeira** ($8 \pm 1^\circ\text{C}$);
3. **Freezer** ($-15 \pm 2^\circ\text{C}$).

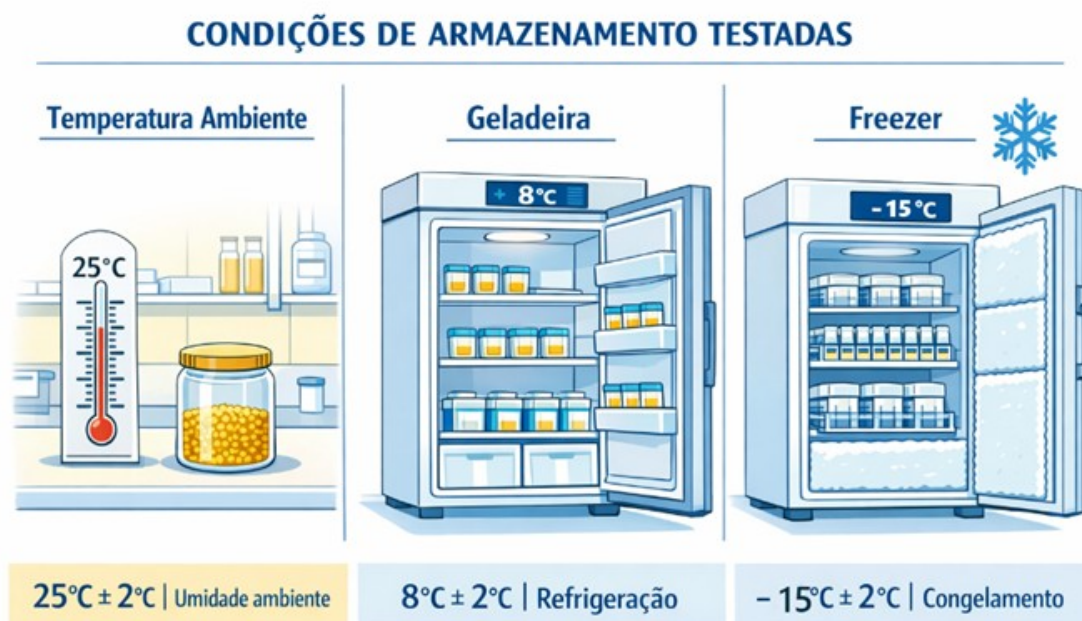


Figura 7: Representação esquemática das três condições de armazenamento testadas no estudo. Fonte: Autora (2026).

A escolha dessas condições foi baseada em estratégias amplamente utilizadas na literatura para conservação de pólen, que envolvem desde armazenamento em temperatura ambiente até condições de refrigeração e congelamento, permitindo avaliar diferentes níveis de redução da atividade metabólica e seus efeitos sobre a viabilidade polínica (ĆALIĆ et al., 2021). Além disso, essas condições foram selecionadas por representarem métodos de fácil acesso e baixo custo, podendo ser reproduzidos em laboratórios com infraestrutura básica, o que amplia a aplicabilidade prática dos resultados obtidos.

O pólen utilizado foi extraído pelo método de liberação natural (Seção 3.2), selecionado com base em testes preliminares. No primeiro ano experimental, foram avaliados diferentes

métodos de extração e meios de cultura, sendo adotado, no presente estudo, o método e o meio (Meio E: 10% sacarose + 1,3 mM de ácido bórico) que apresentaram maior taxa de germinação, visando sua aplicação na avaliação do melhor método de armazenamento.

Para as análises ao longo do tempo, o pólen foi acondicionado em microtubos de polipropileno (1,5 mL) (Figura 8A) e acondicionados em potes de 120ml (Figura 8B) e armazenados conforme os tratamentos mencionados (Figura 7).

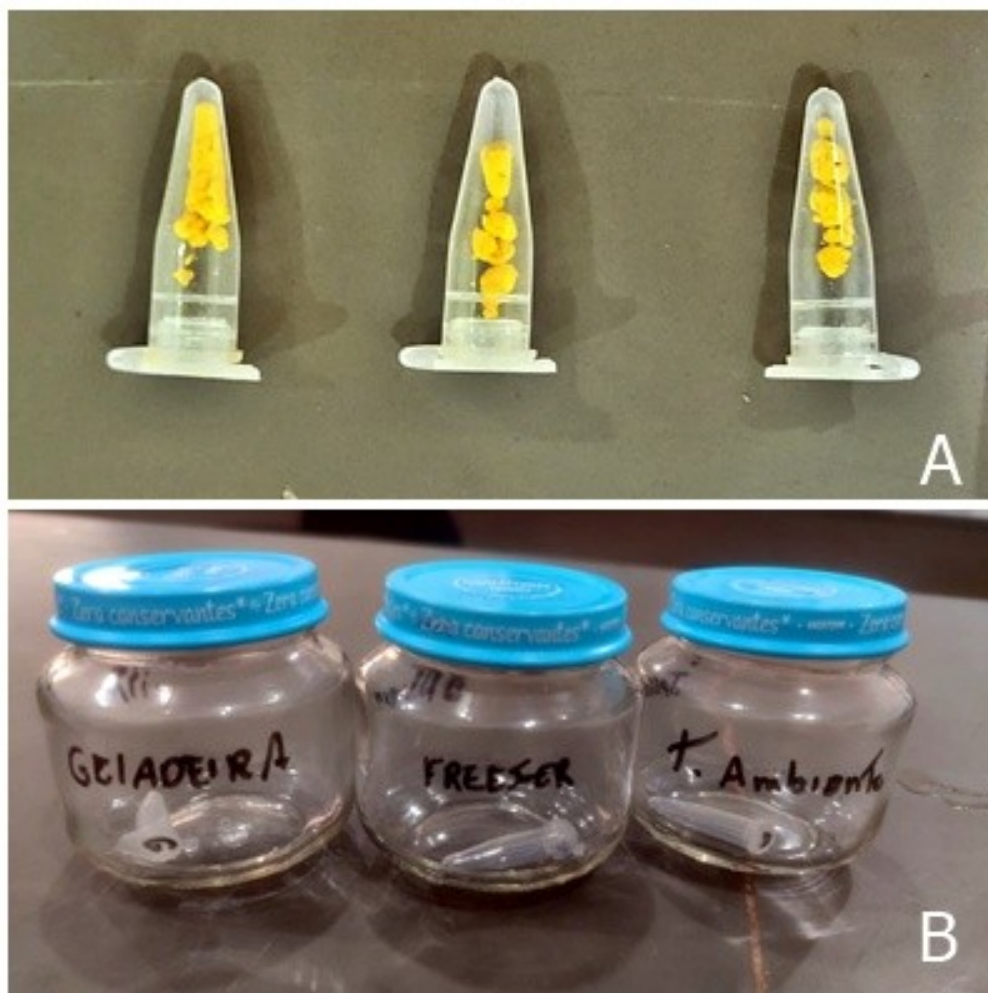


Figura 8: (A) microtubos contendo pólen; (B) acondicionamento dos microtubos para armazenamento.

