



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*: UMA ESTRATÉGIA PARA O
MELHORAMENTO GENÉTICO DE BANANEIRA**

TALIANE LEILA SOARES

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
ABRIL – 2006

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*: UMA ESTRATÉGIA PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DE BANANEIRA

TALIANE LEILA SOARES

Engenheira Agrônoma
Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2006

Dissertação submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2006

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Dra. Ana Cristina Vello Loyola Dantas
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - UFBA

Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Dissertação homologada pelo Colegiado de Curso de Mestrado em Ciências Agrárias em

Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em

FICHA CATALOGRÁFICA

S676 Soares, Taliane Leila.

Fertilização *in vitro*: uma estratégia para o melhoramento genético da bananeira / Taliane Leila Soares. - Cruz das Almas, Ba, 2006.

-81f.: il., tab., graf

Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias e Ambientais. Universidade Federal da Bahia, 2006.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de C. Costa.

1. Banana – fertilização *in vitro*. 2. Banana – melhoramento genético. I. Universidade Federal da Bahia, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais II. Título.

CDD 20.ed. 634.773

A realização deste estudo constituiu em uma estratégia onde momentos de angústias, solidão, mas também compreensão e companheirismo se fizeram presentes. Ao chegar à conclusão, a sensação que tenho, como diria Gandhi, que “a chegada não é nada comparada ao caminho”. E neste caminho permeado de dificuldades e incertezas, muitas pessoas foram fundamentais contribuindo com suas críticas construtivas, apoio e solidariedade. Desta forma, tentarei agradecer a algumas pessoas que contribuíram neste esforço coletivo, porém tenho a convicção de que muitas outras deveriam constar desta lista, sendo impossível citá-las nominalmente, mas a todas ficam registrados meus agradecimentos.

Aos meus pais: Geraldo e Lourdes, pelo apoio incondicional, pelo amor, incentivo e compreensão e oportunidade gerada desde a minha infância.

Aos meus familiares pelo companheirismo, apoio, amor e incentivo.

Ao meu namorado Flávio, pelo amor, apoio, confiança, incentivo e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em todos os momentos de minha vida, principalmente nos mais difíceis e por ter me permitido chegar até aqui.

À minha família, que com carinho e solidariedade estiveram sempre presentes nesta caminhada. Tenho certeza de que não teria chegado até aqui, sem a presença de vocês na minha vida.

Ao Dr. Antônio da Silva Souza, exemplo de competência, dedicação à pesquisa em Cultura de Tecidos. Desde o primeiro momento da acolhida deste projeto, sua sabedoria, amizade, dedicação e interesse permitiram uma aprendizagem ensinamentos fundamentais para a minha formação profissional.

À professora Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, pela orientação, auxílio, amizade, compreensão e flexibilidade para realização desse trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo que acompanhou cada passo desta trajetória, por compartilhar seu saber, pelas críticas, pelo carinho e principalmente pela atenção e amizade.

À Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza, pela amizade, ensinamentos, incentivo, sugestões e orientação em outros trabalhos de pesquisas.

Ao Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, pela co-orientação, apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Ranulfo Correa Caldas, a quem sou grata e tenho maior apreço por ter me dado a oportunidade de estagiar na área de Cultura de Tecidos, na qual já tenho quase 8 anos atuando.

A todos os professores do curso de Graduação que direta ou indiretamente auxiliaram na minha formação acadêmica, em especial ao professor João Albany Costa pela amizade e pelo aprendizado, contribuindo muito para a minha formação profissional.

Aos professores do Curso de Pos-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal da Bahia, pela disponibilidade em fornecer informações, por compartilhar suas concepções, pelas críticas e sugestões proporcionadas.

À *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* pela oportunidade, acolhimento, e desde a Graduação, quando iniciei os trabalhos com a pesquisa

científica, além do apoio institucional, que possibilitou a realização deste curso de Pós-Graduação.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, em especial ao colega Everton Hilo de Souza, pela torcida, incentivo, amizade e valiosa contribuição no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos colegas e funcionários da Equipe de Banana da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho de pesquisa, especialmente aos funcionários "Bizunga" e Sinézio que não mediram esforços para a realização desta pesquisa.

Aos colegas da turma de 1998.1, em especial a Onildo, Ricardo, Silvia, Ana Paula, Rafael, Andréa. Pelo convívio diário e pelo esforço solidário na tentativa de conquistarmos nosso espaço profissional.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal da Bahia.

Aos colegas de turma do Mestrado/2004 (Silvia, Manuel, Rosane, Rossana, Lousane, Daniela, Marly e Djalma) e outros agregados. Valeu a convivência com vocês.

À Cláudia Fortes Ferreira pelo auxílio na tradução dos resumos para o inglês.

À Sidinha pela atenção, eficiência e colaboração que me foi dispensada no decorrer do curso de Mestrado.

Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial a "Tio" pela alegria, afeto e atenção.

