



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

EFICIÊNCIA DO SISTEMA REPRODUTIVO DE BANANEIRA

TALIANE LEILA SOARES

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO – 2011**

EFICIÊNCIA DO SISTEMA REPRODUTIVO DE BANANEIRA

TALIANE LEILA SOARES

Engenheira Agrônoma
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2003

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Co-Orientadora: Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Co-Orientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2011

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - UFRB
(Orientadora)

Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - UFRB

Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dr. Edson Perito Amorim
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dr. Onildo Nunes de Jesus
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Tese homologada pelo Colegiado de Curso de Doutorado em Ciências Agrárias
em

Conferindo o Grau de Doutor em Ciências Agrárias em

FICHA CATALOGRÁFICA

P Soares, Taliane Leila.

Eficiência do sistema reprodutivo de bananeira/Taliane Leila Soares. -
Cruz das Almas, Ba, 2011.

101f.:il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Co-Orientadores: Janay Almeida dos Santos-Serejo

Sebastião de Oliveira e Silva

Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas,
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

1. Banana – sistema reprodutivo. 2. Banana – melhoramento genético. 3.
Germinação de pólen *in vitro*. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro
de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

Ofereço este trabalho ao meu avô Marcelino (in memoriam), que sempre incentivou os meus estudos e à minha querida avó Zinha, por estar sempre presente em minha vida, mesmo não estando mais neste plano.

OFEREÇO

Dedico este trabalho aos meus pais: Geraldo e Lourdes, que sempre demonstraram o exercício do amor e da dedicação, além de me auxiliarem durante toda a minha vida, servindo de exemplo de conduta moral e profissional. E como não poderia deixar de ser, dedico este trabalho também ao meu namorado Flávio, pelo apoio incondicional, pelo amor, incentivo, compreensão e paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa muito mais que uma tese, representa o término de uma fase de dedicação, perseverança e muitos estudos. Porém, não esqueço que também é o início de outra fase, de dedicação, perseverança e mais estudos... Eu mesmo perdi as contas de quantas vezes achei que não conseguiria. No entanto, de uma coisa eu tenho certeza: eu não teria conseguido sozinha. Assim, gostaria de fazer alguns agradecimentos.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, não somente por esta obra, mas também pelas graças de haver conseguido terminar mais uma etapa da minha vida acadêmica. Obrigada, Senhor, pelas pessoas que colocou no meu caminho, pela possibilidade de realizar um trabalho tão edificante e satisfatório, e por me auxiliar nos momentos de dificuldade e aflição.

À minha família, minha base, meu lar, por me incentivarem e vibrarem por cada conquista. Pelo amor dedicado a mim e por acreditar que eu pudesse conseguir realizar meu sonho e alcançar meus objetivos. A você pai, que sempre sonhou em ver seus filhos formados e batalhou muito para isso acontecer, considere-se um homem realizado e meu herói.

Gostaria de agradecer aos meus “quatro orientadores”.

À Professora Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa meu agradecimento especial, por ter assumido a minha orientação do mestrado ao doutorado, pelos ensinamentos, amizade e apoio em todos os momentos deste curso, por permitir que desenvolvesse meu projeto de tese de forma livre, sem ter que seguir rigorosamente um plano prévio, sendo uma pessoa bastante solidária e prestativa. Agradeço por sua generosidade constante, por dividir suas experiências de vida, pelas conversas de incentivo à pesquisa, pelos momentos de descontração em nossas viagens a Piracicaba, tornando o trabalho bem mais leve e prazeroso. Muito obrigada por me apoiar em todas as etapas desta tese

Ao Dr. Antonio da Silva Souza pela oportunidade que me ofereceu em trabalhar com a Cultura de Tecidos Vegetais durante a minha graduação, por confiar a mim um trabalho tão fascinante que até hoje rende bons frutos. Obrigada pela confiança, amizade e pelo suporte científico. Obrigada por me ensinar que o mais importante é procurar perguntas, e não respostas! Enfim, Dr. Antônio, já

disse isso diversas vezes para muitas pessoas, mas vale deixar documentado a minha admiração e respeito pelo profissional e ser humano que o senhor é.

À Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo, meus sinceros agradecimentos. Ao longo desses 11 anos conduzindo trabalhos de pesquisa na Embrapa Mandioca e Fruticultura, sendo 9 anos sob sua supervisão, aprendi com você, ou por conta sua, muito do que hoje sei. Sinto que tenho um débito imenso: pelo seu apoio constante e palavra acalentadora a cada momento que precisei, pelo acompanhamento deste trabalho, desde seu início, idealização e delineamento, até a sua finalização, participando efetivamente de todas as etapas e decisões, dividindo as pequenas vitórias e enfrentando os problemas. Obrigada pela orientação, dedicação, confiança, amizade, pela maneira carinhosa e afetiva com que resolve os problemas e pelo entusiasmo contagiante em trabalhar. Enfim, você foi uma pessoa imprescindível na minha formação.

Ao Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, meu co-orientador, pela colaboração, sugestões e auxílio financeiro na realização da pesquisa. Graças a ele, conheci alguns lugares do Brasil, aprendi a ser mais crítica, objetiva, a expressar as minhas idéias e a ter mais confiança na minha capacidade.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela valiosa oportunidade de realizar este trabalho de tese, pela concessão dos materiais avaliados nesse estudo e pela viabilização nas diferentes etapas do experimento. Aos colegas que estão ou que passaram no Laboratório de Cultura de Tecidos e que tornaram os dias mais divertidos, principalmente a Juraci, Tânia, Nina, Honorato, Rafael, Helder, Ádila, Sandra, Kelly e Mariane, pelo excelente convívio durante esses anos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade de realizar este curso de doutorado. Aos colegas de curso de pós-graduação em especial à Jurema e Moema pela solidariedade e colaboração no decorrer da execução deste trabalho e por representar o espírito de coleguismo dos colegas da Pós-graduação.

Aos meus amigos de ontem, hoje e sempre, Onildo de Jesus, Ricardo Lopes, Everton Hilo de Souza, Silvia Barbosa, Juliana Alves, Joseane Silva, Lília Delfino, Ana Paula Sampaio. Vocês são muito especiais em todos os momentos. Agradeço pelas intermináveis conversas, às trocas de idéias, as múltiplas ajudas, enfim à amizade dedicada.

À Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza pelos aconselhamentos, apoio, amizade e motivação dispensada em outros trabalhos de pesquisa sob sua orientação.

À Dra. Adriana Martinelli Pinheiro pelo carinho e atenção com que fui recebida no Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) durante a vigência do meu Procad/CAPES.

A Mônica Lanzoni Rossi, técnica do laboratório de Histopatologia do CENA pela amizade, carinho, e por me ensinar as técnicas de microscopia de varredura e de transmissão e pelo auxílio nas fotomicrografias dos grãos de pólen em diversas espécies de plantas (banana, mandioca, helicônia). Enfim, a todos os colegas desse laboratório e em especial o meu “quebra-galho” Everton Hilo meu irmão adotivo por quem tenho um carinho muito grande.

Não posso deixar de agradecer também a Banca Examinadora desta tese, pelas críticas e sugestões que colaboraram para enriquecer este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, pela concessão da bolsa de doutoramento.

A meu namorado Flávio Muniz, pelo seu companheirismo, paciência, amor, dedicação e por estar comigo em todas as fases da minha vida acadêmica, incentivando os meus estudos. Obrigada por conseguir me fazer ver que a vida é mais que uma tese ou um trabalho e por tornar a minha muito melhor.

A todos os funcionários, em especial a Raimundo de Santana (Bizunga) e Sinésio e aos pesquisadores da Embrapa, os quais certamente foram contagiantes em um ambiente de agradável convívio e ou progresso profissional e pessoal.

Enfim, a todos, que direta ou indiretamente, colaboraram e incentivaram para a realização do presente trabalho.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1	
INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DA COLETA SOBRE A VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DE BANANEIRA	26
Capítulo 2	
FERTILIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> EM <i>Musa</i> spp.	44
Capítulo 3	
INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE TECIDOS FLORAIS NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CRESCIMENTO DO PÓLEN DE BANANEIRA	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

EFICIÊNCIA DO SISTEMA REPRODUTIVO DE BANANEIRA

Autora: Taliane Leila Soares

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO: O melhoramento genético da bananeira por hibridação é limitado pela ocorrência de esterilidade na maioria das cultivares, resultando em baixa produção ou mesmo ausência de sementes. Existem poucos estudos sobre as causas da esterilidade em bananeira, o que tem dificultado o entendimento dos possíveis processos envolvidos e a definição de estratégias para superar esta barreira. O presente estudo busca elucidar diferentes aspectos que envolvem o sistema reprodutivo em bananeira, visando contribuir para o avanço do programa de melhoramento da cultura. O trabalho permitiu estimar o efeito do horário de coleta sobre a viabilidade dos grãos de pólen de seis híbridos diploides melhorados de bananeira (*Musa acuminata*, AA), investigar a fertilização *in vivo* e avaliar a influência do extrato de tecidos florais na germinação *in vitro* de pólen. Nas coletas realizadas na antese, às 8h, obteve-se maior percentagem de germinação e viabilidade dos grãos de pólen sendo, portanto, o horário mais indicado para a realização de polinização. Foram feitas polinizações diárias em diploides melhorados (AA) e triploides dos subgrupos Cavendish (AAA) e Prata (AAB), comparando-se o desenvolvimento dos óvulos fertilizados. Verificou-se que os óvulos de diploides aumentaram de tamanho gradualmente, iniciando o processo de formação de sementes. Por outro lado, nos triploides AAA ocorre o aborto dos óvulos não fertilizados e conseqüente redução no seu tamanho. Nos triploides AAB alguns óvulos são fertilizados, mas o seu tamanho é menor comparado aos diploides. A performance do pólen diferiu em relação às diferentes concentrações dos extratos do estigma e da porção distal do ovário adicionados ao meio de cultura, tanto para a germinação *in vitro* como para o crescimento do tubo polínico.

Palavras-chaves: *Musa* spp.; esterilidade; hibridação; melhoramento genético.

EFFICIENCY IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF BANANA

Author: Taliane Leila Soares

Adviser: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

ABSTRACT: The genetic breeding of banana through hybridization is limited by the occurrence of sterility in most cultivars, resulting in low production or absence of seeds. There are few studies about sterility in banana which have been difficult the understanding of the involved processes and the probable strategies to overcome this barrier. The aim of this study was to elucidate the different aspects in the reproductive system of banana in order to contribute with the banana breeding program. The results showed the effect of collection time on the pollen viability of different diploid banana (*Musa acuminata*, AA), some aspects of *in vivo* fertilization and the influence of floral extracts on the pollen germination. The best result was obtained at time to anthesis, at 8 a.m. when the highest pollen germination and 8 a.m., highest pollen viability was observed. Pollinations were made daily in diploids (AA) and triploids (AAA and AAB) comparing the development of fertilized ovules. It was observed that the ovules from diploids plants increased in size gradually, starting seed formation process. On the other hand, in triploid AAA occurs the abortion of unfertilized ovules and consequent reduction in its size. In triploid AAB some ovules are fertilized, but their size is smaller compared to diploids. The performance of pollen differed in relation to different concentrations of the extracts of stigma and distal portion of the ovary added to the culture medium, both for *in vitro* germination and growth of the pollen tube.

Key words: *Musa* spp.; sterility; hybridization; genetic breeding.

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma das principais frutas consumidas mundialmente devido ao seu valor nutricional, sendo cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. O Brasil é o quinto produtor de banana, sendo responsável por 7,8% da produção mundial, que corresponde a 7,2 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 512,6 mil hectares (FAO, 2011). A maioria das cultivares de *Musa* spp. é triplóide ($2n = 3x = 33$ cromossomos), e apresenta diferentes graus de esterilidade, o que dificulta o melhoramento genético por métodos convencionais.

As cultivares que apresentam em sua constituição a combinação dos genomas A e B (AAB, ABB) constituem a maioria das bananas produzidas mundialmente, embora o comércio internacional esteja centrado nas cultivares do subgrupo Cavendish (AAA), por causa da palatabilidade e qualidade dos frutos, bem como pelo alto rendimento (FORTESCUE e TURNER, 2005a). Entretanto, estas cultivares são suscetíveis a doenças foliares e pragas que causam sérias perdas de rendimento (SSEBULIBA et al., 2006), sendo necessário o melhoramento genético para a geração de novas variedades resistentes e aceitas pelo mercado.

Para a obtenção dessas novas variedades, é muito importante a exploração da variabilidade genética encontrada entre as diversas formas selvagens e cultivadas da espécie *Musa acuminata* (grupo AA), que são usadas como genitores masculinos e como fonte de resistência a doenças como o mal-do-Panamá e as Sigatokas amarela e negra, mantendo ainda, outras características desejáveis (SILVA et al., 1999a).

O programa de melhoramento genético de bananeira, iniciado na Embrapa Mandioca e Fruticultura em 1983, baseia-se principalmente no melhoramento de diploides (AA), e posterior cruzamento destes com triploides AAB dos tipos Prata e Maçã, gerando híbridos tetraplóides AAAB. Tem como objetivo desenvolver variedades resistentes a pragas e nematóides, produtivas, com porte e ciclo da cultura reduzidos, mantendo o sabor Prata e Maçã dos frutos (SILVA et al., 2001).

O melhoramento por hibridações tem obtido sucesso para algumas cultivares, como as dos tipos Prata e Maçã, embora a quantidade de sementes

produzidas seja bastante reduzida. As cultivares pertencentes ao subgrupo Cavendish (AAA), que são as de maior interesse no mercado internacional, apresentam alto grau de esterilidade, o que dificulta a transferência de características de interesse dos diploides para estes triploides mediante hibridações. Isto tem gerado uma expectativa negativa com relação ao futuro da bananicultura, uma vez que a produção comercial de banana baseia-se principalmente em cultivares que são suscetíveis a sigatoka negra e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça Tropical 4 (Foc TR4). Portanto, torna-se de grande importância o desenvolvimento de metodologias alternativas para a obtenção de híbridos com características desejáveis.

Além das técnicas de cultura de tecidos de uso rotineiro em apoio ao melhoramento, como a cultura de embriões e a micropropagação, diferentes estratégias têm sido utilizadas visando superar as dificuldades do melhoramento convencional e acelerar a obtenção de novas variedades resistente entre as quais: o uso de mutagênese *in vitro* (DOMINGUES et al., 1994; TULMANN NETO et al., 1995; GARCIA et al., 2002); a transformação genética (SOEJIMA et al., 2000; MATSUMOTO et al., 2002; BRITO, 2010); a hibridação somática (MATSUMOTO, 2001); a duplicação de cromossomos (HAMILL et al., 1992; VAN DUREN et al., 2002; GANGA e CHEZHIYAN, 2002; COSTA et al., 2009) e a fertilização *in vitro* (SOARES et al., 2004). Técnicas de biologia molecular também têm sido utilizadas como ferramenta auxiliar na caracterização dos genótipos e identificação de genes de resistência a doenças (CRESTE et al., 2003).

Embora sejam relatados na literatura vários fatores que podem ser responsáveis pela ausência ou baixa produção de sementes em cultivares de bananeira, existem poucos estudos sobre as causas da esterilidade, o que tem dificultado o entendimento dos possíveis processos envolvidos e a definição de estratégias para superar essas barreiras.

Shepherd et al. (1986) atribuíram o número reduzido de sementes como consequência de: a) crescimento irregular e retardado do tubo polínico; b) baixa taxa de crescimento do pólen de alguns genótipos; c) tubos polínicos curtos, que não alcançam o óvulo; d) ocorrência de sementes apenas nas primeiras pencas e na porção distal dos frutos de algumas cultivares e e) necrosamento prematuro na região do nectário da flor feminina, impedindo a passagem do tubo polínico.

Outros autores afirmam que a ocorrência de translocação cromossômica e anomalias na meiose, como assinapse e aborto de sacos embrionários, constituem causas da esterilidade em *Musa*. Em alguns casos foi constatado que a esterilidade não era de origem genética direta, mas uma consequência de condições particulares, talvez de natureza hormonal, como deficiência do crescimento do tubo polínico nos estigmas e estiletos, ou mesmo defeito na fusão dos núcleos (SHEPHERD et al., 1987; SILVA et. al., 2001; FORTESCUE e TURNER, 2005b).