Fonte: Autora (2025).

3.4.1 Cronograma de avaliações

As avaliações de viabilidade foram realizadas em intervalos de tempo predefinidos ao longo de um período de 131 dias após a coleta. As análises foram conduzidas inicialmente em intervalos curtos (1 a 4 dias), progressivamente ampliados para intervalos semanais, quinzenais e, finalmente, mensais.

Para avaliar a viabilidade do pólen de *C. Brasiliense* sob diferentes condições de armazenamento, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3×11 , sendo os fatores local de armazenamento com 3 níveis: temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), geladeira ($8 \pm 1^\circ\text{C}$) e freezer ($-15 \pm 2^\circ\text{C}$) e tempo de armazenamento com 11 níveis (11 períodos de avaliação distribuídos ao longo de 131 dias). Para cada combinação condição de armazenamento $\times$ período, foram utilizadas quatro repetições. A avaliação foi realizada em uma lâmina por tratamento, com a viabilidade sendo calculada a partir da média de contagens feitas em quatro campos microscópicos representativos, fotografados em cada lâmina.

Para cada repetição, a porcentagem de germinação (G%) foi calculada conforme a fórmula apresentada na Seção 3.4.2, considerando o número total de grãos germinados (N_g) e o número total de grãos contados (N_t) nas quatro fotografias obtidas por lâmina.

Os dados de porcentagem de germinação do experimento de armazenamento foram transformados ($\arcsen \sqrt{x \div 100}$) visando atender aos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, conforme recomendado para dados de proporção (PIMENTEL-GOMES, 2009). A transformação arcsen é indicada para estabilizar a variância em dados proporcionais e aproximar a distribuição à normalidade, sendo amplamente utilizada na análise de porcentagens (AHRENS et al., 1990; WARTON; HUI, 2011).

Após a transformação, os pressupostos foram verificados por meio do teste de Shapiro-Wilk (normalidade) e do teste de Bartlett (homogeneidade). Como os resíduos não atenderam aos pressupostos paramétricos mesmo após a transformação, optou-se por utilizar testes não paramétricos: o teste de Kruskal-Wallis para verificar diferenças entre os tratamentos, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas, com correção de Bonferroni ($p < 0,05$). Além da análise global, foram realizadas comparações entre as condições de armazenamento em cada tempo de avaliação de forma independente. Para isso, os dados foram particionados por período, sendo aplicado, em cada tempo, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$), para comparações múltiplas, com correção de Bonferroni ($p < 0,05$). Essa abordagem possibilitou identificar diferenças pontuais entre os tratamentos ao longo do tempo, permitindo uma compreensão mais detalhada da dinâmica da viabilidade polínica durante o armazenamento.

A magnitude das diferenças entre os tratamentos foi quantificada mediante a estatística Z do teste de Dunn. Este parâmetro representa o número de desvios padrão que separam as médias dos postos (ranks) dos grupos comparados, em uma distribuição normal padronizada. Valores absolutos de Z superiores a 1,96 indicam diferenças estatisticamente significativas ao

nível de 5% ($p < 0,05$) em testes bicaudais (SIEGEL; CASTELLAN, 1988; FIELD, 2013). A interpretação do sinal é relevante: valores negativos denotam que o primeiro grupo da comparação apresenta postos inferiores, enquanto valores positivos indicam postos superiores.

Todas as análises foram realizadas no software R 4.3.1, utilizando os pacotes stats (Kruskal-Wallis) e dunn.test (teste de Dunn). (Figura 9)

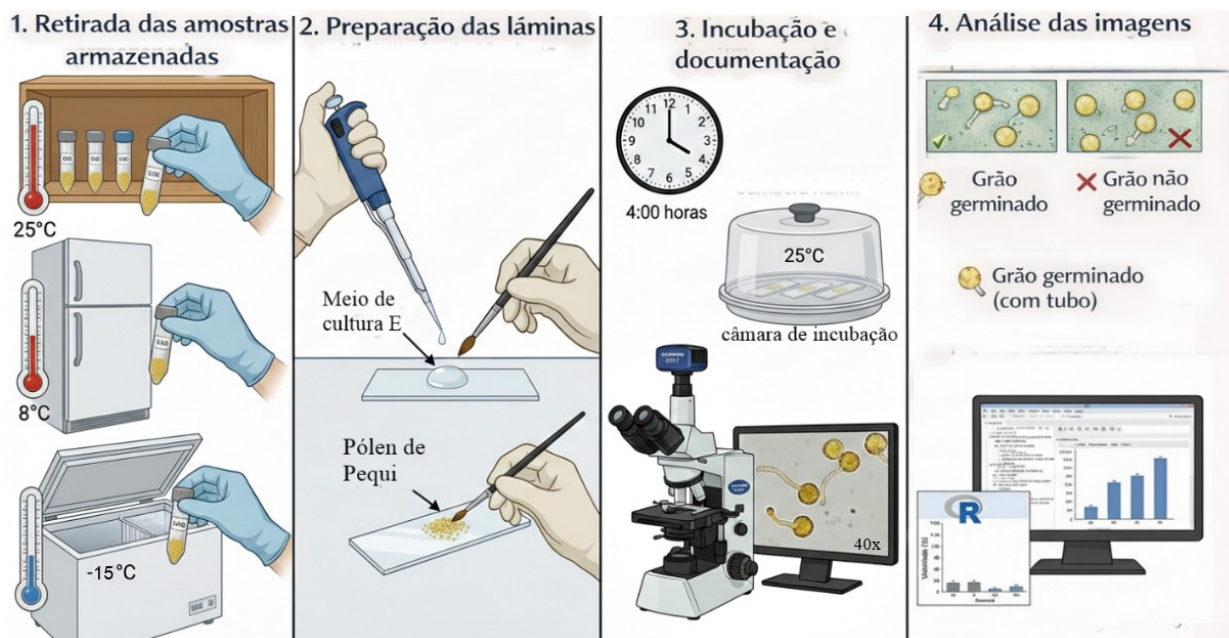


Figura 9: Protocolos de avaliação de viabilidade com diferentes meios de armazenamento com tempo fixo de 4 horas de incubação.

Fonte: Autora (2026).