A todos que direta ou indiretamente colaboram na realização do presente trabalho, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1	
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM BANANEIRAS DIPLÓIDES.....	23
Capítulo 2	
FERTILIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE BANANEIRA	43
Capítulo 3	
FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE 'GRANDE NAINÉ'.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*: UMA ESTRATÉGIA PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DE BANANEIRA

Autora: Taliane Leila Soares

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

A bananeira é uma das frutíferas de maior importância para o Brasil. Embora as cultivares do tipo Prata sejam as mais produzidas e comercializadas no mercado interno, as cultivares do Subgrupo Cavendish são as mais aceitas no mercado internacional. Este subgrupo inclui as cultivares Nanica, Nanicão e Grande Naine, que são suscetíveis à sigatoka-negra. Uma das maiores limitações do melhoramento genético de Cavendish é a dificuldade de obtenção de sementes em cruzamentos, em decorrência de barreiras físicas e/ou bioquímicas que ocorrem durante o processo de fertilização. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia de fertilização *in vitro* para obtenção de híbridos de bananeira do Subgrupo Cavendish. Inicialmente foram avaliadas a germinação *in vitro* e a viabilidade de grãos de pólen de híbridos diplóides (AA) melhorados, gerados pelo programa de melhoramento genético da bananeira da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*. A percentagem de germinação variou de 2,98 a 90% e o crescimento do tubo polínico de 0,67 a 4,25 mm, quando cultivados em meio com pH 7,0. A maioria dos genótipos apresentou viabilidade de pólen acima de 90%. Os genótipos com maior percentagem de germinação e maior comprimento de pólen foram utilizados nos experimentos de fertilização *in vivo* e *in vitro*. Foram feitas polinizações diárias em vinte plantas diplóides e vinte triplóides, comparando-se o desenvolvimento dos óvulos de ambas ploidias. Observou-se que nos diplóides, os óvulos aumentaram de tamanho a partir do segundo dia após a polinização, enquanto nas cultivares triplóides houve redução de tamanho. Foram testadas várias metodologias de fertilização *in vitro*, mas não se constatou a ocorrência efetiva do processo.

Palavras-chaves: *Musa* spp.; fertilização *in vivo*; biotecnologia.

IN VITRO FERTILIZATION: A STRATEGY FOR BANANA GENETIC BREEDING

Author: Taliane Leila Soares

Advisor: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Banana is one of the most important fruit crops in Brazil. Although Prata type cultivars are the mainly produced and commercialized cultivars in the internal market, the cultivars from the Cavendish subgroup are the most accepted in the international market. The Nanica, Ninicão and Grande Naine cultivars of the Cavendish subgroup are susceptible to black-Sigatoka. One of the great limitations of genetic breeding of Cavendish is the difficulty in the obtainment of seeds in crosses, due to physical and/or biochemical barriers that occur during the fertilization process. The objective of the present study was to develop an *in vitro* methodology of fertilization for the obtainment of banana hybrids from the Cavendish subgroup. The *in vitro* germination and the viability of pollen grains of diploid (AA) hybrids improved through the banana genetic breeding program at Embrapa Cassava and Tropical Fruits, were initially evaluated. The germination percentage varied from 2.98 to 90% and the growth of the pollen tube from 0.67 to 4.25 mm, when cultivated in medium with pH 7.0. Most genotypes presented pollen viability above 90%. The genotypes with greater percentage of germination and longer pollen length were used in the *in vitro* and *in vivo* fertilization experiments. Daily pollinations were carried out in twenty diploid and twenty triploid plants and in both ploidy levels the development of the ovules were evaluated through comparisons. It was observed that in the diploids the ovules increased in volume starting from the second day after pollination, whereas for the triploid cultivars, a smaller reduction in size was observed. Many *in vitro* fertilization methodologies were evaluated but the effective occurrence of the process was not verified.

Key-words: *Musa* spp.; *in vivo* fertilization; biotechnology.

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma das principais frutas consumidas no mundo, podendo ser encontrada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de banana, com uma produção aproximada de 6,5 milhões de toneladas em uma área cultivada de 485 mil ha (FAO, 2005), responsável pelo suprimento do mercado interno. Esta fruta é de crucial importância econômica e social, sendo cultivada principalmente por pequenos produtores de Norte a Sul do país, servindo como fonte contínua de alimento, uma vez que pode ser produzida durante todo o ano, gerando emprego e renda em todos os estados onde é plantada. Em 2005, a Região Nordeste destacou-se como a maior produtora com 36,12% de área cultivada, seguida pela Sudeste com 27,4%, Norte com 21,2%, Sul com 10,1% e a Região Centro-oeste com 5,2% (AGRIANUAL, 2005).