A grande lacuna existente no conhecimento das barreiras pré-zigóticas que levam à baixa produção de sementes em cultivares Prata, Gros Michel e Terra, ou mesmo ausência de sementes em cultivares Maçã, Grande Naine e Nanicão, tem dificultado o entendimento dos possíveis processos envolvidos e a definição de estratégias para superá-las. Nenhuma característica até então estudada foi correlacionada com a habilidade de fertilização entre dois genótipos, assim, os cruzamentos são tentados ao acaso, sem nenhuma segurança para o melhorista.

Para que se possam conhecer os mecanismos envolvidos na habilidade de dois genótipos se cruzarem foram utilizadas técnicas de biologia reprodutiva (por meio de testes de germinação *in vitro*, *in vivo* e colorimétricos dos grãos de pólen), visando elucidar assim os mecanismos envolvidos nas rotas reprodutivas de bananeira, de forma a compreender fatores responsáveis pela baixa produção ou ausência de sementes. Os resultados obtidos contribuirão para o avanço do melhoramento genético da bananeira, fornecendo dados sobre o sistema reprodutivo desta espécie.

Classificação botânica

A bananeira (*Musa* spp.) pertence à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Lillanae, ordem Zingiberales, família Musaceae (CRONQUIST, 1981; BELALCÁZAR CARVAJAL et al., 1991a). O gênero *Musa* está subdividido nas seções *Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Australimusa* e *Callimusa*, sendo que as duas primeiras apresentam conteúdo haplóide com 11 cromossomos, e as duas últimas 10 cromossomos. As seções *Rhodochlamys* e *Callimusa* não produzem frutos comestíveis. A seção *Eumusa*, ou simplesmente

Musa, é a mais importante, pois contém as espécies que deram origem as cultivares de interesse econômico (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955; BELALCÁZAR CARVAJAL et al., 1991b).

As cultivares tradicionais de bananeira apresentam na sua constituição cromossômica vários níveis de ploidia (diplóide, triplóide e tetraplóide, respectivamente, com 22, 33 e 44 cromossomos), em combinações variadas de genomas de duas espécies selvagens, *Musa acuminata* (genoma AA) e *Musa balbisiana* (genoma BB) (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955).

A bananeira é uma planta herbácea, destituída de caule vegetativo aéreo, apresentando folhas imbricadas umas nas outras. O caule subterrâneo ou rizoma é o centro vital da bananeira, pois é nele que ocorre a formação das raízes, folhas, inflorescências e rebentos ou “filhotes”. É uma estrutura cônica ou assimétrica, com eixo central curvo virado para cima e formado por muitos entrenós curtos. A partir dos nós existentes no rizoma surgem as raízes, enquanto da sua parte apical aparecem as folhas (CASTRO e KLUGE, 1988).

O sistema radicular é fasciculado, disposto horizontalmente, surgindo durante a fase vegetativa de crescimento (MOREIRA, 1987).

As folhas da bananeira são grandes, completas, espiraladas, simples, constituídas de bainha, pecíolo, limbo e nervura central. As bainhas são bem desenvolvidas e suas bases, enroladas, formam o pseudocaule. Sua posição varia amplamente entre grupos genômicos, sendo erectas nos diploides e pendentes a bem arcadas nos triploides e tetraplóides, respectivamente (SHEPHERD, 1984).

As flores de bananeira, que aparecem em forma de inflorescência, são estruturalmente bissexuais, porém funcionam como unissexuais. As flores femininas são constituídas de gineceu ínfero, longo, tricarpelar, trilocular, com vários óvulos por lóculos, estilete único e estigma trilobado (CASTRO e KLUGE, 1988). O estigma é o local onde o pólen é capturado, hidratado e germina, conseqüentemente o tubo polínico começa o seu desenvolvimento através dos tecidos femininos dos ovários (LUSH et al., 1999).

Nas flores femininas as anteras são atrofiadas, o filamento é mais curto e o pólen é degenerado, já nas flores masculinas, o ovário é atrofiado, e o estilete é muito delgado e os estames possuem anteras normais e os sacos polínicos são dispostos ao longo do filamento em duas linhas paralelas (MEDINA, 1985;

SIMMONDS, 1973). As femininas originam os frutos comerciais, enquanto as masculinas são incapazes de frutificar. Pode-se verificar ainda a presença de flores hermafroditas na zona de transição entre as flores femininas e masculinas, a exemplo da cultivar Mysore (MOREIRA, 1987), as quais podem frutificar, porém os frutos são pequenos, de má formação e sem valor comercial (MORIN, 1967).

O ovário é uma estrutura comprida, estreita e normalmente curva, com três lados nos frutos externos das pencas. Apresenta um ápice plano onde se inserem o perigônio, tépala livre, estilete e estames. No ápice é produzido néctar em abundância que atrai diversos insetos. O ovário é trilocular com óvulos em duas filas longitudinais em bananas como 'Gros Michel' e com quatro filas nos plátanos (CASTRO e KLUGE, 1988).

O coração (inflorescência masculina) é formado por brácteas que protegem cada grupo de flores. À medida que ocorre a antese, as brácteas se abrem (geralmente uma bráctea por dia) expondo as flores e posteriormente se desprendem, formando um eixo denominado de ráquis masculina onde se notam as cicatrizes florais, denominadas de almofadas. Em alguns genótipos as brácteas permanecem ligadas à ráquis mesmo após o secamento das flores (CARVALHO, 1995; DANTAS et al., 1999).

O cacho da bananeira é constituído por engaço (pedúnculo da inflorescência), penca (conjunto de frutos ou dedos, reunidos por seus pedúnculos em duas fileiras horizontais e paralelas), ráquis (eixo onde são inseridas as flores das inflorescências) e coração (conjunto de pencas de flores masculinas ainda em desenvolvimento, com suas respectivas brácteas) (CASTRO e KLUGE, 1988).

O fruto da bananeira é uma baga carnosa resultante do desenvolvimento, geralmente partenocárpico, dos ovários das flores femininas de uma inflorescência.

Ao contrário do que muitos acreditam, as estruturas pequenas de coloração escura observadas no interior do fruto não são sementes e sim óvulos não fertilizados que foram abortados. A semente de banana apresenta forma irregular, frequentemente achatada, com diâmetro variando de 3 a 6,5 mm, coloração marrom e possui uma membrana escariosa que recobre a casca, que é excessivamente dura, permanecendo fixa no cotilédone. A semente é derivada de um óvulo bitegumentar anátropo, sendo dividido em duas câmaras. A primeira contém o embrião e o endosperma e a menor a calaza. O tegumento externo é

uma estrutura massiva constituída de 30 a 35 camadas de células finas (Mc GAHAN, 1961).

Melhoramento genético de bananeira

O melhoramento genético convencional de bananas e plátanos é difícil e lento, devido principalmente a diferentes graus de esterilidade das cultivares triploides. A maioria dos programas de melhoramento convencional se baseia na obtenção de diploides melhorados, os quais são utilizados como parentais em cruzamentos com outros diploides ou alguns triploides que conservam certa fertilidade feminina (ESCALANT e SANDOVAL, 1992).

A estratégia de obtenção de diploides superiores, que são posteriormente utilizados na produção de cultivares tetraplóides resistentes às doenças e com características agronômicas desejáveis, é usada em programas de melhoramento genético conduzidos em diferentes centros de pesquisas. O programa da FHIA (*Fundación Hondureña de Investigación Agrícola*), no México, iniciado em 1984, já obteve uma série de híbridos tetraploides tolerantes ou resistentes à Sigatoka negra e ao mal-do-Panamá, a exemplo das cultivares FHIA-01, FHIA-02 e FHIA-18 para o consumo *in natura* e 'FHIA-21' e 'FHIA-22' para serem consumidas cozidas ou fritas, e que são cultivadas em vários locais no mundo (JANICK e PAULL, 2008). Na África, o IITA (*International Institute of Tropical Agriculture*), desde a sua criação em 1980, tem desenvolvido híbridos de plátanos e banana como os da série TMPx (plátanos), TMBx (banana) e triploides secundários (TM3x). Além desses, existem os programas da Índia (*Tamil Nadu Agricultural University*) e o do CIRAD (Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement) em Guadalupe, Martinica e Camarões (TEZENAS DU MONTCEL et al., 1994).

No Brasil, o programa de melhoramento genético da bananeira iniciado em 1983 na *Embrapa Mandioca e Fruticultura*, fundamenta-se principalmente no melhoramento de diploides (AA), e posterior cruzamento destes com triploides (AAB), obtendo-se assim, híbridos tetraplóides AAAB. Tem-se como objetivo desenvolver variedades com características agronômicas desejáveis, como resistência às pragas e nematóides, com porte e ciclos reduzidos, produtivas e de boa qualidade (SILVA et al., 2001; SILVA e SANTOS-SEREJO, 2003).

O baixo número de sementes obtido (como ocorre com as cultivares Maçã e Terra) ou mesmo ausência de sementes (subgrupo Cavendish), constitui-se no maior obstáculo ao programa de melhoramento convencional. Isto tem gerado uma expectativa negativa com relação ao futuro da bananicultura, tornando-se, portanto, de grande importância o desenvolvimento de metodologias alternativas para a obtenção de híbridos com características desejáveis.

Como suporte ao programa de melhoramento de bananeira por hibridação artificial tem sido utilizadas várias técnicas com o propósito de acelerar a obtenção de novas variedades resistentes. Entre elas, a indução de mutações com raios gama visando à obtenção de plantas com porte baixo (PESTANA et al., 2010), transformação genética de plantas, visando principalmente conferir resistência a doenças sem alterar as qualidades essenciais da cultivar (SUNIL KUMAR et al., 2005; ACERETO-ESCOFFIÉ et al., 2005), hibridação somática, que permite a introdução de resistência/tolerância a pragas e outras características de interesse encontradas em bananas diplóides (AA) nas cultivares triplóides mediante processo assexuado (MATSUMOTO, 2001); e biologia molecular para estudo da diversidade genética e determinação de marcadores ligados a características de interesse para o programa de melhoramento (JESUS, 2010; SILVA et al., 2010).

Viabilidade dos grãos de pólen

Estudos sobre viabilidade de grãos de pólen são fundamentais para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, pois permitem maior direcionamento e segurança nos cruzamentos realizados, aumentando a eficiência na obtenção de híbridos, auxiliando na identificação de gametas masculinos com potencial para serem usados em programas de hibridação (KRISHNAKUMAR et al., 1992).

Em geral, o pólen colhido de flores em adequado estágio de desenvolvimento e corretamente preparado não necessita de testes de viabilidade. Entretanto, não são raras as situações em que o pólen a ser usado tenha sido colhido em outra região ou, mesmo, fornecido por meio de intercâmbio com outros países. Muitas vezes, é necessário armazenar o pólen colhido em um

ano, para ser utilizado no ano seguinte. Neste caso, é recomendável testar a viabilidade do mesmo antes de sua utilização (EINHARDT et al., 2006).

O conhecimento do período de antese floral de uma espécie é muito importante para indicar o melhor momento de coleta do pólen para a obtenção de maior porcentagem de viabilidade do grão de pólen em processos de hibridações artificiais. De acordo com Nascimento et al. (2003), conhecer a viabilidade do grão de pólen é fundamental na produção de sementes híbridas, particularmente em espécies onde há a possibilidade de hibridação artificial.

A viabilidade do grão de pólen, medida da fertilidade masculina, pode ser determinada por meio de diferentes técnicas (DAFNI, 1992; KEARNS e INOUE 1993). Estas podem ser agrupadas em métodos diretos, como a indução da germinação *in vitro* (DUTRA et al., 2000; GOMES et al., 2003; PIO et al., 2007), *in vivo*, pela observação do crescimento do tubo polínico sobre o estigma e o pistilo, e formação de sementes após a polinização (GALLETTA, 1983; OLIVEIRA et al., 2001; FERREIRA et al., 2006) ou métodos indiretos baseados em parâmetros citológicos, como a coloração (SHIVANANA e JOHRI, 1985; SHIVANNA e RANGASWAMY, 1992; KEARNS e INOUE, 1993).

Segundo GALLETTA (1983), os métodos em que se utilizam corantes apresentam vantagens quanto à rapidez e facilidade em relação à germinação de pólen *in vitro*, embora superestimem a viabilidade do pólen, já que grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido à presença de enzimas, amido, ou outras substâncias.

Dentre os corantes mais utilizados destacam-se o carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (STANLEY e LINSKENS, 1974; SHARMA e SHARMA, 1994), 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio (SHIVANNA e RANGASWAMY, 1992), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo. Na literatura não há uma descrição de um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico. Os corantes nucleares, de acordo com Alexander (1980), tem aplicação limitada, pois colorem somente grãos e pólen funcionais, enquanto que aqueles inviáveis são identificados por não colorirem. Assim, não são adequados para espécies cujos grãos de pólen apresentam paredes espessas, mucilaginosas e com presença de espículas, pois dificultam a sua penetração e impedem a coloração. Nessa condição, grãos de pólen viáveis podem não apresentar

coloração e serem equivocadamente classificados como não viáveis. Para evitar isso, uma alternativa seria a utilização de corantes à base de verde malaquita e fuccina ácida que, devido às suas propriedades químicas básicas e ácidas, respectivamente, colorem grãos de pólen viáveis e não viáveis, mostrando-se eficientes para várias espécies.

O teste colorimétrico com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) reflete a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. A atividade enzimática do grão de pólen é associada à sua capacidade de germinação (DERIN e ETI, 1999). Quando o TTC reage com o hidrogênio produzido pela respiração celular dá ao pólen uma coloração vermelha (HOEKSTRA e BRUINSMA, 1975). Testes com outros corantes como lugol e sudan IV são utilizados em alguns estudos como indicativos de viabilidade polínica (SOUZA et al. 2002; HUANG et al., 2004). Entretanto, esses testes estão associados apenas à detecção e substâncias constituintes dos grãos de pólen, como amido e lipídios, que podem estar presentes tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados (KING, 1960; BEYHAUT, 1988; RODRIGUEZ-RIANO e DAFNI, 2000). Corantes, como o carmim acético e a solução de Alexander, são também utilizados como indicativos de viabilidade polínica (MULUGETA et al, 1994; DOMINGUES et al, 1999, RIGAMOTO e TYAGI, 2002), porém, para Báez et al. (1999) e Pline et al. (2002) estes testes refletem somente a integridade de estruturas celulares, como núcleo e membrana plasmática.

A coloração, embora seja um procedimento simples e barato, não fornece informações sobre capacidade germinativa do pólen, o que pode ser obtido por meio de testes de germinação *in vitro*. Esses testes têm sido empregados principalmente quando é necessário armazenar pólen em função da realização de cruzamentos controlados entre parentais com diferenças nos períodos de florescimento ou que se encontram em regiões distantes.

A germinação de pólen *in vitro* e *in vivo* permite a análise da capacidade de emissão do tubo polínico e uma correlação dessa taxa com a viabilidade do grão de pólen. Entretanto, a germinação *in vitro* é a técnica mais utilizada para estimar a viabilidade dos grãos de pólen, já que simula as condições do estilo-estigma, induzindo a germinação do tubo polínico (MARCELLÁN e CAMADRO, 1996). A germinação *in vitro* permite verificar a viabilidade do pólen fresco ou

armazenado e fornece informações básicas sobre a reprodução sexual (JAYAPRAKASH e SARLA, 2001).

O método geral consiste em germinar uma pequena amostra em um meio de cultura apropriado e observar em microscópio, após um determinado período, a porcentagem de grãos de pólen que desenvolvem tubo polínico. Porém, cada espécie requer um protocolo específico de meio de cultura para a obtenção de boa germinação do grão de pólen.

A composição do meio e o pH estão entre os fatores que afetam a sua germinação. Os grãos de pólen das angiospermas invariavelmente precisam de uma fonte de carbono, de boro e, frequentemente, de outros nutrientes para promover a germinação (FRANZON et al., 2005; GWATA et al., 2003; PFAHLER et al., 1997; GALLETTA, 1983).

O açúcar empregado no meio de cultura tem por finalidade proporcionar um equilíbrio osmótico entre o pólen e a solução do meio de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento de tubo polínico (NUNES et al., 2001). Alguns autores consideram os açúcares meramente uma fonte de energia para o crescimento do tubo polínico, enquanto outros consideram como principal fator de controle da pressão osmótica (BALOCH et al., 2001).

A adição de boro é importante para a germinação do pólen de algumas espécies. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, que reage mais rapidamente com as membranas celulares (FRANZON et al., 2005).

Thompson e Batjer (1950) verificaram que a adição de boro ao meio de cultura aumentou marcadamente a porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico de várias frutíferas de clima temperado.