3.4.2 Classificação da viabilidade do pólen

Para uma análise descritiva complementar, os valores percentuais de germinação *in vitro* foram agrupados em três categorias de viabilidade, conforme classificação utilizada em estudos de conservação de pólen em espécies frutíferas tropicais (ROCHA et al., 2023).

- Alta viabilidade: germinação $\geq 70\%$;
- Média viabilidade: germinação entre 31% e 69%;
- Baixa viabilidade: germinação $< 30\%$.

A categorização visa facilitar a interpretação qualitativa do efeito das condições de armazenamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação dos métodos de extração de pólen

Os três métodos de extração de pólen testados foram avaliados qualitativamente com base nos critérios de quantidade de pólen liberado, pureza da amostra e viabilidade básica (conforme descrito na Seção 3.3).

A extração em flores abertas (métodos a e b) permitiu a obtenção de pólen viável, confirmado por testes de germinação *in vitro* preliminares. No entanto, a quantidade de pólen disponível nas flores coletadas por volta das 9h foi visualmente inferior. O horário de coleta foi definido em função da disponibilidade operacional para a realização das atividades de campo. Essa observação está alinhada com a fenologia reprodutiva da espécie, que possui antese noturna e é polinizada predominantemente por morcegos (GRIBEL; HAY, 1993). Portanto, flores abertas pela manhã já haviam passado pelo pico de liberação de pólen e possivelmente sofrido visitação dos polinizadores, reduzindo a reserva polínica disponível para coleta.

Em contraste, o método de imersão de botões florais fechados destacou-se em eficiência. Este protocolo resultou na liberação de uma quantidade de pólen visivelmente superior. A extração por imersão em água promoveu a antese induzida e a deiscência das anteras em condições controladas, coletando o pólen antes de qualquer perda natural ou interferência de polinizadores, estratégia frequentemente utilizada em estudos de biologia reprodutiva para garantir maior disponibilidade e viabilidade de grãos de pólen (DU et al., 2025; SOUZA et al., 2021). Além da maior quantidade, as amostras obtidas por este método apresentaram menor contaminação por resíduos de tecidos florais. Embora a remoção manual aparente maior volume (Figura 10), trata-se principalmente de anteras intactas; já o pólen puro extraído por imersão facilitou o manuseio e a preparação para as avaliações subsequentes de germinação.

Dessa forma, com base nos critérios observacionais de rendimento e qualidade da amostra, o método de imersão de botões florais fechados foi considerado o mais eficiente para extração de pólen de *C. brasiliense* nas condições deste estudo, sendo adotado para fornecer o material utilizado nas etapas experimentais seguintes.

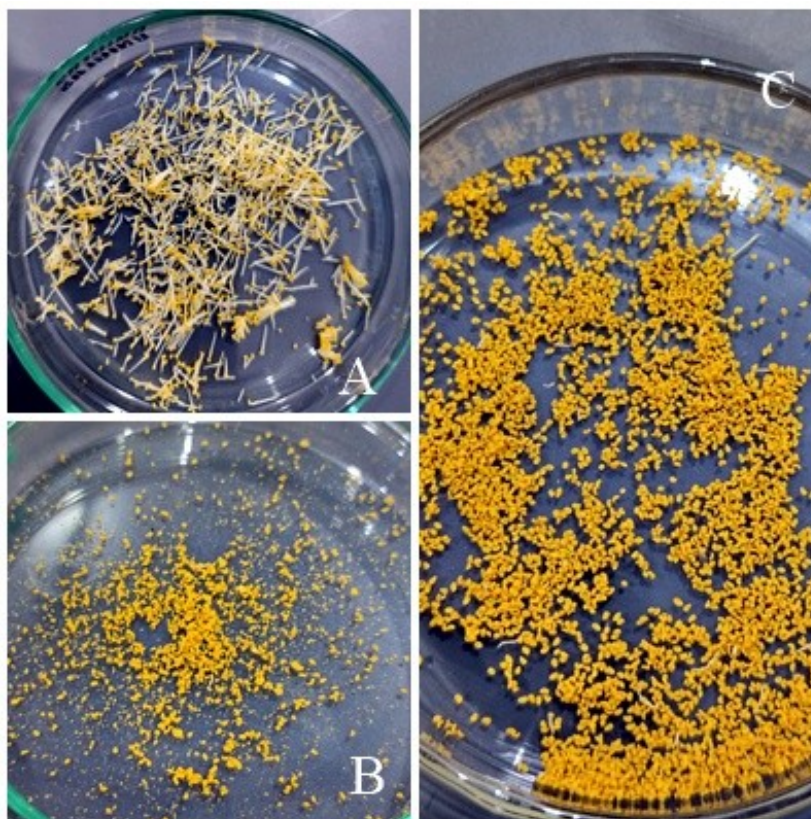


Figura 10 Polén extraído por diversos meios. (A) Anteras removidas com tesoura de precisão; (B) Liberação natural: botões florais fechados imersos em água destilada até a antese; (C) Anteras destacadas manualmente com pinça

Fonte: Autora (2025).

4.2 Germinação *in vitro* em diferentes meios de cultura

A germinação do pólen fresco de pequi variou significativamente entre os meios de cultura (Tabela 2). O meio E (10% sacarose + 1,30 mM ácido bórico) apresentou a maior porcentagem de germinação (67,28 %), formando grupo estatisticamente isolado (a) pelo teste de Tukey. Em ordem decrescente, o meio B (15% sacarose sem boro) obteve 30,46% de germinação (grupo b), seguido pelo meio A (10% sacarose sem boro) com 12,78% (grupo bc). Os menores valores ocorreram nos meios D (10% sacarose + 0,65 mM ácido bórico) com 6,41% e C (20% sacarose sem boro) com 3,35%, ambos no grupo c.

Tabela 2: Germinação *in vitro* de pólen de *Caryocar brasiliense* em diferentes meios de cultura.