No Estado da Bahia, maior produtor nacional, esta cultura tem sido extremamente importante na redução do êxodo rural, fortalecimento da economia regional, além de contribuir para a criação de novos negócios. Entretanto, a ocorrência de doenças como mal-do-Panamá e Sigatoka amarela tem causado prejuízos à produção de banana tipo 'Maçã' e 'Grande Naine', respectivamente. Além disso, a ocorrência de Sigatoka negra na região Norte do País e sua disseminação para outras regiões produtoras, como São Paulo e Minas Gerais, tem causado apreensão aos bananicultores, pois as cultivares Terra, Maçã e Grande Naine são suscetíveis a esta doença, sendo necessária a obtenção de novas cultivares resistentes.

As perdas de produção causadas pelas pragas citadas podem chegar a 100% a depender da cultivar e/ou condição de cultivo. Mediante a aplicação de tratamentos culturais adequados é possível obter altos rendimentos e frutos de qualidade na presença de Sigatoka o que não ocorre com mal-do-Panamá. Assim, o melhoramento genético é o melhor caminho para tentar resolver os problemas que esta cultura vem enfrentando, por meio do desenvolvimento contínuo de novas cultivares que apresentem resistência/tolerância aos patógenos, além de outras características agronômicas desejáveis.

O programa de melhoramento genético de bananeira iniciado em 1983 na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, mediante cruzamentos de diplóides

(AA) melhorados com triplóides comerciais (AAB), objetiva desenvolver variedades resistentes às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá, com porte e ciclos reduzidos além de produtivas (SILVA et al., 2001).

Dentre as limitações para a obtenção de híbridos de bananeira, estão a baixa produção de pólen dos acessos diplóides, a baixa produção de sementes nos genitores femininos (variedades comerciais ou diplóides) e a ausência total de fecundação de alguns cruzamentos (SILVA et al., 1998).

O número reduzido ou ausência de formação de sementes em algumas espécies ocorre devido a barreiras físicas e bioquímicas, pré-zigóticas e/ou pós-zigóticas, que interferem no processo de fecundação sob condições naturais. Em bananeira, estas barreiras pré-zigóticas podem ocorrer como consequência de: a) crescimento irregular e retardado do tubo polínico; b) baixa taxa de crescimento do pólen de algumas variedades; c) tubos polínicos curtos, que não alcançam o óvulo; d) ocorrência de sementes somente 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 (SHEPHERD et al., 1986). As pós-zigóticas referem-se à incompatibilidade entre o endosperma e o embrião ou a um desenvolvimento lento do endosperma (KANTA, 1960), e à abscisão de flores (RAO, 1965).

A maioria das cultivares comestíveis destinadas ao comércio são principalmente triplóides com variável grau de partenocarpia e esterilidade Fortescue e Turner (2005). As cultivares que apresentam genoma B (AAB, ABB), constituem a maioria das bananas produzidas mundialmente, embora o mercado internacional esteja centrado nas cultivares do subgrupo Cavendish (AAA), por causa do alto rendimento, da palatabilidade e qualidade dos frutos, apesar de serem suscetíveis a certas doenças foliares e pestes que causam sérias perdas de rendimento (SSEBULIBA et al., 2006).

A obtenção de novas cultivares deste subgrupo é dificultada por sua incapacidade de formar sementes, possivelmente em decorrência de barreiras que impedem o processo de fertilização *in vivo*. Uma das alternativas para superar tais barreiras e viabilizar a geração de híbridos deste subgrupo seria a fertilização *in vitro*.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia de fertilização *in vitro*, de bananeira possibilitando a produção de novas cultivares de banana resistentes do subgrupo Cavendish, produtivas e com boa qualidade.

Classificação botânica

A bananeira (*Musa* spp.) pertence à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Lilianae, ordem Zingiberales, família Musaceae (CRONQUIST, 1981; BELALCÁZAR CARVAJAL, 1991). Os gêneros *Ensete* e *Musa* pertencem à subfamília Musoideae, sendo que ao gênero *Musa* pertencem as bananeiras com frutos comestíveis. O gênero *Musa* está subdividido nas seções *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* e *Eumusa*, sendo que as duas primeiras apresentam conteúdo haplóide com 11 cromossomos, e os dois últimos com 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 de interesse econômico (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955; CARVAJAL, 1991).

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). Assim sendo, cada variedade deve conter uma determinada combinação dos genomas completos das espécies parentais.

O genoma B, por exemplo, confere às variedades maior resistência à seca e a doenças, bem como maior valor nutritivo, ao passo que o genoma A confere características organolépticas e atualmente vem sendo enriquecido com híbridos melhorados buscando resistência e produtividade (OSELEBE et al., 2005). Portanto, o conhecimento da ploidia e da constituição genômica dos acessos e de híbridos gerados, é de suma importância para o melhoramento genético da bananeira.

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 diplóides e pendentes a bem arcadas nos triplóides 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, trilobular, 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., 2000).