Em muitas espécies o meio de cultura composto de açúcar, ácido bórico e ágar foram suficientes para promover a germinação *in vitro* do grão do pólen. Estudando a germinação de grãos de pólen em bromeliáceas, Parton et al. (2002) concluíram que meio de cultura contendo 200 g L⁻¹ de sacarose, 10 g L⁻¹ de ácido bórico e 5 g L⁻¹ de ágar, apresentaram os melhores resultados. Aplicação de boro foliar em amêndoas reduziu a ruptura dos tubos polínicos durante a germinação *in vivo*, e a adição de 100 mg L⁻¹ de boro no meio de cultura aumentou a germinação de grãos de pólen *in vitro* (NYOMORA et al., 2000). Bombenc et al. (1999), estudando a germinação de grãos de pólen de kiwi obtiveram melhores resultados

com a utilização de meio de cultura composto por 100 g L⁻¹ de sacarose, 0,025 g L⁻¹ de ácido bórico e 6 g L⁻¹ de ágar. Campos-Andrada e Hill (1999) observaram em tremoço que o meio de cultura contendo 20% de sacarose, 0,01% de ácido bórico e 0,25% de ágar proporcionaram melhores resultados para germinação.

Outro elemento importante na germinação do grão de pólen *in vitro* é o cálcio, que propicia características fisiológicas como menor sensibilidade do tubo polínico e grão de pólen a variações do meio básico, menor permeabilidade, crescimento linear e aparência rígida do tubo polínico (BHOJWANI e BHATNAGAR, 1974). Na ausência de cálcio há maior permeabilidade da membrana do tubo polínico, causando a liberação de metabólitos internos para o meio externo (STANLEY e LINSKENS, 1974).

Em três cultivares de citros, a germinação de grãos de pólen, após o período de um ano de armazenamento, foi estimulada pela utilização de ácido bórico e cálcio (SAHAR e SPIEGEL-ROY, 1980). Oliveira Júnior et al. (2000) analisando a emissão de tubos polínicos em limoeiro cravo obtiveram resultados satisfatórios com 800 mg L⁻¹ de cálcio.

Brewbaker e Kwack (1963) trabalhando com 86 espécies e 39 famílias, mostraram que adição de cálcio e boro atua como um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro*. Beyoug (1965) observou, em 46 espécies hortícolas, que a adição de cálcio promoveu a germinação de pólen e o crescimento do tubo polínico em todas as espécies estudadas. Silva et al. (1999b) constataram que o melhor meio para a germinação de pólen de maracujazeiro é composto por 50 g L⁻¹ de sacarose; 0,2 g L⁻¹ de ácido bórico e 1,0 g L⁻¹ de nitrato de cálcio. Em sorgo, Tuinstra e Wendel (2000) observaram que em meio de cultura contendo 0,9 M de sacarose, 2,43 m M de ácido bórico e 2,12 m M de nitrato de cálcio a germinação de grãos de pólen foi aumentada.

Em bananeira, estudos sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen auxiliaram na identificação de gametas masculinos com alta viabilidade para utilização em programas de hibridação (KRISHNAKUMAR et al., 1992; SOARES et al., 2008; NYINE e PILLAY, 2007).

O método de germinação *in vitro* é o mais apropriado e capaz de revelar o estado das substâncias de reserva, as condições da membrana, assim como a conversão de reservas para a germinação do pólen (MARCELLÁN e CAMADRO, 1996).

Finalmente, vale destacar que a germinação do pólen *in vitro* é influenciada por vários fatores, como a espécie, o meio de cultura, a temperatura, o tempo de incubação, o estágio de desenvolvimento das flores quando coletadas e as condições de armazenamento (FRANZÓN et al., 2006; SOARES et al, 2008; LYRA et al., 2011).

Fertilização *in vivo*

A polinização da bananeira é cruzada, pois a maturação dos órgãos masculinos e femininos ocorre em épocas diferentes (dicogamia), e geralmente é feita por insetos. A polinização controlada só é realizada objetivando o melhoramento genético, já que os frutos da bananeira originam-se por paternocarpia. Este método permite o controle da identidade de ambos os genitores, femininos e masculinos, descartando-se os riscos de cruzamentos indesejáveis e de autofecundações. No entanto, o número de sementes produzidas por cruzamento é pequeno e o custo com mão-de-obra é elevado.

A polinização controlada de banana pode ser realizada manualmente. Para o êxito desta técnica, deve-se evitar ao máximo a ocorrência de danos mecânicos às estruturas florais da planta. No período da manhã, faz-se uma revisão nos campos de cruzamentos, a fim de identificar os diploides cujas flores abrirão no dia seguinte. Em seguida, faz-se a proteção das flores femininas com sacos de polietileno, para evitar possíveis contaminações por insetos, e a polinização indesejada. O melhor momento para se realizar a polinização é quando as flores femininas apresentam as pétalas livres do estigma (antese), encontrando-se, portanto, aptas e receptivas para a polinização e fecundação.

A polinização é feita retirando-se os grãos de pólen férteis de uma flor masculina, os quais são depositados em uma flor feminina que esteja protegida pela bráctea, o que indica ser uma flor ainda não polinizada. Essa bráctea é levantada para realizar a polinização e, imediatamente, reconduzida à sua antiga posição e protegida com saco de polietileno para evitar a entrada de insetos que possam trazer grãos de pólen de outras plantas. Não há necessidade de reabrir a bráctea depois; com o tempo, ela cairá naturalmente. O contato das anteras com o estigma da flor feminina é suficiente para assegurar a polinização. Uma flor masculina poliniza, em média, de 3 a 5 flores femininas, dependendo da

quantidade e da viabilidade dos grãos de pólen do genótipo. Após a polinização, devem ser colocadas no saco de polietileno etiquetas com informações sobre o número de polinização, e anotadas no caderno de campo informações sobre o genitor masculino utilizado, local e data, assim como, o número de flores polinizadas. Recomenda-se a cobertura dos frutos até a última emissão da penca, para evitar a entrada de insetos, assegurando assim, a integridade do processo.

A presença de sementes nos frutos maduros confirma o sucesso da polinização. As bananeiras selvagens apresentam, em média, de 80 a 100 sementes férteis por fruto. Já nas cultivares triploides esse número geralmente é bastante reduzido, dificilmente ultrapassando cinco sementes por fruto. O baixo número e até mesmo a ausência de sementes, nos cruzamentos constitui-se em uma das maiores limitações no programa de melhoramento genético da bananeira.

As bananeiras de frutos comestíveis, em geral, são triplóides, não produzem grãos de pólen férteis e os ovários das flores femininas dificilmente podem ser fecundados, devido a um atrofiamento do estigma que impede a passagem do pólen. Porém, há casos excepcionais em que a fecundação se processa normalmente, surgindo com isso sementes férteis, como nas cultivares Pacovan (AAB) e Prata Anã (AAB), a partir das quais têm sido gerados híbridos tetraplóides resistentes à Sigatoka negra (Silva et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERETO-ESCOFFIÉ, P. O. M.; CHI-MANZARENO, B. H.; ECHEVERRÍA - ECHEVERRÍA, S.; GRIJALVA, R.; JAMES KAY, A.; GONZÁLEZ-ESTRADA, T.; CASTAÑO, E.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, L. C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. "Grand Nain" scalps by vacuum infiltration. **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 359–371, 2005.

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v 55, p. 13-18. 1980.

BAÉZ, P., RIVEROS, M.; LEHNEBACH, C. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. New Zealand, **Journal of Botany**, v. 40, p. 671-678, 1999.

BALOCH, M. J.; LAKHO, A. R.; BHUTTO, H.; SOLANGI, M. Y. Impact of sucrose concentrations on *in vitro* pollen germination of Okra, *Hibiscus esculentus*. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 402-403, 2001.

BELALCÁZAR CARJAVAL, S.; SALAZAR M., C. A.; CAYÓN S., G.; LOZADA Z., J. E.; CASTILLO, L. E.; VALENCIA M., J. A. Manejo de Plantaciones. In: **El cultivo del plátano en el tropico**. Colômbia: INIBAP/ICA/CDCT/ CIID, 1991b. p.149-242. (Manual de Asistencia Tecnica, 50).

BELALCÁZAR CARVAJAL, S. L.; JORGE, A. V. M.; JESÚS, E. L. Z. La planta y el fruto. In: CARVAJAL, S.L.B. (Ed.). **El cultivo del platano en el tropico**. Colombia: ICA, n. 50, p.44-89, 1991a.

BEYHAUT, T. Estúdio comparado de dos técnicas para viabilidad de polen en *Vitis vinifera*. **Notas técnicas**, 5. Facultad de Agronomía, Montevideo, 1988. 42p.

BEYOUNG, H. K. The effects of calcium on pollen germination. **American Society of Horticultural Science**, v.86, p.818-823, 1965.

BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S. P. **The embryology of angiosperms**. New Delhi, 1974. 264p.

BOMBEN, C.; MALASSONI, C.; CIPRIANI, G.; TESTOLIN, R. Long term storage of kiwifruit pollen. **Acta Horticulturae**, n.498, p.105-108, 1999.

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

BRITO, M. R. **Caracterização molecular e fenotípica de bananeira cultivar Terra transformada com o gene stx**. 2010. 75p. (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Cruz das Almas.

CAMPOS-ANDRADA, M. P.; HILL, G. D. Storage and longevity of *Lupinus luteus* L. pollen. **Towards the 21st century**, v.11, n.16, p.321-326, 1999.

CARVALHO, P. C. L. **Estabelecimentos de descritores botânico-agronômico para caracterização de germoplasma de banana (*Musa spp.*)**. 1995. 174p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal da Bahia/Escola de Agronomia, Cruz das Almas.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. **Ecologia de fruteiras tropicais**. São Paulo: Nobel, v. 1, não paginado, 1988.

COSTA, F H S; SILVA, S. O.; PASQUAL, M. ; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SILVA NETO, H.P. **Uso da duplicação de cromossomos no melhoramento genético de bananeira**. In: III Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009, Cruz das Almas-BA. Cruz das Almas-BA : Embrapa, 2009.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S. O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa spp.*) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, n. 132, p. 259-268, 2003.

CRONQUIST, A. The divisions and classes of plants. **Botanical Review**, v.26, n. 4, p. 425-82,1981.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York: University Press, 1992. 250p.

DANTAS, A. C. V. L.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Estrutura da planta. In: ALVES, E. J. **A cultura da Banana**. Brasília: Embrapa-SPI/Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1999. p. 47-60.

DERIN, K.; E. T. I, S. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 25, p. 169-173, 1999.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN-NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ANDO, A. Efeitos de doses de raios-gama em ápices caulinares de bananeira (*Musa* sp.) desenvolvidos *in vitro* visando a indução de mutação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 29 n. 7, 1091-109, 1994.

DOMINGUES, E. T.; NETO, A. T.; SOBRINHO, J. T. Viabilidade do pólen em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 265-272, 1999.

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

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

ESCALANT, J. V.; SANDOVAL, J. A. **El cultivo *in vitro* em el mejoramiento genético del plátano y del banano**. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñaza, 1992. 18p.

FAO. **FAO statistical databases**: agricultural production: crops primary: Brazil: bananas. Disponível em:[http// www.apps.fao.org/page/collections](http://www.apps.fao.org/page/collections). Acessado em: 21 mar. 2010.

FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. V. R.; ALVIM, P. O.; SILVA, T. T. A. Conservação e determinação da viabilidade do grão de pólen de milho. In: XXVI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO – INOVAÇÃO PARA SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO, 26, 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABMS/EMBRAPA-CNPMS, 2006.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. The occurrence of a micropylar exudate in *Musa* and *Enset* (Musaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 445-461, 2005a.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. The anatomy of ovule ontogeny of banana, plantain and enset (Musaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 479-492, 2005b.

FRANZON, R. C.; CORRÊA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. *In vitro* pollen germination of feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 229-233, 2005.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 18-20, 2006.

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

GANGA, M.; CHEZHIAN, N. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). **Journal of Horticultural Science e Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 572-575, 2002.

GARCIA, L. R.; PÉREZ, P. J.; BERMÚDEZ, I. C.; ORELLANA, P. P.; VEITIA, N. R.; GARCIA, L. R.; PADRÓN, Y. M.; ROMERO, C. Q. Comparative study of variability produced by induced mutation and tissue culture in banana (*Musa* sp.) cv 'Grande naine'. **Infomusa**, v. 11, n. 2, p. 4-6, 2002.

GOMES, P. R.; RASEIRA, M. C. B.; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n.1, p.14-17, 2003.

GWATA, E. T.; WOFFORD, D. S.; PFAHLER, P. L.; BOOTE, K. J. Pollen morphology and *in vitro* germination characteristics of nodulating and nonnodulating soybean (*Glicine max* L.) genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 837-839, 2003.

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DOOD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploid by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, v. 40, p. 887-896, 1992.

HOEKSTRA, F. A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. **Plant Physiology**, v.34, p.221-225, 1975.

HUANG, Z., ZHU, J., MU, X. & LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, v. 93, p. 295-301, 2004.

JANICK, J.; PAULL, R. **The Encyclopedia of Fruit e Nuts**. Indiana: CABI, 2008. 954p.

JAYAPRAKASH, P.; SARLA, N. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. pollen *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357 p. 851-855, 2001.

JESUS, O. N. **Caracterização molecular de acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa**. 2010. 137p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESALQ/USP), Piracicaba.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado, 1993. 579p.

KING, J. R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. **Stain technology**, v.35, p.225-227,1960.

KRISHNAKUMAR, M. P.; VALSALAKUMARI, P. K.; ARAVINDAKSHAN, M. Pollen

production, fertility and viability in different nodes of the banana cultivars. **Agricultural Research**, v. 30, p. 53-57, 1992.

LUSH, W. M. Winter chemotropism and pollen tube guidance. **Trends Plant Science**, London, v. 4, p. 413-418, 1999.

LYRA D. H.; SAMPAIO, L. S.; PEREIRA, D. A.; SILVA A. P.; AMARAL, C. L. F. Pollen viability and germination in *Jatropha ribifolia* and *Jatropha mollissima* (*Euphorbiaceae*): Species with potential for biofuel production. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 368-374, 2011.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 101-104, 1996.

MATSUMOTO, K. Híbridos somáticos: fusão celular para a obtenção de híbridos interespecies de banana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 4, n. 20, p. 26-28, maio/jun. 2001.

MATSUMOTO, K.; MORAIS, L. S.; VIANA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Genetic transformation of banana embryogenic cells through particle bombardment using a herbicide resistance gene as selectable marker. **Acta Horticulturae**, v. 575, p. 61-67, 2002.

Mc GAHAN, M. W. Studies on the seed of banana. I Anatomy of the seed and embryo of *Musa balbisiana*. **American Journal of Botany**, v. 48, n. 3, p. 230-238, 1961.

MEDINA, J. C. **Banana cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas: ITAL, p. 1-131, 1985.

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Campinas, Fundação Cargill, 335p, 1987.

MORIN, C. **Cultivo de frutales tropicales**. Lima: Librerías A.B.C., 1967. 448p.

MULUGETA, D.; MAXWELL, B. D.; FAY, P. K., DYER, W. E. *Kochia* (*Kochia scoparia*) pollen dispersion, viability and germination. **Weed Science**, v. 42, p 548-552, 1994.

NASCIMENTO, W. M.; TORRES, A. C.; LIMA, L. B. Pollen viability in hybrid seed production off eggplant under tropical conditions. **Acta Horticulturae**, p. 37-39, 2003.

NUNES, J. C. O.; DANTAS, A. C. M.; PEDROTTI, E. L.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 35 - 39, 2001.

NYINE, M.; PILLAY, M. Banana nectar as a medium for testing pollen viability and germination in *Musa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 10, p. 1175-1180, 2007.

NYOMORA, A. M. S.; BROWN, P. H., PINNEY, K.;POLITO, V. S. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n.2, p.265-270, 2000.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. RAMOS, J. D.; SANÁBIO, D. **Efeito do cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14, 1996, Curitiba, **Abstract...** Curitiba: SBF, 2000, p.419.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Carlos, v.15, n.1, p.63-67, 2001.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, v. 125, p. 155-161, 2002.

PESTANA, R. K. N.; AMORIM, E. P.; SILVA, S. O.; NETO, A. T. Irradiação gama para mutagênese *in vitro* em bananeira 'Terra Maranhão'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 10, p.1328-1330, 2010.