Meio	Sacarose (%)	Ácido Bórico (mM)	Germinação Média (%)	Grupo Tukey
E	10	1,3	67,28	a
B	15	0	30,46	b
A	10	0	12,78	bc
D	10	0,65	6,41	c
C	20	0	3,35	c

A superioridade do meio E reforça a importância do ácido bórico na germinação polínica do pequi. O boro atua como micronutriente essencial na formação de ligações cruzadas de pectinas na parede do tubo polínico, contribuindo para a integridade estrutural e alongação celular durante o processo germinativo (KHAN et al., 2021; FRAGALLAH et al., 2019). No entanto, a germinação observada no meio B (15% de sacarose e ausência de boro) demonstra que esse elemento não é absolutamente indispensável para a germinação inicial, uma vez que a sacarose desempenha papel fundamental como fonte de energia e regulador osmótico, permitindo a ativação metabólica dos grãos de pólen (FRAGALLAH et al., 2019; SHI et al., 2023). A maior concentração de sacarose no meio B pode ter compensado parcialmente a ausência de boro, resultando em uma taxa intermediária de germinação. Por outro lado, a presença de boro no meio E (1,30 mM) promoveu incremento expressivo na germinação, indicando sua atuação na organização da parede celular e no transporte de açúcares, fatores essenciais para o crescimento eficiente do tubo polínico (CASTILLO et al., 2022; SHI et al., 2023). Esse padrão tem sido observado em diferentes espécies, nas quais a sacarose sustenta a germinação inicial, enquanto o ácido bórico otimiza o desenvolvimento do tubo polínico e aumenta a eficiência do processo germinativo (FRAGALLAH et al., 2019; CASTILLO et al., 2022).

A concentração de sacarose também influenciou significativamente a germinação. O meio C (20% de sacarose, sem boro) apresentou o menor índice (3,35%), indicando que concentrações elevadas podem inibir o processo. Altos teores de sacarose elevam o potencial osmótico do meio, dificultando a absorção de água pelo grão de pólen e comprometendo a germinação e o crescimento do tubo polínico (DUMONT-BÉBOUX et al., 1999; SHI et al., 2023). A sacarose, embora essencial como fonte de carbono, também atua como regulador osmótico, sendo que concentrações intermediárias favorecem a germinação, enquanto concentrações elevadas podem causar efeitos inibitórios (SHI et al., 2023). Nesse contexto, a concentração de 10% mostrou-se mais adequada para a espécie, proporcionando melhor equilíbrio entre disponibilidade energética e condições osmóticas.

A combinação de 10% de sacarose com 1,30 mM de ácido bórico (meio E) proporcionou condições ótimas para a germinação. Essa sinergia entre fonte de carbono e micronutriente essencial é fundamental para o processo germinativo, uma vez que a sacarose fornece energia e regula o potencial osmótico, enquanto o boro atua diretamente no crescimento do tubo polínico. Esse comportamento é amplamente descrito em estudos de germinação *in vitro* de espécies frutíferas e florestais, nos quais a combinação desses dois componentes promove maior germinação e alongação do tubo polínico (FRAGALLAH et al., 2019; SHI et al., 2023; LI et al., 2023).

4.3 Viabilidade polínica durante o armazenamento

A análise estatística dos dados de viabilidade ao longo dos 131 dias de armazenamento revelou diferenças significativas entre as condições testadas. O teste de Kruskal-Wallis indicou efeito global altamente significativo da condição de armazenamento sobre a viabilidade polínica ($\chi^2 = 51,735$; $p < 0,001$). As comparações múltiplas realizadas pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni evidenciaram padrões distintos entre os tratamentos, estabelecendo um ranking de eficiência liderado pela refrigeração (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação múltipla (teste de Dunn) da viabilidade polínica média de *Caryocar brasiliense* entre diferentes condições de armazenamento ao longo de 131 dias.

Comparação	Valor Z	p-valor ajustado*	Viabilidade Média (%)	Diferença (%)
Freezer (-15°C) vs. Geladeira (8°C)	-1,981	0,14265	26,3 vs. 35,5	-9,2
Freezer (-15°C) vs. Temperatura Ambiente	4,997	$1,74 \times 10^{-6}$	26,3 vs. 8,5	17,8
Geladeira (8°C) vs. Temperatura Ambiente	6,979	$8,93 \times 10^{-12}$	35,5 vs. 8,5	27

*p-valores ajustados pelo método de Bonferroni; diferença significativa quando $p < 0,05$.

As comparações múltiplas realizadas pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni demonstraram que tanto a geladeira (8 °C) quanto o freezer (-15 °C) apresentaram viabilidade significativamente superior à temperatura ambiente ($p < 0,05$). A geladeira apresentou viabilidade média de 35,5%, sendo aproximadamente 27,0% superior à temperatura ambiente (8,5%), enquanto o freezer apresentou média de 26,3%, com diferença de 17,8% em relação ao ambiente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre geladeira e freezer

($p = 0,14265$), embora a geladeira tenha apresentado maior valor médio, configurando-se como mais indicada para conservação.

A dinâmica da viabilidade polínica ao longo do tempo pode ser visualizada na Figura 11, na qual se observam padrões distintos entre as condições de armazenamento. A temperatura ambiente apresentou rápida redução da viabilidade, com queda acentuada ao longo dos dias, atingindo valores próximos de zero em períodos mais avançados. Em contraste, a geladeira (8 °C) manteve valores mais elevados e relativamente estáveis durante todo o período experimental, evidenciando maior conservação do potencial germinativo. O freezer (-15 °C), por sua vez, apresentou comportamento intermediário, com oscilações ao longo do tempo e tendência de redução da viabilidade.

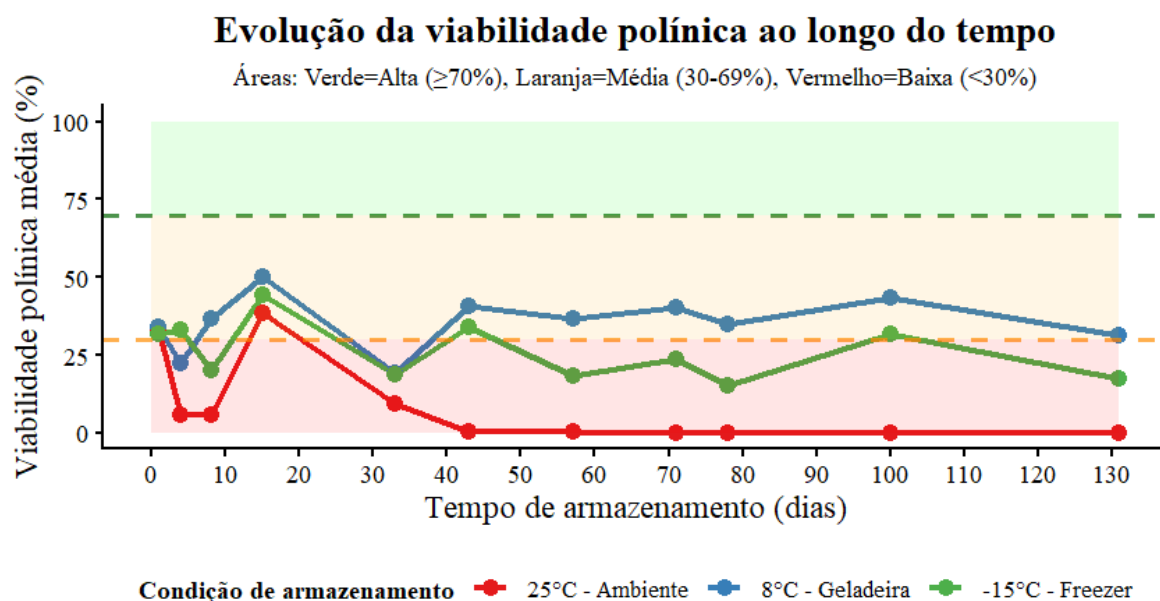


Figura 11 Viabilidade polínica (germinação *in vitro* em %) de *Caryocar brasiliense* armazenado em três condições (Temperatura Ambiente ~25 °C, Geladeira ~8 °C e Freezer ~-15 °C) ao longo de 131 dias. Pontos representam a média $\pm$ erro padrão. Linhas conectam as médias:

Fonte: Autora (2026).