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. Os estames possuem anteras normais e os sacos polínicos são dispostos ao longo do filamento em duas linhas paralelas (MEDINA, 1985). Pode-se verificar ainda a presença de flores hermafroditas, zona de transição entre as flores femininas e masculinas a exemplo da cultivar Mysore (MOREIRA, 1987). As femininas originam os frutos comerciais, enquanto as masculinas são incapazes de frutificar. Flores hermafroditas podem frutificar, porém os frutos são pequenos, de má formação e sem valor comercial (MORIN, 1967).

As flores são de natureza irregular e se constituem de três grupos de peças florais: perianto, androceu e gineceu, que estão inseridos no ponto de conexão do estilete com o ovário, formando a flor epígina, visto que o ovário é ínfero. O perianto, por apresentar o cálice e corola com mesmo aspecto com relação à forma e cor, recebe a denominação de perigônio e é formado por duas tépalas. A maior, formada por cinco peças acrescidas, alternas, sendo três maiores e duas

menores, apresenta o ápice normalmente dividido em cinco lóbulos, de forma cônica e coloração alaranjada. Em *Musa* spp., o termo perigônio é aplicado a esta tépala composta, que normalmente apresenta coloração creme com manchas violáceas, consequência da presença de antocianina. A tépala menor ocupa uma posição oposta ao perigônio, sendo envolvida por ele. Esta peça forma o verticilo interno e é denominada de tépala livre (SIMMONDS, 1973).

As flores femininas se diferenciam das masculinas, basicamente por apresentarem o ovário mais desenvolvido, alcançando uma altura superior à do perigônio. O estilete é comprido, mas seus estames são reduzidos a estaminódios, não apresentando anteras. O ovário das flores masculinas, mesmo sendo menor, excede o perigônio em altura, embora em menor proporção quando comparado as flores femininas (SIMMONDS, 1973).

O ovário é uma estrutura comprida, estreita, e normalmente curva, com três lados nos dedos externos das pencas e cinco nos centrais. 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 nos plátanos (CASTRO e KLUGE, 1988).

O coração (inflorescência masculina) é formado por brácteas que vão caindo e expondo as flores que secam e caem, formando um eixo denominado de ráquis masculinas onde se notam as cicatrizes florais, denominadas de almofadas (CARVALHO, 1995; DANTAS et al., 1999).

Cada grupo de flores ou pencas está protegido por uma bráctea. As brácteas que protegem as pencas são sempre caducas nos grupos femininos e podem permanecer nos grupos masculinos, a qual denominamos de "rabo sujo", ao passo que plantas de "rabo limpo", são aquelas onde há queda das brácteas (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 da 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.

A semente de banana apresenta forma irregular, freqüentemente achatada, com diâmetro variando de 3 a 6,5 mm. É marron, possui uma membrana escariosa que recobre a casca, que é excessivamente dura permanecendo fixa nos cotilédones. 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 à quase total esterilidade das cultivares triplóides. A maioria dos programas de melhoramento convencional se baseia na obtenção de diplóides melhorados, os quais são utilizados como parentais em cruzamentos com outros diplóides ou alguns triplóides que conservam certa fertilidade feminina (ESCALANT e SANDOVAL, 1992).

O programa de melhoramento genético da bananeira iniciado em 1983 na *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, fundamenta-se principalmente no melhoramento de diplóides (AA), e posterior cruzamento destes com triplóides (AAB), obtendo-se assim, híbridos tetraplóides AAAB. Tem-se como objetivo desenvolver variedades com características agrônômicas desejáveis, como resistência às pragas e nematóides, com porte e ciclos reduzidos, produtivas e de boa qualidade (SILVA et al., 2001).

O baixo número de sementes obtido (como ocorre com as cultivares Maçã, e Terra) ou mesmo ausência de sementes ('Grande Naine'), 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 crescido nos últimos anos, a utilização de várias técnicas com o

propósito de acelerar a obtenção de novas variedades resistentes (SILVA e SANTOS-SEREJO, 2003). Entre elas, o uso de mutações (NOVAK et al., 1990; TULMANN-NETO et al., 1990), engenharia genética (SUNIL et al., 2005; ACERETO-ESCOFFIE, 2005), hibridação somática (MEGIA et al., 1992; MATSUMOTO, 2001), biologia molecular (UDE et al., 2002; CRESTE et al., 2003), seleção *in vitro* de genótipos resistentes ao estresse abiótico (GOMES et al., 2005).

Embora sejam citados na literatura diferentes fatores que constituem barreiras físicas e/ou bioquímicas, pré-zigóticas e/ou pós-zigóticas, que interferem no processo de fecundação sob condições naturais e que podem ser responsáveis pela ausência ou baixa produção de sementes em cultivares de bananeira, ainda não se tem informação de que barreiras específicas ocorrem nas cultivares do subgrupo Cavendish.

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 somente 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 .

Algumas dessas barreiras podem ser superadas pela técnica de fertilização *in vitro*, cujo sucesso depende de fatores como: idade dos explantes, germinação *in vitro* adequada do pólen, crescimento do tubo polínico, entrada do tubo polínico nos óvulos e grau de fertilização (YEUNG et al., 1981).