PFAHLER, P. L.; PEREIRA, M. J.; BARNETT, R. D. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 1218-1222, 1997.

PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. S.; RUFINI, J. C. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1, p.147-153, 2007.

PLINE, W. A., EDMISTEN K. L., OLIVER, T., WILCUT, J. W., WELLS, R.; ALLEN, N. S. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, v. 42, p. 2193-2200, 2002.

RIGAMOTO, R. T.; TYAGI, A. P. Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma Island. **The South Pacific Journal Natural Science**, v.20, p.30-33, 2002.

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

SAHAR N.; SPIEGEL-ROY, P. *In vitro* germination of avocado pollen. **HortScience**, v.19, p.886-888, 1984.

SHEPHERD, K. **Taxonomia e caracterização de cultivares de banana**. Cruz das Almas, BA: Embrapa CNPMF, 5p, 1984.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Banana breeding in Brazil. In: PERSLEY, G. J.; DE LANGHE, E. A. (ed.). **Banana and plantain breeding strategies**. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, p.78-83, 1987.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Melhoramento genético da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12 p.11-19, 1986.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**. A laboratory manual. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1992, 119p.

SHIVANNA, K. R.; JOHRI, B. M. **The angiosperm pollen**: structure and function. New Delhi: Wiley Eastern Ltd., 1985. 374p.

SILVA, C. M.; HINZ, R. H.; STADNIK, M. J.; TCACENCO, A. P. F. A. Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* no Estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2480-2485, 2010.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. S. Melhoramento genético da bananeira. In: BRUCKNER, C. H. (ed.). **Melhoramento de espécies frutíferas**. Viçosa: UFV, 1999a.

SILVA, M. M.; BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C. D. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 347-352, 1999b.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. Melhoramento da bananeira para resistência: resultados obtidos pelo melhoramento convencional. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA E WORKSHOP DO GENOMA MUSA, 5., 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p. 28-34.

SILVA, S. O.; SOUZA, J. R.; M. T.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R.S.; LIMA, M. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origin of the cultivated bananas. **The Botany Journal of Linnean Society of London**, London, v.55, n. 359, p.302-312, 1955.

SIMMONDS, N.W. **Los plátanos**. Barcelona: Blume, 1973. 539p.

SOARES, T. L.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; SILVA, S. O. **In vitro fertilization of banana for the obtainment of Grand Naine hybrids**. In: XVI Reunión Internacional ACORBAT, 2004, Oaxaca. ACORBAT. p. 261-261, 2004.

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. **In vitro** germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.8, p.111-118, 2008.

SOEJIMA, J.; ABE, K.; KOTODA, N.; KATO, H. Recent progress of apple breeding at the Apple Research Center in Morioka. **Acta Horticulturae** v. 538, n. 211-214, 2000.

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

SSEBULIBA, R.; TALENGERA, D.; MAKUMBI, D.; NAMANYA, P.; TENKOUANO, A.; TUSHEMEREIRWE, W.; PILLAY, M. Reproductive efficiency and breeding potential of East African highland (*Musa* AAA-EA) bananas. **Field Crops Research**, v. 95, p. 250-255, 2006.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1974. 307p.

SUNIL KUMAR, G. B.; GANAPATHI, T. R.; REVATHI, C. J.; SRIVIVAS, L.; BAPAT, V. A. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. **Planta**, v. 222, p.484-493, 2005.

TEZENAS DU MONTCEL, H.; BAKRY, F.; HORRY, J. P. Breeding for the improvement of banana and plantain. **Proceedings of the first meeting of the Musa breeders Network**, Honduras. p. 27-30, 1994.

THOMPSON, A. H.; BATJER, L. P. The effect of boron in the germination medium on pollen germination and pollen tube growth of several deciduous tree fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.56, p. 227-230, 1950.

TUINSTRA, M. R.; WENDEL, J. Estimation of pollen viability in grain sorghum. **Crop Science**, v.40, p.968-970, 2000.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J.; LATADO, R. R.; SANTOS, P. C.; BOLIANI, A. *In vitro* mutation induction for resistance to *Fusarium* wilt in the banana. In: Induced mutations and molecular techniques for crop improvement, International Atomic Energy Agency, Viena-Austria, p.641-642, 1995.

VAN DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, v. 88, p. 25-34, 2002.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DA COLETA SOBRE A VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DE BANANEIRA¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Crop Breeding and Applied Biotechnology.

INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DA COLETA SOBRE A VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DE BANANEIRA

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade polínica de seis diploides (AA) melhorados de bananeira coletados em diferentes períodos após a abertura da flor masculina (antese), por meio da germinação *in vitro* e coloração. Foram avaliados cinco horários de coleta de pólen: 8h (antese), 10h, 12h, 14h e 16 h. Utilizou-se o meio de cultura para a germinação de pólen de bananeira, contendo 15% de sacarose, 0,01% H_3BO_3 , 0,01% de KNO_3 , 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, solidificado com 0,8% de ágar, e pH ajustado para 5,8 ou 7,0. A viabilidade do pólen foi avaliada pela coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Os maiores valores de germinação *in vitro* (GIV) e viabilidade polínica (VP) foram obtidos às 8h da manhã e os mais baixos às 16h. Dentre os genótipos analisados, o 089087-01 foi o que apresentou os mais altos valores de GIV e VP, com 90,75% e 91,33%, respectivamente, quando as flores foram coletadas às 8h e inoculadas em meio com pH 7,0. O percentual médio de germinação *in vitro* e viabilidade do pólen em bananeiras diploides foi negativamente influenciado pelo número de horas após a antese. O melhor horário de coleta do pólen, com relação à melhor germinação e viabilidade, é na antese, às 8h da manhã.

Palavras-chave: *Musa acuminata*, germinação de pólen *in vitro*, polinização, TTC.

INFLUENCE OF TIME COLLECTION ON VIABILITY OF POLLEN GRAINS OF BANANA

ABSTRACT: The aim of this work was to evaluate the pollen viability of banana diploids hybrids (AA) six that were collected in different times (hours) after anthesis at intervals of two hours using *in vitro* germination and coloring techniques. Five times of pollen collection were evaluated: anthesis (8 a.m), 10 a.m., 12 o'clock; 2 p.m. and 4 pm. The standard media culture to pollen germination was used with 15% of sucrose, 0,01% H₃BO₃, 0,01% KNO₃, 0,03% Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0,02% MgSO₄.7H₂O, solidified with 0,8% of agar and pH adjusted to 5,8 or 7,0. The pollen viability was evaluated by coloring with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). The higher values of *in vitro* germination and pollen viability by coloring was obtained at anthesis (8 a.m.) and the lower at 4 p.m. Among evaluated genotypes the 089087-01 presented the best results of *in vitro* germination and pollen viability with 90,75% and 91,33%, respectively, with flowers collected at 8 a.m. and the media culture adjusted to pH 7,0. The pollen germination and viability was negatively influenced by the numbers of hours after anthesis. The recommended is to perform the pollen collection at anthesis (8 a.m.).

Key-words: *Musa acuminata*, *in vitro* pollen germination, pollination, TTC.

INTRODUÇÃO

No melhoramento genético convencional da bananeira são realizados vários cruzamentos onde se busca a obtenção de híbridos tetraplóides, mediante cruzamentos de diploides com cultivares triploides (SILVA et al., 2001). Para isto, é dispensada uma atenção ao germoplasma diplóide (AA), já que concentra o maior número de características desejáveis, tais como partenocarpia, bom número de pencas, dedos compridos, cachos bem formados, porte baixo e resistência a pragas e doenças. Portanto, é imprescindível o conhecimento da fertilidade polínica desses materiais, já que serão usados como genitores masculinos em programas de hibridação.

A análise da viabilidade do pólen fornece um indicativo da fertilidade masculina, permitindo maior direcionamento e segurança nos cruzamentos realizados, e aumentando a eficiência na obtenção de híbridos. Existem quatro métodos para estimar a viabilidade do pólen: 1) teste de germinação *in vitro*; 2) teste colorimétrico; 3) teste de germinação *in vivo*, avaliando o crescimento do tubo polínico no estigma e ou pistilo e 4) formação de sementes após a polinização (DAFNI, 1992; KEARNS e INOUE, 1993). O uso de corantes é o método mais rápido e geralmente usado para verificar a viabilidade de pólen. Porém, este método pode superestimar a viabilidade, pois muitas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ainda corar, por possuírem quantidade suficiente de enzimas, amido ou outras substâncias. Já os dois últimos métodos são bastante trabalhosos, necessitando de maior tempo para se obter os resultados (GALLETTA, 1983).

A germinação *in vitro* é o método mais conveniente e seguro para se testar a viabilidade de grãos de pólen e, segundo Marcellán e Camadro (1996), revela o verdadeiro estado de reservas, a condição das membranas e a conversão das reservas para o grão de pólen germinar. Este é também, o método mais utilizado nos programas de melhoramento genético. Entretanto, a germinação *in vitro* é influenciada por diferentes fatores dentre eles: espécie vegetal, estado nutricional das plantas, fotoperíodo, temperatura, pH, umidade, estado de maturação fisiológico do pólen, método de coleta, aplicação de agrotóxicos nas plantas, período e condição de armazenamento do pólen

(NEVES, 1997). Além disso, o grão de pólen requer uma ótima concentração e combinação de substâncias para a sua germinação e formação do tubo polínico. Assim, o meio de cultura adequado e a hora de coleta dos grãos de pólen de bananeira, têm grande influência na taxa de germinação e desenvolvimento do tubo polínico.

Em qualquer método de polinização, a viabilidade de pólen é considerada satisfatória quando está entre 50% a 70%. No campo, o pólen é viável somente por algumas horas e apresenta um curto tempo de vida, pois está sob temperatura moderada, alta umidade e intensidade luminosa. Além disso, está sujeito a ser atingido por aplicações de fungicidas, que também contribuem para reduzir a viabilidade. À medida que o pólen começa a envelhecer, a percentagem de germinação e o comprimento do tubo polínico vão progressivamente diminuindo. Embora os grãos de pólen pareçam inviáveis, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que os mesmos ainda apresentam uma condição suficientemente boa para assegurar uma frutificação efetiva, não obstante apresente baixa percentagem de germinação (SCORZA e SHERMAN, 1995).

O conhecimento do melhor momento de coleta do pólen para a obtenção de maior porcentagem de grãos de pólen viáveis é fundamental na produção de sementes híbridas, particularmente em espécies onde há a possibilidade de hibridação artificial (NASCIMENTO et al., 2003). Apesar da existência de trabalhos que tratam da utilização de métodos para avaliar a viabilidade do pólen de bananeira, até o momento não existem relatos sobre a influência do horário de coleta das flores masculinas na eficiência da hibridação.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo determinar o melhor momento de coleta do pólen e a viabilidade polínica dos híbridos diploides de bananeira, mediante a germinação *in vitro* e a coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura durante o mês de novembro de 2008, com temperatura variando de 32,6°C a 26,2 °C e umidade relativa de 90%. Os dados meteorológicos foram fornecidos pela Estação de Meteorologia da Embrapa.

Como material vegetal utilizou-se grãos de pólen de seis híbridos diploides melhorados de bananeiras (AA), gerados pelo programa de melhoramento de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Tabela 1).

Tabela 1. Híbridos diploides melhorados utilizados neste estudo e seus respectivos parentais.

Híbrido diploide melhorado	Parental feminino	Parental masculino
013018-01	Malaccensis (S)	Sinwobogi (C)
042052-04	M 53 (H)	Kumburgh (C)
050012-02	M 61 (H)	Lidi (C)
088079-01	Malaccensis (S) x Madang (C)	Tuu Gia (C) x Calcutta 4 (S)
089087-01	Malaccensis (S) x Sinwobogi (C)	Calcutta 4 (S) x Heva (C)
091087-01	Borneo (S) x Guyod (C)	Calcutta 4 (S) x Heva (C)

S = Selvagem; C = Cultivar; H = Híbrido, com parentais desconhecidos.

Os grãos de pólen foram coletados de flores na antese (momento em que a flor está completamente aberta, permitindo a liberação do pólen), retirados da mesma bráctea, em cinco horários distintos (8, 10, 12, 14 e 16 h). Em seguida, amostras oriundas de cada horário de coleta foram inoculadas *in vitro* para avaliação da germinação do pólen e crescimento do tubo polínico. Amostras também foram utilizadas para coloração com TTC visando analisar a viabilidade do pólen.

Germinação de pólen in vitro

Para a germinação *in vitro* (GIV) os grãos de pólen, sem qualquer processo de desinfestação, foram inoculados em placas de Petri com diâmetro de 9 cm e altura de 1 cm contendo 35 mL do meio de cultura proposto por Soares et al. (2008), composto de 15 % de sacarose, 0,01 % de ácido bórico, 0,01 % de nitrato de potássio, 0,03 % de nitrato de cálcio e 0,02 % de sulfato de magnésio, solidificado com 0,8 % de ágar, pH ajustado em 5,8 ou 7,0 e autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

Com auxílio de um pincel, o pólen foi distribuído sobre o meio de cultura de modo a promover uma distribuição mais homogênea do material. Utilizou-se para cada placa uma amostra composta de pólen oriundos de cinco flores de cada genótipo.

Após a inoculação, as placas foram mantidas em condições controladas de temperatura ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$), no escuro, antes de se realizar a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento do tubo polínico, respectivamente, 24 e 48 horas após a inoculação em meio de cultura mediante observação em um estereomicroscópio binocular com objetiva 10x.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $6 \times 5 \times 2$ (genótipo x hora de coleta x pH) com oito repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

Para a percentagem de germinação foram contabilizados todos os grãos da placa, enquanto para o comprimento do tubo polínico foram mensurados aleatoriamente 5 tubos em cada placa de Petri, totalizando 40 tubos polínicos de cada genótipo estudado. O comprimento foi medido em micrômetros, utilizando-se estereomicroscópio e lâmina micrométrica e os dados foram transformados em milímetros. Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

Viabilidade de pólen

A viabilidade do pólen (VP), foi realizada por meio da coloração com corante 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% diluído em tampão tris HCl 0,15M, pH 7,8.

Uma amostra de pólen, retirada de três anteras oriundas de flores coletadas da mesma bráctea foi distribuída sobre uma lâmina de vidro e em seguida colocou-se uma gota do corante, fechando-se o conjunto com uma lamínula. As observações das quantidades de pólen viáveis e inviáveis por genótipo foram analisadas duas horas após a preparação das lâminas, pois o corante TTC requer um lapso de tempo para que ocorra a reação enzimática.

A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados foi utilizado o método de varredura da lâmina em um microscópio óptico com lente

objetiva de 10x, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 5 (genótipo x hora de coleta) com três repetições cada. Os dados de porcentagem foram transformados para arc sen ($\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística. Para avaliar a relação da viabilidade e a germinação com o horário de coleta das flores masculinas foi realizada a análise de variância, com a comparação das médias efetuada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em complementação à análise estatística para o teste de germinação e viabilidade, utilizou-se a análise de regressão e os modelos matemáticos foram escolhidos segundo equações com melhores ajustes, confirmado pelos maiores valores de coeficiente de determinação (R^2) e o teste F da regressão, ambos a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa computacional SAS System para Windows, versão 9.1 (SAS, Institute Inc. NC, USA, 2004) para a análise dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3, observou-se diferenças significativas para a germinação *in vitro* (GIV) nos dois pHs testados e para a viabilidade polínica (VP) de amostras de grãos de pólen de bananeiras diploides coletadas em diferentes horários.

Em todos os genótipos testados a GIV foi mais elevada em coletas realizadas às 8 horas, com pólen cultivado em meio com pH 7,0. Dentre os genótipos avaliados, destacou-se o 089087-01 que apresentou os maiores valores de germinação, com 90,75% quando as flores foram coletadas às 8 horas e o pólen inoculado em meio com pH ajustado em 7,0, sendo superior aos demais genótipos em todos os horários de coleta. Por outro lado, o genótipo 050012-02 apresentou os mais baixos valores para GIV em todos os horários de coleta. As figuras 1a e 1b ilustram diferenças na germinação *in vitro* de grãos de pólen de bananeira.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os obtidos por Soares et al. (2008), que identificaram o meio de cultura com pH

ajustado para 7,0 como o mais indicado para a germinação dos grãos de pólen de diploides (AA) de bananeira.

A partir desses resultados verificou-se também que o nível de pH no meio influenciou marcadamente o processo de germinação de pólen dos diferentes genótipos, concordando com as observações de BREWBAKER e KWACK (1963) e STANLEY e LINSKENS (1974).