A análise das diferenças entre as condições em cada tempo de avaliação demonstrou que o efeito do armazenamento não foi constante ao longo do período experimental. Nos tempos iniciais (1, 15 e 33 dias), não foram observadas diferenças significativas entre as condições ($p \geq 0,05$), indicando comportamento semelhante da viabilidade polínica nesse período. Em contrapartida, diferenças significativas foram detectadas nos tempos 4, 8, 43, 57, 71, 78, 100 e 131 dias ($p < 0,05$), evidenciando que o efeito das condições de armazenamento se torna mais

pronunciado com o avanço do tempo. Os valores de p obtidos para cada tempo de avaliação, a partir do teste de Kruskal-Wallis, estão apresentados na Tabela 4, na qual é possível observar a distribuição das diferenças estatísticas entre as condições ao longo do período experimental.

Tabela 4: Resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação da viabilidade polínica entre condições de armazenamento em cada tempo de avaliação. * Significativo $p < 5\%$ de significância, NS Não significativo $p \geq 5\%$ de significância.

Tempo (dias)	p-valor
1	0,9668 ^{NS}
4	0,0244*
8	0,0488*
15	0,5836 ^{NS}
33	0,4724 ^{NS}
43	0,0241*
57	0,0234*
71	0,009*
78	0,0106*
100	0,0201*
131	0,0182*

As oscilações observadas na viabilidade polínica ao longo do tempo podem estar associadas à variabilidade amostral e a fatores experimentais, como condições ambientais no momento das avaliações. Os elevados coeficientes de variação observados em determinados períodos reforçam essa interpretação. No entanto, a análise de regressão evidenciou uma tendência geral de declínio da viabilidade, indicando que tais oscilações não representam aumento real da viabilidade polínica, mas sim variação inerente ao processo experimental.

As comparações múltiplas realizadas para cada tempo de avaliação indicaram que, embora a temperatura ambiente tenha apresentado valores inferiores de viabilidade, as diferenças mais relevantes para a interpretação do armazenamento concentram-se na comparação entre as condições refrigeradas.

De modo geral, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre geladeira (8 °C) e freezer (-15 °C) em nenhum dos tempos avaliados ($p \geq 0,05$) demonstrados na tabela 5, indicando desempenho semelhante entre essas duas condições ao longo de todo o período experimental. Esse resultado sugere que ambas as estratégias de armazenamento são eficazes na manutenção da viabilidade polínica, sem evidência estatística de superioridade consistente de uma em relação à outra.

Tabela 5: Comparação da viabilidade polínica entre geladeira (8 °C) e freezer (-15 °C) ao longo dos tempos de avaliação, com base no teste de Dunn (p-ajustado de Bonferroni). ^{NS} Não significativo a $p \geq 0,05$ de significância.

Tempo (dias)	Z	p-ajustado
4	0,196	1,0000 ^{NS}
8	-1,079	0,8420 ^{NS}
43	-0,196	1,0000 ^{NS}
57	-0,692	1,0000 ^{NS}
71	-1,223	0,6640 ^{NS}
78	-1,198	0,6930 ^{NS}
100	-0,399	1,0000 ^{NS}
131	-0,599	1,0000 ^{NS}

Apesar da ausência de diferenças significativas, observa-se, de forma descritiva, que a geladeira apresentou valores médios ligeiramente superiores ao freezer em diversos períodos, especialmente a partir de 43 dias, indicando tendência de maior estabilidade da viabilidade ao longo do tempo.

A tendência temporal da viabilidade polínica sob diferentes condições de armazenamento foi avaliada por meio de regressão linear, permitindo identificar o padrão geral de variação ao longo do período experimental (Figura 12).

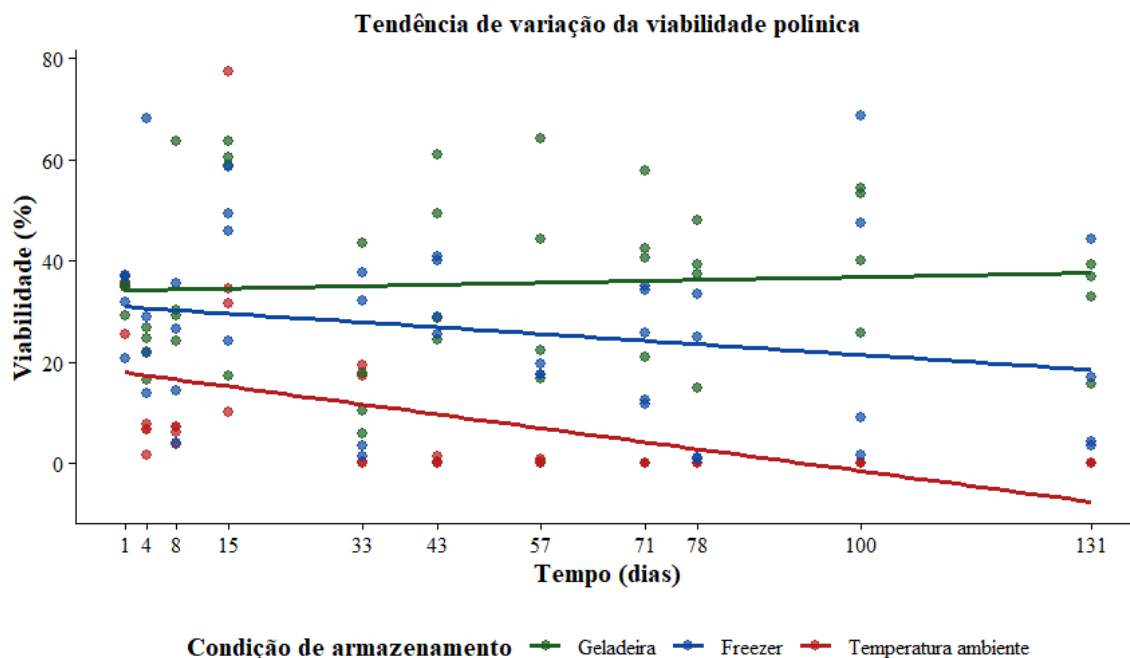


Figura 12: Tendência de variação da viabilidade polínica (%) de *Caryocar brasiliense* ao longo de 131 dias sob diferentes condições de armazenamento. As linhas representam o ajuste de regressão linear para cada condição.