Germinação de pólen *in vitro* e viabilidade polínica

Dados sobre a viabilidade e o desenvolvimento de grãos de pólen são fundamentais para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético de bananeira, pois permitem maior direcionamento e segurança nos cruzamentos realizados para gerar novos híbridos e/ou aumentar a variabilidade.

Vários estudos têm sido conduzidos a fim de estabelecer e padronizar meios de cultura e condições ambientais para avaliar a viabilidade de pólen em diversas espécies.

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 num meio apropriado e observar em microscópio, depois de determinado período, o número de grãos que produzem tubo polínico (SALLES et al., 2006). A maioria dos tubos polínicos tem seu crescimento *in vitro* interrompido antes de obter o tamanho normalmente alcançado no estigma.

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, freqüentemente, de outros nutrientes para promover a sua 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. 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.

Em muitas espécies o meio de cultura composto de açúcar, ácido bórico e ágar foi suficiente para promover a germinação *in vitro* do grão do pólen. 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.

O cálcio adicionado ao meio de cultura para germinação de grãos de pólen propicia características fisiológicas como tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade 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 (2000) analisando a emissão de tubos polínicos em limoeiro cravo obteve 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 adição de cálcio promoveu a germinação de pólen e o crescimento do tubo polínico em todas as espécies estudadas. Silva et al. (1999) 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).

Para estimar a viabilidade do pólen, quatro métodos podem ser usados: 1) teste de germinação *in vitro*; 2) uso de corantes; 3) germinação *in vivo* pela observação do crescimento do tubo polínico sobre o estigma e o pistilo; e 4)

formação de sementes após a polinização de um gameta feminino selecionado (GALLETTA, 1983). Os métodos em que se utilizam corantes apresentam vantagens quanto à rapidez e facilidade em relação a germinação de pólen *in vitro*, embora superestimem a viabilidade do pólen, já que grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido a presença de enzimas, amido, ou outras substâncias. Os dois últimos métodos todavia, são muito demorados e trabalhosos (GALLETTA, 1983).

O método *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). Além disso, é o método mais utilizado nos programas de melhoramento.

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 (STANLEY e LINSKENS, 1974).

Polinização da bananeira

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 levado.

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 diplóides 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 estígma, 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 e depositando-os em uma feminina que esteja protegida pela bráctea, o que indica que ela deve estar virgem. 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 outros grãos de pólen. 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, e formigas, 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 triplóides esse número geralmente é bastante reduzido, dificilmente ultrapassando cinco sementes por fruto. O baixo número e até mesmo a ausência de sementes obtido nos cruzamentos constitui-se uma das maiores limitações no programa de melhoramento genético da bananeira.

As bananeiras de frutos comestíveis, em geral, 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 e 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. Entre as cultivares do grupo genômico AAA, a 'Gros Michel', por ter o estigma apenas parcialmente atrofiado pode, com relativa facilidade, vir a produzir sementes, pelo que tem sido usada como planta "mãe" nos trabalhos de melhoramento.

Fertilização *in vitro*

Para a reprodução sexuada acontecer nas plantas superiores, faz-se necessário que os grãos de pólen sejam colocados sobre a superfície do estígma, onde germinam, emitindo os tubos polínicos, que crescem através do estilete em direção ao ovário (FAURE et al., 2003). Nos óvulos, cada tubo polínico penetra pela micrópila e ao alcançar o saco embrionário libera os gametas masculinos. Na maioria das plantas superiores ocorre aí a chamada dupla-fertilização, quando um gameta funde-se com a oosfera e forma o zigoto (2n), enquanto que o outro gameta funde-se com os dois núcleos polares formando o endosperma (3n).

Antes de se implantar um experimento de fertilização *in vitro* com determinada espécie é necessário examinar alguns aspectos: a) florescimento; b) germinação e crescimento do pólen sobre os óvulos e desenvolvimento dos tubos polínicos (estes últimos deveriam desenvolver-se normalmente e não se romper ou crescer tardiamente); c) viabilidade dos óvulos; e d) entrada do tubo polínico no receptáculo do embrião (ZENKTELER, 1984).

O melhoramento de plantas por hibridação é dificultado por vários impedimentos: a) fracasso da germinação do pólen sobre o estígma; b) baixo e insuficiente crescimento do tubo polínico, de modo que eles não alcançam o óvulo em tempo e c) abscisão precoce das flores (RAO, 1965).

Vários métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para superar estes obstáculos:

- 1) Polinização estigmática: aplicação do pólen sobre a superfície do estígma;
- 2) Polinização intraovariana aplicação do pólen no ovário excisado;
- 3) Polinização placentária: cultivo de óvulos aderidos a placenta com grãos de pólen depositados ao redor e na superfície dos óvulos;
- 4) Polinização ovular: aplicação do pólen nos óvulos isolados;

As espécies *Petunia axillaris* e *P. hybrida* são auto-incompatíveis. A germinação do pólen dessas espécies é boa sobre os pistilos auto-polinizados, mas, existem barreiras na zona do ovário que impedem que o tubo polínico fertilize o óvulo. Essas barreiras podem ser superadas pela polinização *in vitro*. Em *Petunia axillaris* a incompatibilidade pode também ser superada através polinização dos botões floral *in vivo* (RAZDAN, 2002).