Com relação à viabilidade estimada com o corante TTC houve interação altamente significativa, genótipo e horário de coleta. Mais uma vez o genótipo 089087-01 se destacou em relação aos demais, com 91,33% de grãos de pólen viáveis, oriundos de flores coletadas às 8 horas (Tabela 3, ilustrado na Figura 1c). Por outro lado, o diplóide 050012-02 apresentou os menores valores de viabilidade em todos os horários de coleta, com 45% e 19% nas coletas de 8 e 16 horas, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 1d.

Os maiores valores de GIV e VP foram obtidos às 8h e os mais baixos às 16 h, ou seja, existe a tendência de queda percentual à medida que aumenta o tempo após a abertura da flor. Os valores mais altos de GIV e VP, obtidos às 8 horas, são explicados pelo fato de que nesse horário de coleta o pólen encontra-se em adequado estágio de desenvolvimento fisiológico (imediatamente após a antese), observando-se, portanto, uma redução nos valores dessas variáveis ao longo do dia.

Pela análise de regressão (Figura 2), observou-se que o percentual de germinação *in vitro* e a viabilidade do pólen foram negativamente influenciados pelo número de horas após a antese. Houve relação linear tanto para GIV como para o VP (y) e os horários de coleta (x), com maiores médias de germinação e viabilidade obtidas às 8h, e a mais baixa às 16h. Portanto, o conhecimento do momento adequado de coleta dos grãos de pólen é essencial para o programa de melhoramento genético da bananeira, principalmente quando se quer obter maior eficiência dos cruzamentos.

A perda da viabilidade polínica em função do tempo após a abertura da flor foi também observada por SOUZA et al. (2002), em maracujá amarelo utilizando-se de análise histoquímica (solução de Alexander e lugol), porém o índice ainda se manteve alto, superior a 75%, mesmo 24 horas após a antese. Outros fatores, tais como umidade relativa, temperatura, pressão osmótica do

conteúdo celular do pólen e resistência da parede polínica podem afetar a viabilidade polínica (SOUZA, 1994; VARA PRASAD et al., 1999).

Em muitas espécies, a esterilidade do pólen pode estar associada com irregularidades meióticas, tais como citomixia, ou seja, a transferência de cromossomos entre meiócitos, envolvendo parte ou todo o genoma (CAETANO-PEREIRA e PAGLIARINI, 1997), mixoploidia (CAETANO-PEREIRA et al., 1998), anormalidades na formação do fuso (CONSOLARO et al., 1996), baixa frequência de quiasmas (HAROUN, 1996) e segregação irregular de univalentes (DUJARDIN e HANNA, 1984; PAGLIARINI, 1990).

Tabela 2. Porcentagem de germinação *in vitro* (GIV) dos grãos de pólen de bananeiras diplóides (AA), coletados em diferentes horários e cultivados em meios com pH 5,8 e 7,0.

Horário de Coleta	Genótipos											
	013018-01		042052-04		050012-02		088079-01		089087-01		091087-01	
	5,8	7,0	5,8	7,0	5,8	7,0	5,8	7,0	5,8	7,0	5,8	7,0
8:00 h	46,36 aB	69,41 aA	55,42 aB	78,79 aA	14,99 aB	23,94 aA	31,22 aB	48,50 aA	55,47 aB	90,75 aA	49,44 aB	80,05 aA
10:00 h	37,19 bB	47,84 bA	40,25 bB	53,11 bA	11,21 aB	18,77 aA	20,75 bB	29,45 bA	37,42 bB	62,53 bA	32,77 bB	44,58 bA
12:00 h	29,55 cB	39,13 cA	33,40 cB	44,51 cA	6,56 bB	12,21 bA	15,53 bB	21,98 cA	33,02 bB	49,34 cA	26,91 cB	35,99 cA
14:00 h	22,41 dB	28,84 dA	27,62 dA	32,76 dA	3,66 bA	7,49 cA	10,74 cA	15,39 dA	28,07 cB	40,07 dA	25,59 cB	35,11 cA
16:00 h	15,96 eA	18,99 eA	18,77 eA	22,29 eA	2,95 bA	5,95 cA	10,42 cA	11,64 dA	17,34 dB	25,06 eA	15,35 dA	20,35 dA
CV(%)	10,62											

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Porcentagem de viabilidade polínica (VP) de bananeiras diploides (AA) por meio da coloração com TTC (2,3,5 cloreto-trifeniltetrazólio) a 1%.

Genótipos	8:00 h	10:00 h	12:00 h	14:00 h	16:00 h
013018-01	77,33 bA	67,00 bB	60,33 bB	53,00 aC	41,67 aC
042052-04	82,33 bA	75,00 bA	59,67 bB	49,00 aC	44,00 aC
050012-02	45,00 dA	35,00 dB	27,33 bC	24,67 cC	19,00 cC
088079-01	60,66 cA	52,33 cB	46,00 cB	36,00 bC	32,67 bC
089087-01	91,33 aA	84,00 aA	70,67 aB	58,00 aC	48,67 aD
091087-01	79,67 bA	68,00 bB	55,33 bC	41,00 bD	39,00 bD
CV(%)	7,25				

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

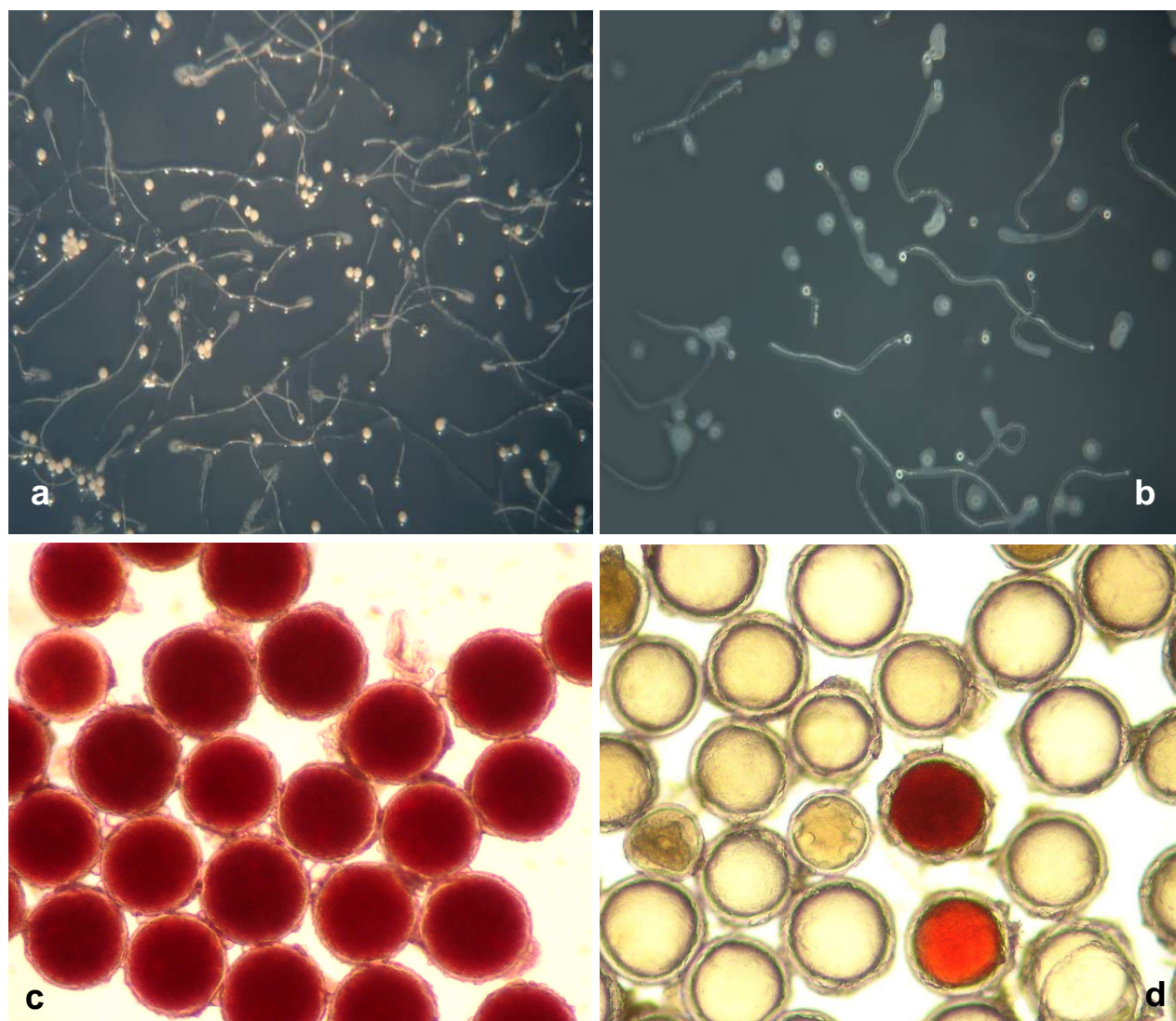


Figura 1. Fotomicrografia dos grãos de pólen de híbridos diploides de bananeira. Germinação dos grãos de pólen do híbrido 089087-01 inoculados em meio com pH 7,0, oriundos de flores coletadas às 8 horas (a) e às 16 horas (b). Viabilidade dos grãos de pólen do genótipo 050012-02, evidenciada pelo corante TTC (2,3,5 cloreto-trifeniltetrazólio), às 8 horas (c) e às 16 horas (d).

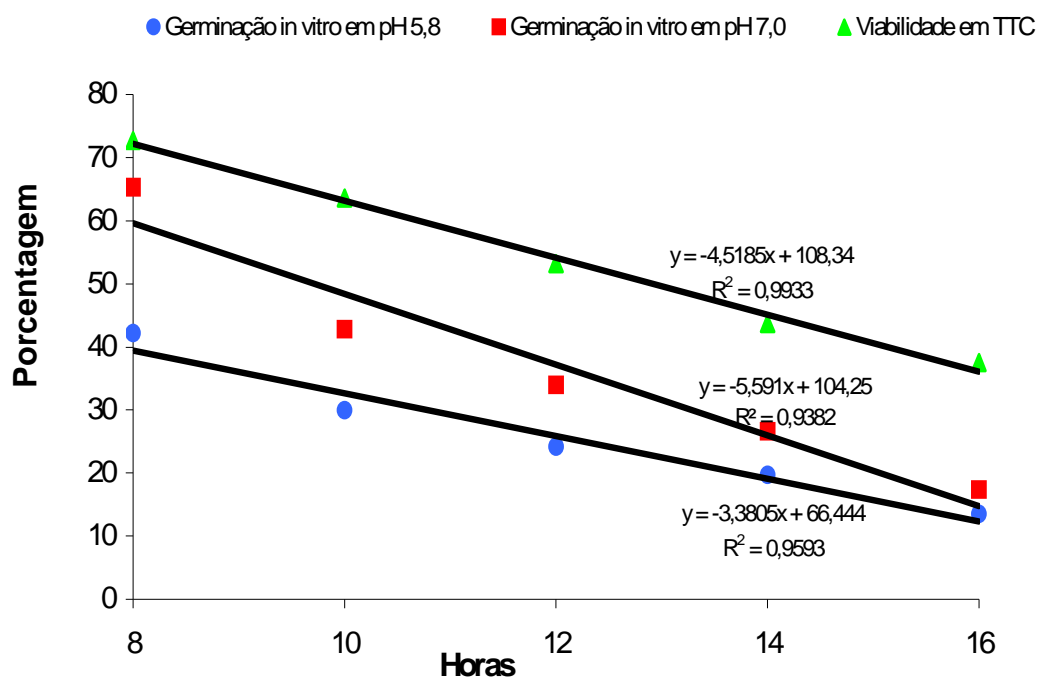


Figura 2. Germinação *in vitro* e viabilidade de grãos de pólen em diplóides melhorados de *Musa acuminata* coletados em diferentes horários.

A germinação do pólen *in vitro* é influenciada por vários fatores, como a espécie, o meio de cultura, a temperatura, o tempo de incubação, o estágio de desenvolvimento das flores quando coletadas e as condições de armazenamento. Bueno e Cavalcante (2002) verificaram que a viabilidade de grãos de pólen de melão sofre uma queda com passar do dia, quando ocorre aumento da temperatura e diminuição da umidade relativa do ar.

A viabilidade dos grãos de pólen pode ser alterada com a variação da umidade e temperatura do ambiente, e pode ser testada por meio da capacidade de germinação, atividade enzimática e presença de citoplasma. Essa variação pode ser própria da espécie, a exemplo de algumas gramíneas que podem apresentar viabilidade de minutos ou horas, enquanto grãos de pólen de outras podem permanecer viáveis por vários anos se armazenados adequadamente (JUDD et al., 1999).

Trabalhos conduzidos por Nunes (2004), com grãos de pólen de flores de atemoieira coletados em diferentes horários, entre 7 horas e 10 horas, e inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose, indicaram que os grãos de pólen coletados às 7 horas e inoculados em meio de cultura com concentração de sacarose de 10%, apresentaram maior percentagem de germinação, com média de 12,25%. Já Nietzsche et al. (2009) avaliando a viabilidade de grãos de pólen de pinheira (*Annona squamosa*) coletados de flores em diferentes horários entre 0 às 7 horas, em intervalos de 1 h, apresentaram a mesma porcentagem de germinação, indicando que a coleta das flores de pinheira, para a polinização artificial, pode ser realizada às 7 horas, sem redução da viabilidade dos grãos de pólen. Os resultados aqui apresentados permitiram verificar que a hora de coleta do pólen interfere no percentual de germinação e viabilidade polínica. Resultados semelhantes foram obtidos em *Solanum sessiliflorum* Dunal (LUZ et al., 2008) e *Passiflora suberosa* (CRUZ et al., 2008).

A maturação do pólen é um dos estádios de desenvolvimento no ciclo de vida das plantas. A germinação do pólen não ocorre dentro da antera, mas o pólen deve estar pronto para germinar logo após deiscência da mesma (LIN e DICKINSON, 1984), desde que encontre condições favoráveis. Portanto, para maior eficiência nas hibridações faz-se o uso de pólen no estágio adequado de coleta.

As porcentagens de germinação *in vitro* e de viabilidade do pólen estão diretamente relacionadas (BOLAT e PIRLAK, 1999; SCORZA e SHERMAN, 1995). Entretanto, há observações de que o método do corante superestima a porcentagem de germinação do pólen, enquanto o teste *in vitro* a subestima (GALETTA, 1983; TECHIO, 2002). Einhardt et al. (2006), após comparação de métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro, concluíram que a utilização da germinação *in vitro* fornece resultados satisfatórios em relação à germinação *in vivo*, e a coloração por carmim propiônico superestima a porcentagem de polens viáveis.

Outra consideração a ser feita é que a germinação *in vitro*, embora forneça um sistema experimental controlado, não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo*, podendo ocorrer interações entre a composição do meio de cultura e os diferentes materiais vegetais. Todavia, é possível concordar com

Mendes (1994), que se refere à técnica de germinação *in vitro* como aquela que apresenta resultados mais próximos aos que, provavelmente, ocorrem *in vivo*.

No presente estudo, foi observado que o momento de coleta de grãos de pólen às 8h, no dia da antese floral, além de apresentar alta viabilidade, pelo teste em TTC, proporciona maior porcentagem de germinação *in vitro*. Portanto, este pode ser considerado o melhor horário de coleta.

CONCLUSÕES

A coleta do pólen às 8h, nas condições de temperatura e umidade em que foi realizado o presente trabalho, proporciona maior porcentagem de germinação e viabilidade dos grãos de pólen, sendo, portanto, o horário mais indicado para a realização de polinização.

O meio de cultura ajustado em pH 7,0 proporciona a maior germinação dos grãos de pólen para a maioria dos genótipos estudados.

O percentual médio de germinação *in vitro* e viabilidade do pólen é influenciado negativamente pelo horário de coleta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLAT, Y.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, v. 23, p. 383-388, 1999.

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

BUENO, D. M; CAVALCANTE, K. L. Estudo da viabilidade dos grãos de pólen de flores de melão (*Cucumis melo* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, Belém. **Anais...** CBF: Belém, 2002.

CAETANO-PEREIRA, C. M.; PAGLIARINI, M. S. Cytomixis in maize microsporocytes. **Cytologia**, v.62, p.351-355, 1997.