Fonte: Autora (2026).

A análise de regressão evidenciou padrões distintos entre as condições de armazenamento. A temperatura ambiente apresentou tendência significativa de declínio da viabilidade polínica ao longo do tempo ($p < 0,001$), com taxa média de redução de 0,197% ao dia, caracterizando rápida deterioração do material.

O freezer (-15 °C) apresentou tendência de declínio de menor magnitude (-0,096% ao dia), porém sem significância estatística ($p = 0,142$), indicando comportamento intermediário e maior estabilidade em comparação à temperatura ambiente.

Já a geladeira (8 °C) apresentou coeficiente angular positivo (0,026% ao dia), sem significância estatística ($p = 0,660$), indicando ausência de tendência linear ao longo do tempo. Considerando que biologicamente a viabilidade polínica não apresenta aumento durante o armazenamento, esse resultado é atribuído à variabilidade experimental dos dados, sendo interpretado como manutenção da viabilidade ao longo do período avaliado.

De forma geral, os resultados da regressão corroboram as análises anteriores, evidenciando que a temperatura ambiente promove declínio acentuado da viabilidade polínica, enquanto as condições refrigeradas apresentam maior estabilidade ao longo do tempo. Esse

comportamento reforça a eficiência da redução da temperatura como estratégia para retardar a deterioração do pólen.

Imagens representativas ilustram qualitativamente os padrões médios de germinação observados. Na amostra refrigerada a 8 °C (Figura 12), a densidade de grãos germinados e o alongamento dos tubos polínicos correspondem aos valores médios de viabilidade mantidos nesta condição. O congelamento a -15 °C (Figura 13) apresenta germinação menos abundante, refletindo a capacidade germinativa reduzida característica desta condição. A temperatura ambiente a 25 °C (Figura 14) mostra o padrão típico de deterioração, consistente com a perda de funcionalidade observada quantitativamente após 131 dias.

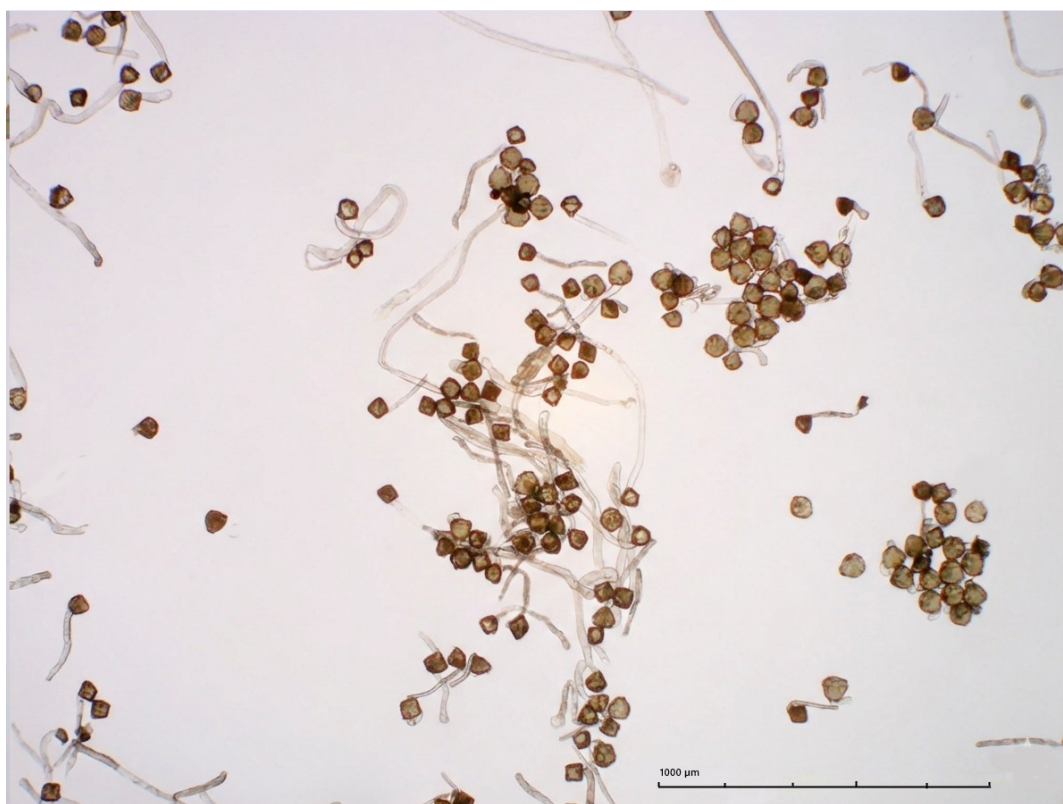


Figura 13 Representação micrográfica (40X) da germinação *in vitro* de pólen de *Caryocar brasiliense* armazenado em Geladeira (8°C), após 131 dias de armazenamento.

Fonte: Autora (2026).