A técnica de polinização intraovariana tem sido aplicada com sucesso em algumas espécies como, *Papaver somniferum*, *P. rhoeas*, *Eschscholtzia californica*, *Argemone mexicana* e *A. ochroleuca*. Outra técnica utilizada para superar as barreiras que impedem o crescimento do tubo polínico é através da polinização direta de óvulos cultivados (polinização ovular *in vitro*). Esta técnica de polinização *in vitro* foi desenvolvida na Universidade de Delhi visando a produção de híbridos entre espécies de Papaveraceae e Solanaceae (MAHESHWARI e KANTA, 1964).

A polinização placentária de óvulos tem sido aplicada com sucesso para superar a auto-incompatibilidade in *Petunia axillaris*, bem como obter haplóides *Mimulus luteus* utilizando o pólen de *Torenia fournieri*. A obtenção de haplóides de *M. luteus* ocorreu partenogeneticamente, que ao contrário não tem sido obtidos através da cultura de anteras. O desenvolvimento partenogenético de haplóides através do cultivo *in vitro* de óvulos polinizados, mas não fertilizados tem sido reportado em respectivas espécies de *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum* e *Triticum aestivum* (RAZDAN, 2002). Estudando a polinização placentária em *Brassicaceae*, Zenkteler (1990) constatou a obtenção de sementes viáveis, tanto na polinização intra quanto interespecífica. Zübkoval e Sladky (1975) objetivando desenvolver sementes por meio da técnica de polinização placentária observaram que a excisão da placenta representou uma intervenção drástica nos órgãos reprodutivos, além disso constataram que o cultivo no meio sintético não forneceu uma nutrição adequada para o desenvolvimento dos óvulos. Dulieu (1966), trabalhando com ovários excisados e cultura de óvulos em *Nicotiana tabacum* L, verificou que a placenta é essencial para o crescimento inicial dos óvulos fertilizados.

Rangaswamy e Shivanna (1971) na tentativa de alcançar a fertilização e superar a auto-incompatibilidade em *Petunia axillares*, não obtiveram sucesso na polinização *in vitro*, em relação aos óvulos cultivados isoladamente ou aderidos à placenta. Para Torres et al. 1998, o sucesso da polinização, fertilização e desenvolvimento da semente *in vitro* tem sido obtido, em geral, quando se usam como fonte de explantes óvulos aderidos à placenta. Segundo o autor, durante a excisão, o explante precisa ser tratado com cuidado para evitar injúrias nos óvulos, uma vez que a remoção da parede do ovário dificulta o desenvolvimento do embrião, em virtude do não fornecimento de compostos orgânicos essenciais

para este órgão. No entanto, para reduzir este efeito, as placentas podem ser cultivadas com uma porção da parede do ovário ou, em certos casos, com uma parte do cálice.

A técnica da fertilização *in vitro* envolve dois grandes processos: a) germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico b) desenvolvimento dos óvulos fertilizados oriundos de sementes maduras com embrião viável. A eficiência da técnica, depende da composição do meio que possa desenvolver ambos processos (BHOJWANI e RAZDAN, 1983).

Para Tilton e Russell (1983), os componentes para otimizar o crescimento dos óvulos cultivados *in vitro* incluem: 1) reguladores de crescimento - IAA, NAA, 2-4D, cinetina e GA₃ (ácido giberélico); 2) elementos como boro (H₃BO₃), cálcio [Ca(NO₃)], potássio (KNO₃) e magnésio (MgSO₄) e 3) caseína hidrolisada.

O mais importante papel do meio de cultura é suportar o desenvolvimento normal dos ovários e óvulos cultivados até a formação de sementes (RAZDAN, 2002). As primeiras informações (MAHESHWARI, 1958) a respeito do cultivo de óvulos em meio nutritivo incluiu os sais de Nitsch's (1951), vitaminas de White (1943) e 5% de sacarose. Vários óvulos isolados de orquídeas, oriundos de ovários polinizados podem crescer satisfatoriamente em meio simples contendo apenas 10% de sacarose, entretanto os óvulos de *zephyranthes* necessitam de água de coco ou ácidos casamino presentes no meio de Nitch's para se desenvolverem (RAZDAN, 2002).