CAETANO-PEREIRA, C. M.; TASCHETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S.; BRASIL, E. M. Spontaneous mixoploidy in maize anthers. **Cytologia**, v.63, p.305-309, 1998.

CONSOLARO, M. E.; PAGLIARINI, M. S.; CHAVES, L. J. Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L.) Urban (Umbelliferae). **Cytologia**, v.61, p.375-381, 1996.

CRUZ, T. V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; BELO, G. O. FONSECA, J. W. S. Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p.875-879, 2008.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach** (the practical approach series). New York: University Press, 1992. 250p.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. Microsporogenesis, reproductive behavior, and fertility in five *Pennisetum* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, p.197-201, 1984.

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

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

HAROUN, S. A. Chromosome association and pollen fertility of parental and interespecific hybrids of *Lycopersicon esculentum* X *L. hirsutum* and *L. pennellii*. **Genetica**, v.98, p.103- 106, 1996.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, P. S.; QELLOGG, E. A.; STEVENS, P. S. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Sinauer, 1999. 464 p.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University Press of Colorado. 1993. 579p.

LIN, J. J.; DICKINSON, D. B. Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination. **Plant Physiology**, v.74, p. 746-748, 1984.

LUZ, C. L.; SCHUELTER, A. R.; LUZ, C. L.; DALMASO, A.; VIEIRA, E. S. N.; BARRETO, R. R. Germinação *in vitro* de grãos de pólen e efeito da proteção das plantas na frutificação de cabiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n.4, p.539-545, 2008.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 101-104, 1996.

MENDES, M. S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum* spp.** Pelotas: UFPel, 1994. 75f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

NASCIMENTO, W. M.; TORRES, A. C.; LIMA, L. B. Pollen viability in hybrid seed production off eggplant under tropical conditions. **Acta Horticulturae**, p. 37-39, 2003.

NEVES, T. S.; MACHADO, G. M. E.; OLIVEIRA, R. P. Efeito de diferentes concentrações de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p.207-211, 1997.

NIETSCHE, S.; PEREIRA, M. C. T; OLIVEIRA, C.; DIAS, M. M.; REIS, S. T. Viabilidade dos grãos de pólen de flores de pinheira (*Annona squamosa*) em diferentes horários. **Ciência e Agrotécnologia**, v.33, n. 2, p. 527-531, 2009.

NUNES, C. F. **Polinização artificial e natural de atemóia cultivar “Gefner”, viabilidade do grão de pólen e correlação entre comprimento de flor e número de carpelos.** Janaúba. 2004. 55p. (Monografia de Conclusão de Curso)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2004.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior and pollen fertility in *Aptenia cordifolia* (Aizoaceae). **Caryologia**, v.43, p.157-162, 1990.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics, version 9.1** Cary: SAS Institute, 2004.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding.** New York: John e Sons, p.325-440, 1995.

SILVA, S. O.; SOUZA J. R, M. T.; ALVES, É. J.; SILVEIRA, J. R.S.; LIMA, M. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.8, p.111-118, 2008.

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

SOUZA, P. J. S. **Polinização em maracujazeiro.** In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.) *Maracujá: produção e mercado.* Vitória da Conquista: UESB, p.65-70, 1994.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen biochemistry management.** Springer Verlag, Berlin, 1974, 307p.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp.*** 2002. 104p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

VARA PRASAD, P. V.; CRAUFURD, P. Q.; SUMMERFIELD, R. J. Fruit number in relation to pollen production and viability in Groundnut exposed to short episodes of heat stress. **Annals of Botany**, v. 84, p.381-386, 1999.

CAPÍTULO 2

FERTILIZAÇÃO *IN VIVO* em *Musa* spp.¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Euphytica.

FERTILIZAÇÃO *IN VIVO* em *Musa* spp.

RESUMO: As bananeiras selvagens são diploides enquanto a maioria das variedades comerciais são triploides. As cultivares triploides do subgrupo Cavendish apresentam esterilidade que têm inúmeras causas, mas não se sabe ao certo que barreiras impedem a fertilização dos óvulos. O objetivo do trabalho foi investigar o processo de fertilização *in vivo* da bananeira mediante a comparação do desenvolvimento dos óvulos em genótipos de diploides melhorados (AA) com os óvulos de triploides dos subgrupos Cavendish (AAA) e Prata (AAB) após a polinização *in vivo*. As polinizações foram controladas utilizando-se como genitor masculino o híbrido diplóide (AA) 091087-01, que foi selecionado em função de apresentar alta percentagem de germinação *in vitro* e *in vivo*. Do primeiro e até o vigésimo dia após a polinização foram retiradas amostras de flores para comprovação da fertilização, por meio da medida do diâmetro do óvulo. Verificou-se que os óvulos de diploides aumentaram de tamanho gradualmente, iniciando o processo de formação de sementes, enquanto nos triploides AAA (subgrupo Cavendish) ocorreu o aborto dos óvulos não fertilizados e conseqüente redução no seu tamanho. Nos triploides AAB (subgrupo Prata) alguns óvulos são fertilizados mas o seu tamanho é menor comparado aos diploides.. As flores das cultivares Grande Naine, Nanicão e Pacovan apresentaram uma necrose na região distal do ovário, detectada desde o primeiro dia após a polinização, tanto em plantas que foram polinizadas quanto no controle. Essa região necrosada pode se constituir em uma barreira para o crescimento do tubo polínico em direção ao óvulo, o que provavelmente pode estar relacionada à baixa produção de sementes em Pacovan e à ausência de sementes em cultivares do subgrupo Cavendish.

Palavras-chave: Banana, hibridação, óvulos, melhoramento genético.

***IN VIVO* FERTILIZATION IN *Musa* spp.**

ABSTRACT: The wild bananas are diploids, whereas the majority of commercial varieties are triploids. Triploid cultivars from subgroup Cavendish present sterility due to many causes but is still unknown what kind of pre zygotic barrier prevents the fertilization of ovules. This work aimed to investigate the *in vivo* fertilization of banana by the comparison of ovules development between banana diploids hybrids (AA), triploids from Cavendish subgroup (AAA) and 'Prata' (AAB) after *in vivo* pollination. Controlled pollinations using the pollen of diploid (AA) 091087-01 were performed. This genotype was selected due to the high capacity to germinate *in vivo* and *in vitro* conditions. From the first day until the twentieth day after pollination samples of flowers were collected to confirm the fertilization. The diameter of each ovule was measured and It was observed that the diploid ovules increased in size gradually beginning the seed formation. Moreover in triploid AAB and AAA, there was an increase and decrease in the diameter of the eggs, respectively, with the fruit development and low seed production and sterility. The flowers of Grand Naine, Nanicão and Pacovan cultivars presented a necrosis in the distal region of ovary observed since the first day after pollination in both plants that were pollinated as in control. This necrotic area may constitute a barrier to the growth of pollen tube toward the egg, which can probably be related to low seed production in Pacovan and seedless in Cavendish cultivars.

Key words: Banana, hybridization, ovules, genetic breeding.

INTRODUÇÃO

A bananeira é uma das fruteiras de grande importância social e econômica, sendo cultivada em mais de 120 países e utilizada para consumo in natura ou processada.

Os frutos de bananeira mostram duas vias de desenvolvimento: seminífera ou partenocárpica. As bananeiras silvestres são diploides ($2n = 2x = 22$), seminíferas, geralmente alógamas e apresentam sementes férteis em grande quantidade, das quais dependem para sua dispersão, enquanto as cultivares comerciais são principalmente triploides ($2n = 3x = 33$), com variável grau de partenocarpia e esterilidade, apresentando baixo número ou até mesmo ausência de sementes (SILVA et al., 2002; FORTESCUE e TURNER, 2005a).

As cultivares que apresentam em sua constituição a combinação dos genomas A e B (AAB, ABB) constituem a maioria das bananas produzidas mundialmente, embora o comércio internacional esteja centrado nas cultivares do subgrupo Cavendish (AAA), por causa da palatabilidade e qualidade dos frutos, bem como do alto rendimento (FORTESCUE e TURNER, 2005b). Entretanto, a maioria dessas cultivares apresenta esterilidade feminina, além de serem suscetíveis a certas doenças foliares e pragas que causam sérias perdas de rendimento (SSEBULIBA et al., 2006), sendo necessário o melhoramento genético para geração de novas variedades resistentes e aceitas pelo mercado.

O programa de melhoramento desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura tem como objetivo gerar variedades mais produtivas, com porte e ciclo reduzidos, resistentes ao mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) e às Sigatokas amarela (*Micosphaerella musicola*) e negra (*Micosphaerella fijiensis*), tolerantes aos nematóides (*Rodophilus similis*) e broca (*Cosmopolites sordidus*), mediante cruzamentos entre triploides comerciais e diploides melhorados (SILVA et al., 2001).

Vários fatores exercem uma influência significativa no processo de polinização, a exemplo da eficiência do pólen, que pode estar relacionada à presença de translocações cromossômicas, afetando a sua fertilidade e ou à taxa de crescimento dos tubos polínicos nos ovários das cultivares triploides (SHEPHERD et al., 1987a, 1987b). A época de polinização também exerce grande influência na ploidia das sementes obtidas. Polinizações realizadas na

época de verão seco produzem muitos híbridos com ploidias indesejáveis, a exemplo de hexaplóides e heptaplóides, enquanto que as realizadas em épocas mais frias e úmidas, apesar de apresentar menor rendimento em sementes, resultam em uma maior taxa de recuperação de tetraplóides (SHEPHERD et al., 1994). Outro fator importante e determinante na polinização é a especificidade dos parentais utilizados, havendo uma produção diferenciada em relação à qualidade e quantidade de sementes.

Dessa forma, em cruzamentos que envolvem cultivares do subgrupo Cavendish não se observa a produção de sementes, ao passo que nas cultivares do subgrupo Prata ocorre um número variável de sementes de acordo com o parental utilizado (SILVA et al., 1996). Em polinizações controladas envolvendo banana e plátano, Fortescue e Turner (2005c) verificaram que a produção de sementes é baixa, na ordem de 1-5 sementes por 100 frutos, sendo que cada fruto deve conter no mínimo 300 óvulos. A baixa produção ou ausência de sementes pode estar relacionada à intensa seleção agrônômica, devendo ser, portanto, um reflexo da domesticação da espécie. Este alto nível de infertilidade limita a transferência de alelos desejáveis para as cultivares do subgrupo Cavendish, dificultando o melhoramento pelo método convencional.

Embora sejam relatados na literatura diferentes fatores que podem ser responsáveis pela ausência ou baixa produção de sementes em cultivares de bananeira, existem poucas informações que elucidam quais as barreiras físicas e/ou bioquímicas que limitam ou impedem a produção de sementes. Segundo Fortescue e Turner (2005c), falhas no saco embrionário causadas por desbalanço nos cromossomos contribuem para uma maior esterilidade em bananeiras comestíveis, tanto diploides como triploides.

O objetivo do estudo foi investigar o processo de fertilização *in vivo* da bananeira mediante a comparação do desenvolvimento dos óvulos em diploides melhorados com óvulos de cultivares triploides dos subgrupos Cavendish e Prata.

MATERIAL E MÉTODOS

O sistema reprodutivo do gênero *Musa* foi estudado a partir de experimentos de polinizações manuais cruzadas, realizadas no campo com temperatura variando 25,3°C a 32,5°C e umidade relativa de 84%, segundo dados

meteorológicos fornecidos pela Estação de Meteorologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Foram utilizados indivíduos diploides (AA) e triploides dos subgrupos Cavendish (AAA) e Prata (AAB), listados na Tabela 1. Foram utilizadas cinco plantas diploides e cinco triploides, selecionando-se uma planta de cada nível de ploidia como controle, para avaliar o desenvolvimento dos óvulos na ausência de polinização.

As inflorescências femininas dos diploides melhorados (AA) e dos triploides (AAA e AAB) foram protegidas, com sacos de polietileno um dia antes da antese (abertura floral), para evitar possíveis contaminações por pólen trazido por insetos.

A polinização iniciou-se no dia seguinte à proteção das inflorescências femininas, quando estas se apresentaram receptivas, ou seja, com os lóbulos livres do estigma, encontrando-se, portanto, aptas para a polinização e fecundação. Foram polinizadas uma a duas pencas por dia até a emissão da última penca.

O pólen utilizado foi oriundo das anteras do diplóide melhorado (AA) 091087-01, que foi selecionado em função de apresentar alta percentagem de germinação (SOARES et al., 2008). As flores masculinas foram coletadas na antese e utilizadas para a realização de polinização manual, sendo o pólen distribuído na superfície do estigma. O pólen utilizado foi coletado na antese para garantir o desenvolvimento normal do tubo polínico e um crescimento uniforme, uma vez que os grãos de pólen coletados horas ou dias após a antese (Tangmitcharoen e Owens, 1997) tendem a reduzir a viabilidade. Para isto, utilizou-se, em média, uma flor masculina para cada 3-4 flores femininas, a depender da quantidade de grãos de pólen da planta utilizada.

Após a polinização, os cachos foram devidamente identificados e protegidos com saco de polietileno até a última emissão da penca, para evitar a entrada de formigas e outros insetos que pudessem trazer pólen de outras plantas ou até mesmo retirar o pólen recém distribuído. Amostras de flores foram coletadas diariamente desde o primeiro até o vigésimo dia após a polinização, sendo avaliado o tamanho (diâmetro) do óvulo com auxílio de um estereomicroscópio. A observação dos óvulos foi feita em ocular e lâmina micrométricas, sendo os dados, posteriormente, transformados em milímetros.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 x 20 (ploidia x genótipo x dias após a polinização) sendo composto por três repetições, mensurando-se 30 óvulos/repetição. Utilizou-se a análise de regressão e os modelos matemáticos foram escolhidos segundo equações com melhores ajustes, confirmado pelos maiores valores de coeficiente de determinação (R^2) e o teste F da regressão, ambos a 5% de probabilidade. Em complementação à análise estatística, utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias. Utilizou-se o programa computacional SAS System para Windows, versão 9.1 (SAS, Institute Inc. NC, USA, 2004) para análise dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância observou-se que não houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os genótipos testados dentro de cada grupo genômico, com relação ao desenvolvimento dos óvulos, nos diferentes períodos após a polinização (Tabela 1). Também não houve interação tripla significativa entre os fatores.

Com um dia após a polinização, os valores médios do tamanho dos óvulos variaram de 0,80 mm nos diploides, 0,83 mm nos triplóides AAB e 1,42 mm nos triplóides AAA. Entretanto, à medida que transcorreram os dias após a polinização ocorreu um aumento no tamanho dos óvulos nos diploides e redução dos mesmos nas cultivares triploides (AAA), atingindo em média 1,92 mm e 0,91 mm, respectivamente, vinte dias após a polinização (Tabela 1, ilustrado nas Figuras 1a e 1b). Já nas cultivares do subgrupo Prata (AAB), os óvulos continuaram crescendo até o décimo dia, sendo que a partir desse dia foi observada uma tendência à estabilização no crescimento dos óvulos, sendo que no vigésimo dia apresentaram um tamanho médio de 1,15 mm (Tabela 1, ilustrado nas Figuras 1c e 1d).

Tabela 1. Diâmetro (mm) dos óvulos de genótipos diploides (AA) e triploides (AAA e AAB) aos 1, 10 e 20 dias após a polinização com híbrido diploide melhorado 091087-01.

Genótipos	Diâmetro dos óvulos (mm)			
	Dias após a polinização			
	0	1	10	20
Diploides AA				
003004-02 (Calcutta 4 x Madang)	0,892	0,915	1,518	2,008
042052-05 (M 53 x Kumburgh)	0,701	0,742	1,433	1,667
058054-03 [(Calcutta 4 x Pahang) x (Borneo x Madang)]	0,698	0,750	1,585	1,863
091079-03 [(Boeneo x Guyod) x (Tuu Gia x Calcutta 4)]	0,804	0,815	1,439	1,995
091087-02 [(Boeneo x Guyod) x (Calcutta x Heva)]	0,723	0,768	1,393	2,042
Média	0,7636	0,798	1,473	1,915
CV		22,15		
Triploides AAA				
Grande Naine Magario	1,425	1,436	0,912	0,919
Grande Naine Rossete	1,498	1,505	1,360	*
Grande Naine SC-074	1,314	1,327	0,898	0,898
Nanicão Rossete	1,465	1,478	1,116	0,864
Nanicão SC-063	1,321	1,332	1,237	0,949
Média	1,405	1,415	1,105	0,9075
CV		18,30		
Triploides AAB				
Pacovan	0,875	0,894	1,413	1,436
Prata Anã	0,732	0,749	1,108	0,800
Prata Comum	0,897	0,905	1,228	0,907
Prata Graúda	0,745	0,767	1,377	1,463
Média	0,8122	0,828	1,281	1,151
CV		21,13		

* Génótipo cujo número de pencas no cacho foi insuficiente para avaliação até aos vinte dias após a polinização.