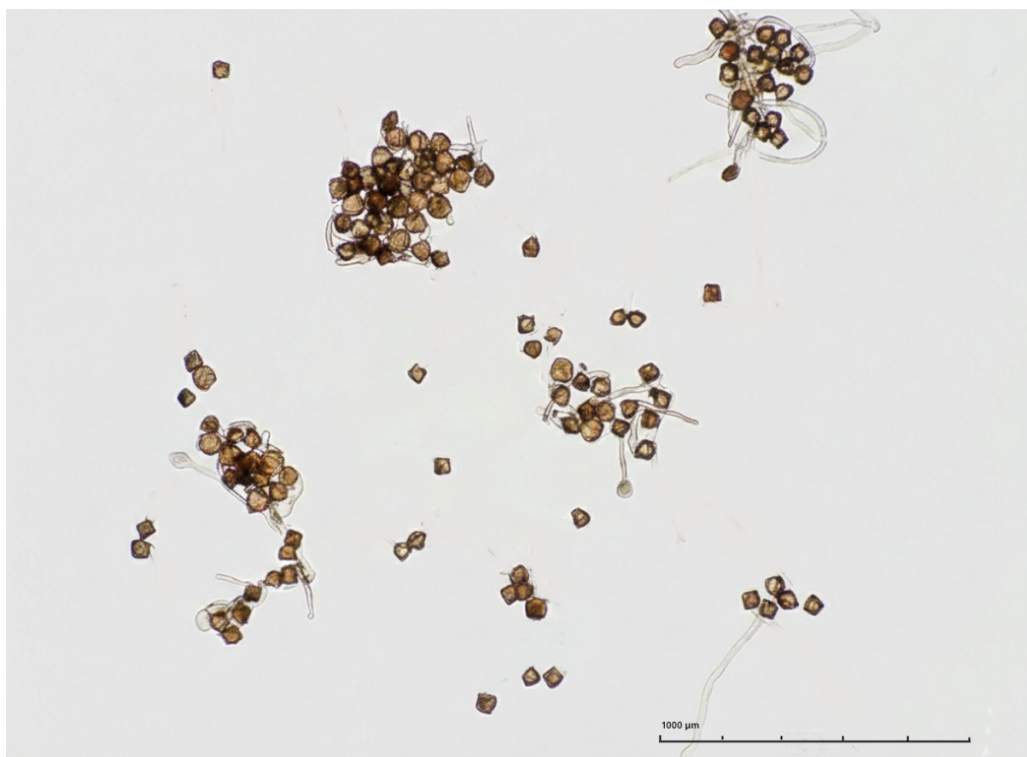


Figura 14 Representação micrográfica (40X) da germinação *in vitro* de pólen de *Caryocar brasiliense* armazenado em Freezer (-15 °C), após 131 dias de armazenamento.

Fonte: Autora (2026).

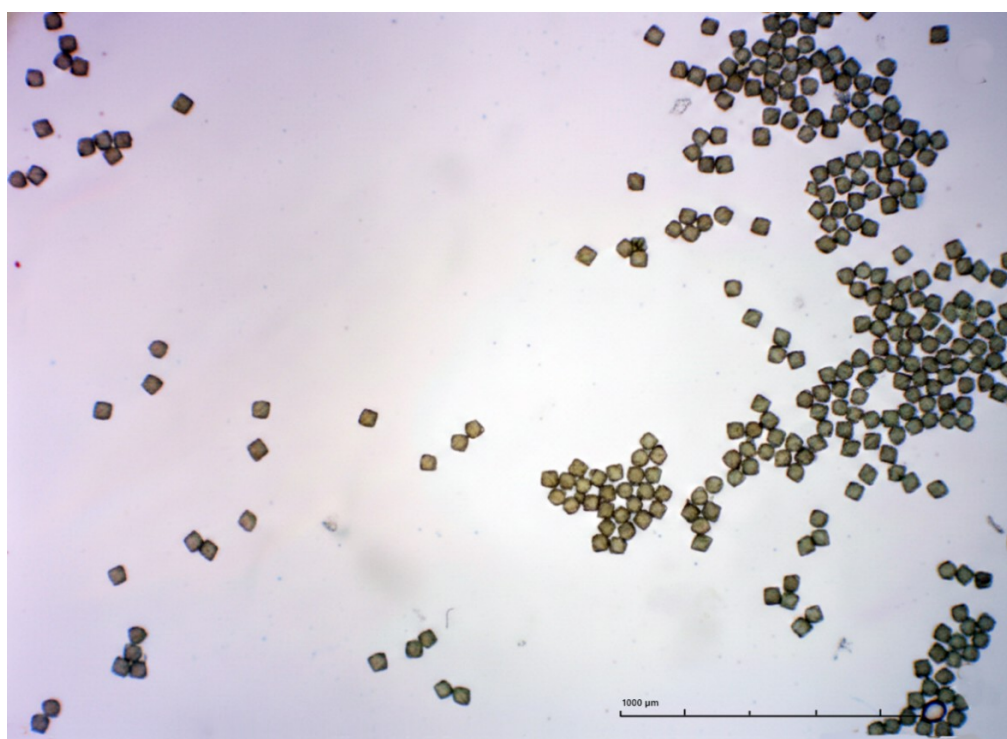


Figura 15 Representação micrográfica (40X) da germinação *in vitro* de pólen de *Caryocar brasiliense* armazenado em Temperatura ambiente (~25 °C) após 131 dias de armazenamento.

Fonte: Autora (2026)

A seleção de imagens com contagens próximas às médias observadas permite visualização dos padrões morfológicos característicos de cada condição de armazenamento, validando qualitativamente as diferenças quantitativas. Esta correspondência entre aparência microscópica e desempenho germinativo reforça a confiabilidade dos protocolos de avaliação estabelecidos.

5 CONCLUSÕES

Com base na análise integrada dos resultados obtidos ao longo de 131 dias de experimentação, confirma-se a eficiência dos protocolos estabelecidos para o manejo do pólen de *Caryocar brasiliense*, atendendo aos objetivos propostos de otimização da extração, avaliação e conservação do germoplasma.

A técnica de extração por imersão de botões florais fechados demonstrou maior eficiência operacional, proporcionando maior rendimento e pureza das amostras. Essa metodologia apresenta vantagem estratégica ao permitir a coleta do pólen antes da antese natural e da atuação de polinizadores, superando limitações associadas à fenologia reprodutiva da espécie.

Na avaliação do potencial germinativo, o meio de cultura contendo 10% de sacarose e 1,3 mM de ácido bórico (Meio E) apresentou o melhor desempenho, com germinação média de 67,28%. Esse resultado evidencia a importância da interação entre fonte de carbono e micronutrientes na germinação polínica, destacando o papel do ácido bórico no crescimento do tubo polínico e na eficiência do processo germinativo.

Em relação ao armazenamento, observou-se que a redução da temperatura contribuiu significativamente para a manutenção da viabilidade polínica ao longo do tempo. A temperatura ambiente apresentou rápido declínio da viabilidade, enquanto as condições refrigeradas promoveram maior estabilidade dos grãos de pólen durante o período experimental.

A análise estatística indicou superioridade das condições refrigeradas em relação à temperatura ambiente ($p < 0,001$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre geladeira (8 °C) e freezer (-15 °C) ($p \geq 0,05$), indicando equivalência entre essas condições. Ainda assim, a geladeira apresentou, de forma descritiva, maior estabilidade e valores médios ligeiramente superiores ao longo do tempo, além de representar uma alternativa mais simples e acessível para aplicação prática.

A análise de regressão corroborou esses resultados, evidenciando declínio significativo da viabilidade em temperatura ambiente, enquanto as condições refrigeradas apresentaram

ausência de tendência acentuada de redução, caracterizando maior estabilidade ao longo do período avaliado.