Gengenbach (1977), em trabalhos de fertilização de ovários excisados de milho (*Zea mays* L.) observou com base no aumento do volume dos mesmos após 10 dias de cultivo, que em média 46% dos ovários polinizados *in vitro* foram fertilizados. Esta proporção foi obtida em diferentes formulações do meio de cultura contendo sacarose, KNO₃, NH₄NO₃, L-glutamina e L-asparigina, solidificado com 0,8% de ágar. Em *Nicotiana rustica*, Rao (1965) observou que os ovários cultivados em meio Nitch's contendo 4% de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar, começaram a aumentar de volume quatro a cinco dias após a polinização, além disso ocorreu uma elevada germinação dos grãos de pólen e dissecação dos pistilos três dias após o cultivo *in vitro* e só aos setenta dias após a polinização os ovários continham óvulos bastantes desenvolvidos com pró-embrião globular.

Possibilidades de produzir novas combinações entre plantas são limitadas devido às barreiras que ocorrem durante o processo de polinização *in vivo*. Para tanto, a polinização e a fertilização sob condições *in vitro* se constitui uma interessante estratégia para produção de híbridos entre plantas que não podem cruzar-se por métodos convencionais (RAZDAN, 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERETO-ESCOFFIE, P. O. M. et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. “Grand Nain” scapls by vacuum infiltration, **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 359–371, 2005.

AGRIANUAL. **Banana**. São Paulo: FNP. Consultoria & Agroinformativos, 2005. p.220-229.

BELALCÁZAR CARVAJAL, S. L. El cultivo del plátano en trópico. Cali, Colombia: ICA, 1991. 375p.(ICA. Manual de Assistência Técnica, 50).

BALOGH, M. J. et al. Impact of concentrations on *in vitro* pollen germination of Okra, *Hibiscus esculentus*. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 402-403, 2001.

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

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. *In vitro* pollination. In: BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. (Ed.). **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.181-235, 1983. (Developments in crop sicence, 5).

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

BOMBENC, D. et al. 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**, v.50, n.9, p. 859-865, 1963.

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.

CARVAJAL, S. L. B.; 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, 1991.

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

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.

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.

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-CNPMF, 1999. p. 47-60.

DULIEU, H. L. Pollination of ovaries and culture of ovules of *Nicotiana tabacum* L. **Phytomorphology**, New Delhi. v. 16, p. 69-75, Mar.1966.

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

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. 2005.

FAURE, J. E. et al. Double fertilization in maize: the two male gametes from a pollen grain have the ability to fuse with egg cells. **The Plant Journal**, v. 33, p. 1051-1062, 2003.

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.

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

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

GENGENBACH, B.G. Development of maize caryopses resulting from in-vitro pollination. **Planta**: Berlin, v. 134, p. 91-93, 1977.

GOMES, E. W. F. et al. Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp.) submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 171-177, 2005.

GWATA, E. T. et al. 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.

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.

KANTA, K. Intra-ovarian pollination in *Papaver rhoeas* L. **Nature**, v. 188, n. 4751, p. 683-684, 1960.

KRISHNAKUMAR, M. P.; VALSALAKUMARI, P. K.; ARAVINDAKSHAN, M. Pollen production, fertility and viability in different nodes of the banana cultivars. **Agric. Res. Kerala**, v. 30, p. 53-57, 1992.

LUSH, W. M.; SPURCK, T.; JOOSTEN, R. Pollen tube guidance by pistil of a Solanaceous plant. **Annals of Botany**, v. 85, p. 39-47, 2000.

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.

MAHESHWARI, N. *In vitro* culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. **Science**, v. 127, p. 342, 1958.

MAHESHWARI, P.; KANTA, K. Control of fertilization. In: Linskens, H. F. (Ed.). **Pollen physiology and fertilization**. Elsevier, Amsterdam, p. 187-193, 1964.

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. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 26-28, maio/junho, 2001.

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

MEGIA, R. et al. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 41-44, 1993.

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

MORIN, C. **Cultivo de frutales tropicais**. Lima, Librerias ABC S.A. 4448p., 1967.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol Plant**, v.15, p. 473-497, 1962.

NITCH, J. P. Growth and development *in vitro* of excised ovaries. **American Journal Botany**, v. 38, p. 566-577, 1951.

NOVAK, F. J. et al. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* culture shoots-tips of banana and plantain (*Musa*, cvs). **Tropical Agriculture**, v. 67, n. 1, p. 21-27, 1990.

NUNES, J. C. O. et al. 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.

NYOMORA, M.S. et al. 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. de et al. **Efeito do cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'**. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 2000, Curitiba, **Abstract...** Curitiba: SBF, 2000, p.419.

OSELEBE, H. O. et al. Ploidy and genome segregation in *Musa* Breeding populations assessed by flow cytometry random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 30, não paginado, 2005.

PARTON, E. et al. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, v. 125, p. 155-161, 2002.

PFAHLER, P. L. et al. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth. **Theor Appl Genetic**, v. 95, p. 1218-1222, 1997.

RAO, P. S. The *in vitro* fertilization and seed formation in *Nicotiana rustica* L. **Pirton**, v. 22, n. 2, p. 165-167, 1965.