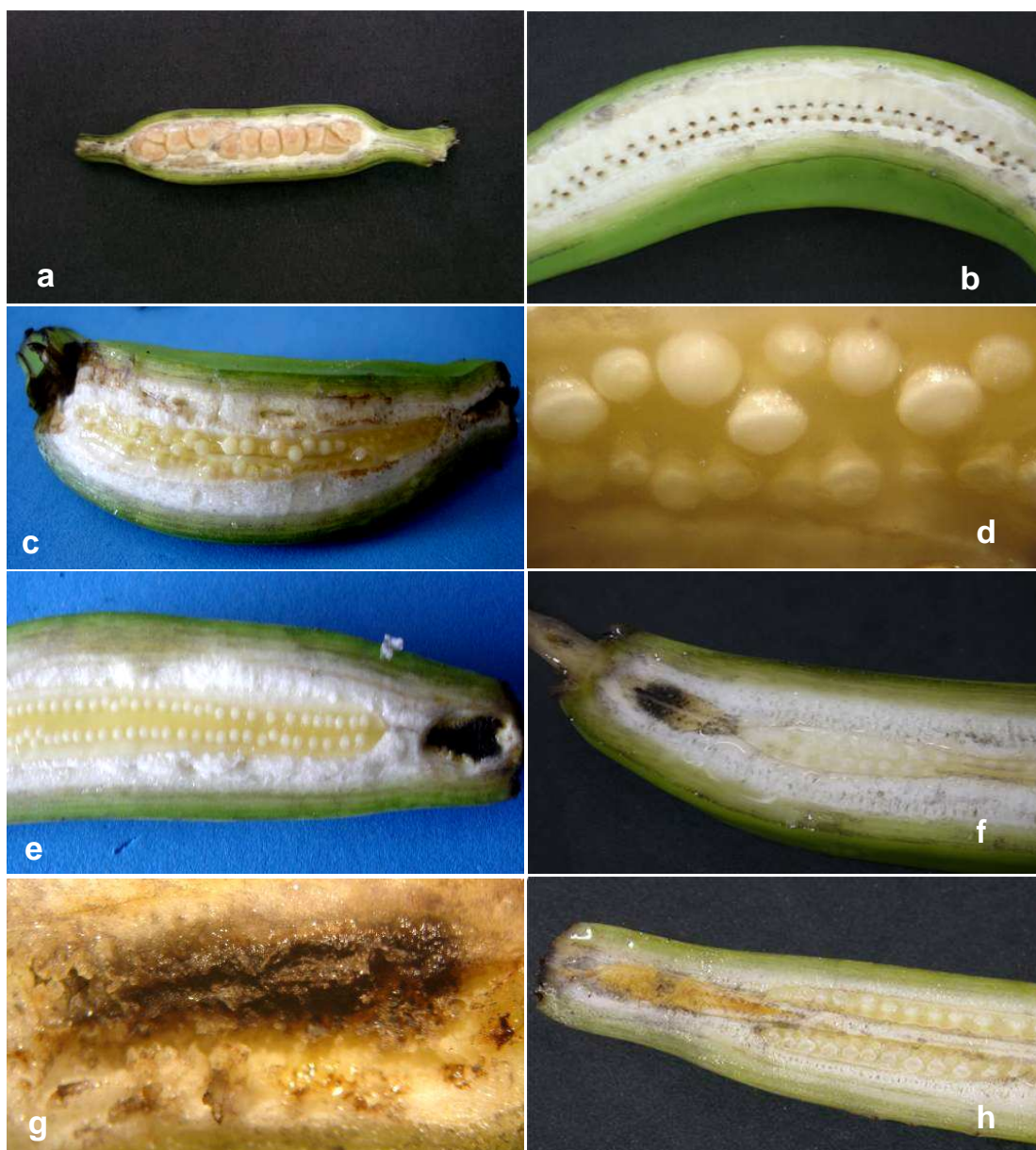


Figura 1. Inflorescência feminina da bananeira após polinização. Desenvolvimento dos óvulos fertilizados 20 dias após a polinização no diplóide 003004-02 (a); na cultivar Nanicão Rossete (b) e na cultivar Pacovan (c-d). Presença de necrose na região distal do ovário dos triploides 'Pacovan' (e) e 'Grande Naine Rossete' (f-g). Diplóide 091087-02, sem necrose na região distal do ovário (h).

Pela análise de regressão, observou-se que o tamanho dos óvulos fertilizados dos diploides (AA) aumentou linearmente ao longo dos dias após a polinização. Resultados similares foram obtidos nas cultivares do subgrupo Prata, que também apresentou aumento linear no tamanho dos óvulos até o décimo dia após a polinização, mantendo-se praticamente constante até o vigésimo dia. Efeito contrário foi observado nas cultivares triploides (AAA), que apresentaram redução no tamanho dos óvulos com o passar dos dias após a polinização (Figura 2), em decorrência do aborto dos óvulos que não foram fertilizados (Figura 1b).

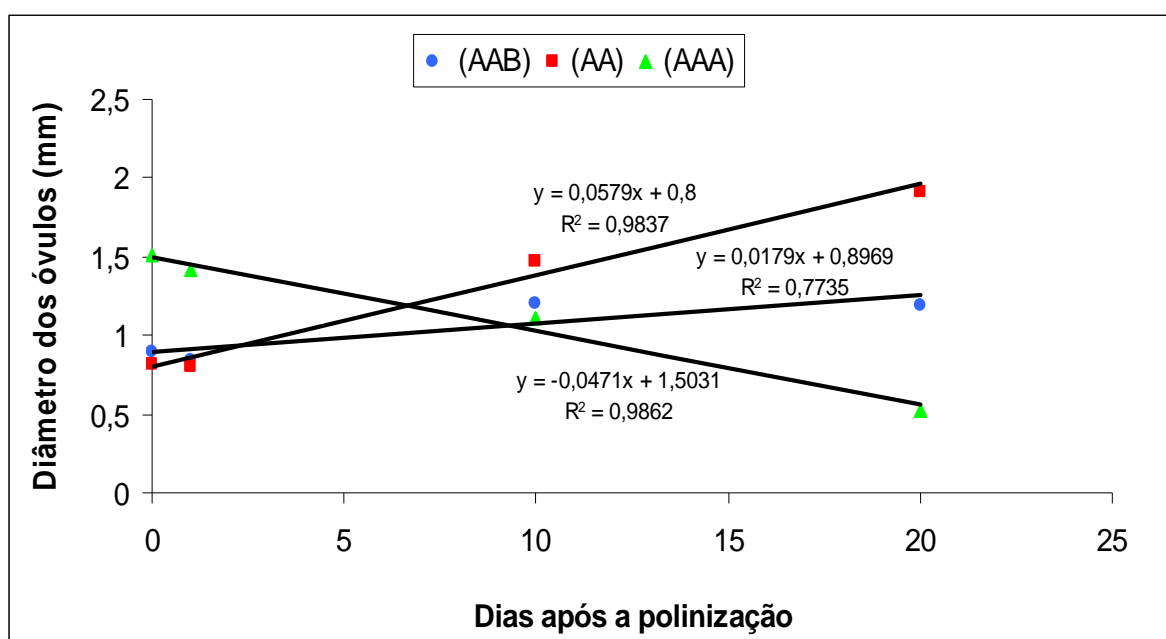


Figura 2. Alterações no diâmetro dos óvulos de bananeiras diploides (AA) e triploides (AAA, AAB), até os vinte dias após a polinização manual.

Durante a avaliação da polinização, observou-se que nos diploides os grãos de pólen depositados sobre o estigma emitiam e desenvolviam mais rapidamente o tubo polínico que os triploides. Cerca de quatro horas após a polinização os grãos de pólen não eram mais visíveis sobre o estigma, indicando completa germinação, enquanto que nos triploides o pólen germinou sobre o estigma, mas aparentemente não penetrou no estilete, indicando a ausência de algum tipo de estímulo para o direcionamento do tubo polínico ou a existência de alguma barreira física. Um dia após a polinização, os estigmas dos diploides se desprenderam do fruto e nos triploides persistiram até o terceiro dia.

Cortes longitudinais da flor feminina evidenciaram a ocorrência de uma necrose atingindo quase a totalidade da região distal do ovário das cultivares triploides (AAA e AAB) (Figura 1e-g), já no primeiro dia após a polinização, tanto em plantas que foram polinizadas quanto no tratamento controle, o que não aconteceu nos diploides (Figura 1h). Estudos preliminares (Soares et al., 2007) indicaram que essa região necrosada pode se constituir em uma barreira para o crescimento do tubo polínico em direção ao óvulo, o que provavelmente pode estar relacionada com a baixa produção de sementes em cultivares do subgrupo Prata e a ausência de sementes em cultivares do subgrupo Cavendish, conforme sugerido por Shepherd et al. (1987a).

Na literatura são relatadas várias causas da esterilidade na bananeira. Simmonds (1959) reportou que a esterilidade em *Musa* seria decorrente de erros meióticos que levariam a falhas no desenvolvimento de sacos embrionários e alterações morfológicas e fisiológicas na estrutura feminina que impediriam o tubo polínico de penetrar no estilete e no ovário. Shepherd et al. (1987a) apontaram que a ausência ou baixa produção de sementes em bananeira seria consequência: a) do crescimento irregular e lento do tubo polínico de algumas variedades; b) da formação de tubos polínicos curtos, que não alcançaram o óvulo; c) da ocorrência de sementes apenas nas primeiras pencas e na porção distal dos frutos de algumas cultivares; e d) do necrosamento prematuro na região do nectário da flor feminina, impedindo a passagem do tubo polínico.

Estudando a anatomia dos óvulos de bananeira, Fortescue e Turner (2005c) observaram que até a antese o desenvolvimento dos óvulos de diploides e triploides foi semelhante, e que após a antese os óvulos dos triploides começaram a murchar, semelhante a óvulos não fertilizados, adquirindo uma coloração amarronzada como se observa no centro dos frutos maduros. Os referidos autores relataram que os óvulos da cultivar Gros Michel (AAA) murcharam em decorrência da degeneração do saco embrionário. Na antese, a maioria dos sacos embrionários de cultivares comestíveis não apresenta membrana nuclear e o conteúdo nuclear encontra-se desorganizado e após a antese o saco embrionário começa a se deteriorar.

Nos diploides estudados, a polinização controlada possibilitou o suprimento adequado de pólen, em termos qualitativos e quantitativos, durante o período de maior receptividade do estigma, garantindo a fertilização e formação

de sementes. Assim, essa operação pode ser realizada rotineiramente e, caso haja necessidade de uma grande produção de sementes, pode-se compensar aumentando o número de polinizações.

É muito comum a presença de barreiras pré-zigóticas resultantes da incompatibilidade pólen-pistilo, onde a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico de uma espécie são inibidos no estigma da outra (Burson e Young, 1983). Em muitos cruzamentos interespecíficos, a reação da incompatibilidade do pólen-pistilo é caracterizada de tal maneira que crescimento do tubo polínico de uma espécie é impedido no estigma das outras. Essa reação pode ser parcialmente inibida pela presença de proteínas, frequentemente liberadas da parede do pólen compatível ou como resultado de interações genéticas desarmônicas em função da divergência genética entre as espécies (HODNETT et al., 2005).

Pesquisas futuras podem ser direcionadas para explorar mais técnicas de polinização *in vivo* que venham superar a incompatibilidade entre os cruzamentos, procurando aumentar a eficiência das polinizações controladas, bem como superar as barreiras pré-zigóticas que ocorrem nas cultivares do subgrupo Cavendish, viabilizando assim, a obtenção de híbridos resistentes aos principais patógenos, produtivos e com frutos de boa qualidade.

CONCLUSÕES

Os óvulos de bananeira diploides AA se desenvolvem normalmente após a polinização, inclusive com a formação de sementes. Por outro lado, nos triploides AAA ocorre o aborto dos óvulos não fertilizados e conseqüente redução no seu tamanho. Nos triploides AAB alguns óvulos são fertilizados mas, o seu tamanho é menor comparado aos diploides.

A ocorrência de uma necrose na região distal do ovário pode estar relacionada com a esterilidade que acontece em variedades do subgrupo Cavendish e a baixa produção de sementes nas cultivares do subgrupo Prata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURSON, B. L. YOUNG, B. A. Pollen-pistil interactions and interspecific-incompatibility among *Panicum antidotale*, *P. coloratum*, and *P. deustum*. **Euphytica**, v. 32, p.397-405, 1983.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. Growth and development of ovules of banana, plantain and enset (Musaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 463-478, 2005 a.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. The occurrence of a micropylar exudate in *Musa* and *Enset* (Musaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 445-461, 2005b.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D. W. The anatomy of ovule ontogeny of banana, plantain and enset (Musaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 479-492, 2005c.

HODNETT, G. L.; BURSON, B. L.; ROONEY, W. L.; DILLON, S. L.; PRICE, H. J. Pollen-pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent *Sorghum* species. **Crop Science**, 45, p. 1403–1409, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics, version 9.1 Cary: SAS Institute, 2004.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Aspects of banana breeding at the Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, Brasil. In: REUNIÃO Internacional Proceedings of ACORBAT VII meeting (GALINDO, J. J.; JARAMILLO, R. eds). CATIE Turrialba, Costa Rica. 78-86p, 1987a.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES E. J. Banana breeding in Brazil. In: PERSLEY, G.; LANGHE, E. (ed.). **Banana and plantain breeding strategies** **ACIAR** proceedings n. 21. ACIAR, Canberra, Austrália, 78-83p,1987b.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; SILVA, S. O. Breeding Prata and Maçã for Brazil. In: JONES, D. R. (ed.). **The improvement and testing of *Musa*: a global partnership**. Montpellier- França: INIBAP, p. 157-168, 1994.

SILVA, S. de O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J.; BORGES, A. L.; FANCELLI, M.; OLIVEIRA, S. L.; ALMEIDA, M. A. **Avanços do programa de pesquisa em *Musa* no CNPMF, Embrapa, Brasil**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1996. 37p. (Embrapa-CNPMF. Documentos, 65).

SILVA, S. O.; SOUZA J. R, M. T.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R. S.; LIMA, M. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. S. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. (Org.). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa: UFV, p. 101-158, 2002.

SIMMONDS, N. W. **Bananas**. London: Longman, 1959, 466p.

SOARES, T. L.; SANTOS-SEREJO J. A.; SOUZA, E. H.; SILVA, S. O. **Fertilização *in vivo* em bananeiras diploides e triploides**. In: Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas. p. 20-20, 2007.

SOARES T. L.; SILVA, S. O.; M. A. P. C. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p.111-118, 2008.

SSEBULIBA, R.; TALENGERA, D.; MAKUMBI, D.; NAMANYA, P.; TENKOUANO, A.; TUSHEMERIRWE, W.; PILLAY, M. Reproductive efficiency and breeding potential of East African highland (*Musa* AAA-EA) bananas. **Field Crops Research**, v. 95, p. 250-255, 2006.

TANGMITCHAROEN, S.; OWENS, J. N. Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **Annals of Botany**, v. 80, p. 401-410, 1997.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE TECIDOS FLORAIS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO DE BANANEIRA¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico African Journal of Biotechnology.

INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE TECIDOS FLORAIS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO DE BANANEIRA

RESUMO: O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos extratos de tecidos florais (estigma e porção distal do ovário) de bananeira 'Grande Naine' (AAA), na percentagem de germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico dos grãos de pólen de bananeira. Grãos de pólen do diplóide melhorado 089087-01 foram inoculados em meio de cultura padrão para bananeira, com adição de dois extratos florais diferentes: stigma e porção distal do ovário, oriundos da inflorescência feminina de 'Grande Naine'. O extrato de cada tecido floral foi diluído no meio nas concentrações de 0%, 1,25%, 2,5%, 5% e 10%. A germinação do pólen e o comprimento do tubo polínico foram maiores no meio de cultura contendo extrato de stigma na concentração de 5%, com valores respectivos de 92,75% e 4,84 mm. Por outro lado, considerando o extrato do ovário, o efeito foi contrário ao obtido com o stigma, já que na concentração de 5% observou-se uma percentagem de grãos de pólen germinados inferior ao obtido no meio controle, com 33,50% e 41,38%, respectivamente. O extrato do tecido floral adicionado ao meio de cultura influencia na germinação de pólen e crescimento do tubo polínico de bananeira.