Dessa forma, os protocolos definidos neste estudo — extração por imersão de botões florais, germinação em meio contendo 10% de sacarose e 1,3 mM de ácido bórico e armazenamento sob refrigeração — constituem uma abordagem eficiente, de baixo custo e aplicabilidade prática. Esses resultados contribuem para o avanço do conhecimento sobre a biologia reprodutiva de *Caryocar brasiliense* e fornecem subsídios técnicos para programas de melhoramento genético, conservação e uso sustentável de espécies nativas do Cerrado.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M. S. et al. *Caryocar brasiliense* Cambess. In: VIEIRA, R. F. et al. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial. Brasília: Embrapa, 2011.

AHRENS, W. H.; COX, D. J.; BUDHWAR, G. Use of the arcsine and square root transformations for subjectively determined percentage data. **Weed Science**, v. 38, n. 4-5, p. 452–458, 1990.

Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0043174500056824>

Acesso em: 15 abr. 2026.

ABDUL-BAKI, A. A. Determination of pollen viability in tomatoes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, n. 3, p. 473–476, 1992.

Disponível em: <https://doi.org/10.21273/JASHS.117.3.473>

Acesso em: 15 abr. 2026.

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2015.

AMARAL, T. S. et al. Agricultural landscape heterogeneity matter. **Frontiers in Genetics**, v. 11, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.606222>

Acesso em: 15 abr. 2026.

BARNABÁS, B.; KOVÁCS, G. Storage of pollen. In: SHIVANNA, K. R.; SAWHNEY, V. K. (ed.). **Pollen biotechnology for plant abundance and crop improvement**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525469.016>

Acesso em: 15 abr. 2026.

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 2008.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352680802202034>

Acesso em: 15 abr. 2026.

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

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1963.tb06564.x>

Acesso em: 15 abr. 2026.

CASTILLO, S. E. et al. A protocol for *Chenopodium quinoa* pollen germination. **Plant Methods**, v. 18, 2022.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00859-9>

Acesso em: 15 abr. 2026.

ĆALIĆ, D. et al. Impact of storage temperature on pollen viability. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.709231>

Acesso em: 15 abr. 2026.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite analysis. **Heredity**, v. 86, p. 60–67, 2001a.

Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00801.x>

Acesso em: 15 abr. 2026.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. V. Population genetic structure. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349–356, 2001b.

Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01226.x>

Acesso em: 15 abr. 2026.

COLLEVATTI, R. G.; HAY, J. D. Kin structure. **Journal of Ecology**, v. 99, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01796.x>

Acesso em: 15 abr. 2026.

DIAS, A. T. C. et al. Pollination biology. **Acta Botanica Brasilica**, v. 31, n. 4, p. 600–608, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0001>

Acesso em: 15 abr. 2026.

DU, K. et al. Ultra-low temperature storage on pollen viability. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, 2025.

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1516016>

Acesso em: 15 abr. 2026.

DUMONT-BÉBOUX, N. et al. *In vitro* Douglas fir pollen germination. **Annales des Sciences Forestières**, v. 56, n. 1, p. 11–18, 1999.

Disponível em: <https://doi.org/10.1051/forest:19990102>

Acesso em: 15 abr. 2026.

FIELD, A. **Discovering statistics using IBM SPSS statistics**. 4. ed. London: Sage, 2013.

FORZZA, R. C. et al. Brazilian Flora 2020. **Taxon**, v. 71, n. 1, p. 178–198, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tax.12640>

Acesso em: 15 abr. 2026.

FRAGALLAH, S. A. D. A. et al. Effects of sucrose and boric acid. **Forests**, v. 10, n. 2, p. 102, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/f10020102>

Acesso em: 15 abr. 2026.

FRANCHI, G. G. et al. Pollen desiccation tolerance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 291, p. 1–15, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0365-0>

Acesso em: 15 abr. 2026.

GRIBEL, R.; HAY, J. D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense*. **Journal of Tropical Ecology**, v. 9, n. 2, p. 199–211, 1993.

Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0266467400007173>

Acesso em: 15 abr. 2026.

GUOLLO, K. et al. Pollen storage in forest species. **Forest Ecology and Management**, v. 482, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118875>

Acesso em: 15 abr. 2026.

HINE-GÓMEZ, A. et al. Pollen collection and drying methods. **Agronomy**, v. 9, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy9070378>

Acesso em: 15 abr. 2026.

IMPÉ, D. et al. Pollen viability using FDA. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.615922>

Acesso em: 15 abr. 2026.

KHAN, A. S. et al. Role of boron in plant reproduction. **Journal of Plant Nutrition**, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1918159>

Acesso em: 15 abr. 2026.

LI, J. et al. Boron and sucrose effects. **Plants**, v. 12, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12030567>

Acesso em: 15 abr. 2026.

LIU, Y. et al. Pollen extraction in woody species. **Plants**, v. 12, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12071456>

Acesso em: 15 abr. 2026.

MELO, C. Diurnal bird visiting. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 2, p. 311–316, 2001.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-71082001000200014>

Acesso em: 15 abr. 2026.

NAGAR, A. et al. Cryopreservation protocol. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1268726>

Acesso em: 15 abr. 2026.

NOVAES, P. et al. Ecological phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9315-3>

Acesso em: 15 abr. 2026.

PEREZ, K. Learning by doing: pollen viability. **HortTechnology**, v. 27, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.21273/horttech03351-17>

Acesso em: 15 abr. 2026.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: FEALQ, 2009.

RIBEIRO, J. F. et al. **Morfologia e ecologia de árvores do Cerrado**. Planaltina: Embrapa, 2023.

ROCHA, L. B. et al. Conservação de pólen. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 21, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.55905/oelv21n10-087>

Acesso em: 15 abr. 2026.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology: a laboratory manual**. Berlin: Springer, 1992.

SHI, R. et al. Influence of sucrose and boric acid. **Legume Research**, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.18805/lrf-749>

Acesso em: 15 abr. 2026.

SIEGEL, S.; CASTELLAN, N. J. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1988.

SOUZA, C. A. et al. *In vitro* pollination in *Coffea canephora*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1984-70332021v21n4a51>

Acesso em: 15 abr. 2026.

TRAN, T. T. et al. Pollen storage and longevity. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781381>

Acesso em: 15 abr. 2026.

VIEIRA, R. F. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2021.

WARTON, D. I.; HUI, F. K. C. The arcsine is asinine. **Ecology**, v. 92, n. 1, p. 3–10, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1890/10-0340.1>

Acesso em: 15 abr. 2026.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2010.