Palavras-chave: *Musa* spp., tubo polínico, stigma, ovário, melhoramento genético.

**INFLUENCE OF THE FLORAL TISSUE EXTRACTS ON *IN VITRO*
GERMINATION OF POLLEN GRAINS AND POLLEN TUBE GROWTH OF
BANANA**

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the effect of floral extracts (stigma and distal portion of the ovary) of banana 'Grand Naine' (AAA) on the percentage of pollen *in vitro* germination and pollen tube length of banana. Pollen grains from diploid 089087-01 were inoculated into standard culture medium for banana, added to two different botanical extracts: stigma and distal portion of the ovary from the female inflorescence of 'Grand Naine'. Extract of each floral tissue was diluted in the culture medium in the concentrations of 0%, 1,25%, 2,5%, 5% and 10%. The pollen germination and pollen tube length were higher in culture medium containing extracts of stigma in the concentration of 5% with values of 92.75% and 4.84 mm, respectively. The effect of the extract of ovary was unlike to that obtained with the stigma. At concentration of 5% the percentage of germinated pollen grains was lower than the medium control, with 33.50% and 41.38%, respectively. The floral tissue extract added to the culture medium influences pollen germination and pollen tube growth of banana.

Key word: *Musa* spp., pollen tube, stigma, ovary, breeding.

INTRODUÇÃO

A bananeira é uma fruteira tropical de grande importância para a nutrição e geração de renda para milhões de pessoas. A ocorrência de estresses bióticos e abióticos tem afetado a produtividade das principais cultivares. A geração de variedades mais produtivas e resistentes às principais pragas utilizando métodos de melhoramento genético convencional é dificultada porque a maioria das cultivares é triploides ($2n = 3x = 33$ cromossomos) e apresenta diferentes graus de esterilidade. As cultivares de bananeira do subgrupo Cavendish (Grande Naine, Nanica, Nanicão) são atualmente as preferidas no mercado internacional. Embora sejam resistentes ao mal do Panamá, são suscetíveis à Sigatoka negra e ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça Tropical 4 (Foc TR4). Além disso, apresentam alto grau de esterilidade, impedindo o melhoramento genético por hibridação.

A fertilização é o resultado da conclusão bem sucedida de uma série de eventos sequenciais após a polinização. As barreiras que impedem a fertilização são distinguidas em pré e pós-fertilização (pré e pós-zigóticas) e podem ser de natureza física ou fisiológica. A natureza da barreira define o método a ser utilizado para superar uma barreira específica. As barreiras pré-zigóticas impedem a fertilização em um ou mais destes níveis: sobre a superfície do estigma antes da entrada do tubo polínico; no interior dos tecidos do estigma e estilo; e dentro do ovário e saco embrionário. As barreiras pós-zigóticas incluem a geração de embriões híbridos não viáveis, falha no florescimento do híbrido, esterilidade do híbrido, falta de recombinação, entre outras (SHIVANNA, 1997).

Estudos preliminares visando investigar a esterilidade em cultivares do subgrupo Cavendish (Grande Naine, Nanicão e Nanica) mostraram que na antese as flores femininas apresentam um escurecimento (oxidação) na região distal do ovário, o qual poderia ocorrer devido à produção de substâncias que contribuiriam para dificultar a penetração e o crescimento do tubo polínico (Soares et al., 2006).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos extratos florais (estigma e porção distal do ovário) de bananeira 'Grande Naine' (subgrupo Cavendish, grupo genômico AAA), na germinação *in vitro* e crescimento do tubo polínico dos grãos de pólen de bananeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal utilizou-se grãos de pólen do diplóide melhorado 089087-01 (grupo genômico AA), coletados na antese e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura proposto por Soares et al. (2008), com a adição de dois extratos florais diferentes: estigma e porção distal do ovário, oriundos da inflorescência feminina de 'Grande Naine' (grupo genômico AAA), que em estudos preliminares apresentou germinação superficial dos grãos de pólen no estigma e uma região oxidada na parte distal do ovário.

Os extratos foram obtidos após maceração das amostras em nitrogênio líquido. Em seguida, para cada 150 mg foram adicionados 1,5 ml de água. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto e em seguida centrifugadas a 12.500 rpm por 10 minutos. Após essa etapa, os extratos foram esterilizados por filtração e adicionados ao meio de cultura. Foram testados meios sem a adição de extrato (controle) e com a adição de 1,25%; 2,5%, 5% e 10% de cada extrato bruto. Os grãos de pólen foram distribuídos no meio com auxílio de um pincel para promover a distribuição homogênea do pólen. Utilizou-se para cada placa um mix de pólen oriundo de cinco anteras/flor. Após a inoculação, as placas foram mantidas em condições controladas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro, antes de se realizar a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento do tubo polínico 24 e 48 horas, respectivamente, mediante observação em um estereomicroscópio binocular com objetiva 10x.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2 (concentrações do extrato x tipo de tecido floral) com oito repetições, sendo cada uma representada por uma placa de Petri. Para a percentagem de germinação foram contabilizados todos os grãos da placa de Petri e já para o comprimento do tubo polínico foram mensurados 40 tubos polínicos, com auxílio de uma ocular micrométrica, com dados convertidos em milímetros (mm). Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

Os dados de porcentagem foram transformados para $\text{arc sen}(\sqrt{x/100})$ antes da análise estatística, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa computacional SISVAR para análise dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento do pólen diferiu em relação às diferentes concentrações do extrato do estigma e da porção distal do ovário adicionado ao meio de cultura, tanto para a germinação *in vitro* como para o crescimento do tubo polínico (Tabela 1).

O percentual de germinação do pólen (GP) e o comprimento do tubo polínico (CTP) foram maiores no meio de cultura contendo extrato de estigma no fracionamento de 5%, com valores respectivos de 92,75% e 4,84 mm (Figura 1a). Por outro lado, os mais baixos percentuais de GP germinados cultivados neste extrato foram obtidos na concentração de 10%; comportamento semelhante foi observado para a variável comprimento do tubo polínico (Figura 1b).

Considerando o extrato do ovário, o efeito foi contrário ao obtido com o estigma, já que na concentração de 5% observou-se uma percentagem de grãos de pólen germinados (33,50%) inferior à obtida no meio controle (41,38%). Por outro lado, a mais efetiva concentração do extrato de ovário para a germinação do pólen foi obtida na concentração intermediária de 2,5%, com 76,63% de grãos de pólen germinados; para o comprimento do tubo polínico a concentração mais efetiva foi de 10%.

A germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico são fenômenos complexos que envolvem diversos processos morfológicos e fisiológicos. Morfológicamente, na germinação do grão de pólen ocorre a formação de uma protuberância seguida pela projeção do tubo. O crescimento do tubo polínico pode ser de poucos milímetros a quase 100 mm. Na germinação *in vitro*, entretanto, ainda não se tem certeza se o crescimento corresponde ou se aproxima ao que ocorre normalmente no estigma. Fisiologicamente, o tubo polínico requer vários tipos de nutrientes: água, sais inorgânicos, fonte de energia (geralmente fornecido como o açúcar) e um complemento de fatores de crescimento de natureza hormonal ou vitamina. O pólen pode, no entanto, fornecer muitas destas exigências de suas próprias reservas.

A inclusão de substâncias promotoras na germinação de pólen tem sido testada por diversos autores. Takagi et al. (1995), observaram que houve incremento significativo na percentagem de germinação de pólen quando foi adicionado extrato de perianto, pedicelo e de pistilo de *Polygonatum odoratum* ao

meio de cultivo básico. A adição de 100% do exudato do estigma no meio de cultivo estimulou a germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico de *Milla biflora*; já em *Tropaeolum majus* var. Golden Gleam essa concentração inibiu a germinação do pólen (Addicott, 1943). Matsubara e Miki (1992) verificaram que a adição de extrato de diferentes órgãos florais (estigma, pistilo, estilete, ovário e óvulo) ao meio de cultura promoveu a germinação de pólen *in vitro* de rabanete. Em banana, o uso do néctar diluído em água, na proporção de 1:9, teve um efeito positivo na germinação do pólen e crescimento do tubo polínico (NYINE e PILLAY, 2007).

Tabela 1. Percentagem de germinação do pólen (GP) e comprimento do tubo polínico (CTP) em diferentes extratos florais.

Concentração do extrato (%)	GP (%)		CTP (mm)	
	Estigma	Ovário	Estigma	Ovário
0	34,12 bA	41,38 aA	2,83 dA	3,28 bA
1,25	38,88 bA	47,25 cA	3,63 cA	3,43 bA
2,5	86,88 aA	76,63 aB	4,24 bA	3,71 bB
5,0	92,75 aA	33,50 dB	4,84 aA	3,66 bB
10,0	21,88 cB	67,00 bA	2,79 dB	4,70 aA
CV	12,38%		28,99%	

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em estudos preliminares de polinização *in vivo*, envolvendo cruzamentos entre ‘Grande Naine’ e diplóides melhorados, foi observado que os grãos de pólen germinavam sobre o estigma, entretanto, não ocorria a penetração do tubo polínico (dados não apresentados). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o extrato do estigma promoveu a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico em concentrações reduzidas (a 2,5 e 5%). Já com uma concentração de 10% a GP foi reduzida drasticamente (de 92,75% para 21,88%) ocorrendo também diminuição do comprimento do tubo polínico, indicando que algum componente do extrato tenha atingido uma concentração elevada o suficiente para afetar negativamente a germinação do pólen.



Figura 1. Germinação *in vitro* de grãos de pólen do híbrido diplóide de bananeira 089087-01. a) Alta percentagem de germinação em meio de cultura com 5% de extrato do estigma acrescido no meio; b) Baixa percentagem de germinação e comprimento do tubo polínico no meio contendo 10% de concentração desse extrato.

O extrato da porção distal do ovário, que inclui a região oxidada, também promoveu a germinação a 2,5%, mas o crescimento do tubo polínico foi significativamente menor, sugerindo a presença de alguma substância inibitória.

Pode-se, portanto, inferir que em concentrações mais elevadas dos extratos a germinação e crescimento do tubo polínico seriam negativamente influenciados, podendo haver a completa inibição da germinação. Isto corroboraria com os indícios de que os compostos presentes nestes tecidos seriam responsáveis pela inibição da penetração do tubo polínico no estigma e a fertilização do óvulo.

Outra possível explicação seria que a não penetração do tubo polínico no estigma devida a alguma barreira física.

Assim sendo, novos estudos devem ser realizados para identificar as substâncias presentes nos extratos dos órgãos florais estudados.

CONCLUSÕES

Extratos florais (estigma e porção distal do ovário) influenciam a germinação *in vitro* de grãos de pólen de banana. A adição de 5% de extrato de estigma ao meio de cultura favorece a germinação *in vitro* e o crescimento do tubo polínico, enquanto que a concentração de 10% tem um efeito inibitório. Portanto, é possível que em concentrações mais elevadas dos extratos, semelhante ao que ocorre *in vivo*, a germinação do pólen seja inibida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDICOTT, F. T. Pollen germination and pollen tube growth, as influenced by pure growth substances. **Plant Physiology**, v.18, p.270–279, 1943.

MATSUBARA, S.; MIKI, N. Germination promoters of radish pollen cultured *in vitro*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 61, n. 1, p. 79-84, 1992.

NYINE, M.; PILLAY, M. Banana nectar as a medium for testing pollen viability and germination in *Musa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 10, p. 1175-1180, 2007. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>.

SHIVANNA, K. R. **Barriers to hybridization**. In: SHIVANNA, K. R.; SAWHNEY, V.K. (eds). Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press, 1997. p.261-272.

SOARES T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p.111-118, 2008.

SOARES, T. L.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; MORAIS, L. S.; JESUS, O.

N.; SOUZA, E. H.; SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. Fertilização *in vivo* de bananeira. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., Joinville, SC, BRASIL. **Banicultura: um negócio sustentável** - Anais. Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v. 2, p. 326. Resumos.

TAKAGI, H.; IKEGAMI, K.; TAKANO, M.; OGASAWARA, N. Substance promoting germination and tube growth of polygonatum Odoratum pollen. **Acta Horticulturae**, v. 390, 1995.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bananeira (*Musa* spp.) produz um dos frutos mais consumidos no mundo, sendo explorada na maioria dos países tropicais. Cultivada principalmente por pequenos agricultores, possui notável papel sócio-econômico em muitos países, sendo de importância tanto como fonte de alimento como na geração de divisas para os mercados local e internacional.

Em *Musa*, as estratégias utilizadas no melhoramento genético tradicional apresentam limitações, uma vez que a maioria das cultivares utilizada para alimentação é triploide ($2n = 3x = 33$ cromossomos), apresenta diferentes graus de esterilidade e produz frutos por partenocarpia. Embora sejam mencionadas na literatura como possíveis causas da esterilidade a ocorrência de anormalidades na meiose (assinapse, aborto de sacos embrionários, presença de translocações cromossômicas etc.), interações genéticas, condições fisiológicas e ambientais, existem poucas informações sobre as barreiras pré-zigóticas que levam à baixa produção ou mesmo ausência de sementes em bananeira, o que tem dificultado o entendimento dos possíveis processos envolvidos e a definição de estratégias para superá-las.

Para investigar os mecanismos envolvidos na habilidade de dois genótipos se cruzarem foram utilizadas técnicas de biologia reprodutiva, por meio de testes de germinação *in vitro*, fertilização *in vivo* e testes colorimétricos dos grãos de pólen. Os resultados obtidos elucidaram alguns fatores responsáveis pela baixa produção ou ausência de sementes, fornecendo dados sobre o sistema reprodutivo desta espécie. As informações geradas constituem uma importante contribuição para o avanço do melhoramento genético da bananeira.

A determinação do melhor horário para coleta do pólen de diploides melhorados, utilizados como progenitores masculinos, tem uma aplicação prática imediata na rotina de cruzamentos do programa de melhoramento, aumentando a eficiência na obtenção de sementes. Esta informação também servirá de base para futuros estudos visando a conservação do pólen por longos períodos, onde é necessário utilizar o pólen no seu melhor estágio fisiológico.

Os resultados da fertilização *in vivo* evidenciaram diferenças marcantes com relação à eficiência do sistema reprodutivo entre genótipos com diferentes constituições genômicas. Os diploides AA responderam como esperado, ocorrendo o desenvolvimento das sementes após a fertilização. Por outro lado, a esterilidade feminina parcial ou total foi evidenciada nos genótipos AAB e AAA, respectivamente, pela formação de um número reduzido de sementes nas cultivares AAB e aborto de todos os óvulos nas cultivares AAA.

Dois observações importantes durante este processo foram fundamentais para nortear as investigações sobre as possíveis barreiras que dificultam ou impedem a fertilização em cultivares triploides: 1) a germinação do pólen na superfície do estigma das cultivares do subgrupo Cavendish (AAA), onde o tubo polínico se desenvolveu, mas aparentemente não penetrou no estigma, podendo indicar a ocorrência de uma barreira causada por condições fisiológicas ou morfológicas; 2) a presença de uma oxidação na porção distal do ovário, observada nas cultivares triploides (AAB e AAA).

Para testar a hipótese de que a necrose na região distal do ovário estaria envolvida na produção de substâncias que dificultariam a penetração do tubo polínico e fertilização dos óvulos, foram adicionados extratos de tecidos florais (estigma e porção distal do ovário) ao meio de cultura para germinação *in vitro* do pólen. A performance do pólen diferiu em relação às diferentes concentrações do extrato do estigma e da porção distal do ovário adicionado ao meio de cultura, tanto para a germinação *in vitro* como para o crescimento do tubo polínico. A presença de 5% de extrato de estigma adicionado no meio de cultura favorece a germinação *in vitro* e o crescimento do tubo polínico, enquanto que a concentração de 10% tem um efeito inibitório. Estes resultados permitem inferir que a utilização de concentrações mais elevadas dos extratos florais poderá inibir completamente a germinação do pólen.

Estudos futuros sobre a composição dos extratos florais, assim como sobre a morfologia destes tecidos por meio de cortes histológicos poderão elucidar melhor que tipo de barreira ou combinação delas é responsável pela esterilidade parcial ou total em cultivares de bananeira.