RANGASWAMY, N. S.; SHIVANNA, K. R. Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris*. III. Two-site pollinations *in vitro*. **Phytomorphology**, v.21, p.284-289, Dec. 1971.

RAZDAN, M. K. *In vitro* pollination and fertilization. In: **Introduction to plant tissue culture**. Science Publishers, USA, 2002, 375p.

SAHAR, N.; SPIEGEL-ROY, P. *Citrus* pollen storage. **HortScience**, v.15, n.1, p.81-82, 1980.

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

SALLES, L. A. et al. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciênc. Agrotec**, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

SILVA, S. S. et al. Melhoramento genético de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.693-703, 1998.

SILVA, M. M. et al. 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, 1999.

SILVA, S. O. et al. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, p. 399-436, 2001.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J.A. Melhoramento da bananeira para resistência: resultados obtidos pelo melhoramento convencional. In: V SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A BANANICULTURA E I WORKSHOP DO GENOMA *MUSA*, 2003, Paracatu-MG. **Anais.....**, 2003, p.147-155.

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.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Banana breeding in Brasil. In: PERSLEY, G. J. DE LANGHE3, E. A. (ed.). **Banana and plantain breeding strategics**; proceedings of na international wokshop led of cairns. Austrália: ACIAR, p.78-83, 1986.

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

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 and management.** Springer-Verlag, Berlin, 307p. 1974.

SUNIL, G. B. et al. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants, **Planta**, v. 222, p. 484-493, 2005.

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. **Annual Reviews Inc** v. 48, p. 461-91, 1997.

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. **American Society of Horticulture Science**, v. 56, p. 227-230, 1950.

TILTON, V. R.; RUSSEL, S. H. *In vitro* pollination and fertilization of soybean *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae). In: MULCAHY, D. L.; OTTAVIANO, E. (Ed.). **Pollen: biology and implications for plant breeding.** New York: Elsevier Science Publishing, p. 281-286, 1983.

TORRES, C. A. et al.. Polinização e fertilização *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, v. 1, parte 2, p. 335-369, 1998.

TUINSTRAN, 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.; ANDO, A. Indução e uso de mutantes *in vitro*. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. (Eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990. p. 341-378.

UDE, G. et al. Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* using AFLP markers. **Theor Appl Genet**, n. 104, p. 1239–1245, 2002.

YEUNG, E. C.; THORPE, T. A.; JENSEN, C. J. *In vitro* fertilization and embryo culture. In: THORPE, T. A. (ed). **Plant tissue culture**: methods and applications in agriculture. New York: Academic Press, p. 253-271, 1981.

WHITE, P. R. A **handbook of plant tissue culture**. Lancaster, Pennsylvania: Costel e Co, 1943. 273p.

ZŮBKOVÁ, M.; SLADKÝ, Z. The possibility of obtaining seeds following placental pollination *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 17, n. 4, p. 276-280, 1975.

ZENKTELER, M. *In vitro* pollination and fertilization. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants; laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, p. 269-275, 1984.

ZENKTELER M. *In vitro* fertilisation and wide hybridization in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 9, p. 267-279, 1990.

CAPÍTULO 1

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM BANANEIRAS DIPLÓIDES¹

¹Artigo ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Crop Breeding and Applied Biotechnology

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM BANANEIRAS DIPLÓIDES

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH na germinação *in vitro* e a viabilidade de grãos de pólen de bananeiras diplóides (AA), geradas pelo programa de melhoramento da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*. Os grãos de pólen foram inoculados em meio de cultura contendo 15% de sacarose, 0,01% H_3BO_3 , 0,01% de KNO_3 , 0,03% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, solidificado com 0,8% de ágar, e pH ajustado para 5,8 ou 7,0. A viabilidade do pólen foi avaliada pela coloração com carmim acético a 1%. As mais altas percentagens de germinação foram obtidas nos genótipos 9187-01 (90,0%) e M-53 (89,7%), em meio com pH 7,0. Entretanto, o comprimento do tubo polínico do genótipo 9187-01 foi aproximadamente duas vezes menor (1,79 mm), quando comparado ao M-53 (3,84 mm). A viabilidade do pólen nos genótipos avaliados foi superior a 85%, mesmo para os diplóides que apresentaram baixa percentagem de germinação *in vitro*.

Palavras-chave: Diplóides melhorados, melhoramento genético, tubo polínico, meio de cultura.

IN VITRO GERMINATION AND VIABILITY OF POLLEN GRAINS IN BANANA DIPLOIDS

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the influence of pH in the in vitro germination and the viability of pollen grains of banana diploids resistant to black-Sigatoka generated by the breeding program at Embrapa Cassava and Tropical Fruits. The pollen grains were inoculated in culture medium containing 15% sucrose, 0.01% H_3BO_3 , 0.01% KNO_3 , 0.03% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, solidified with 0.8% agar and pH adjusted to 5.8 or 7.0. Pollen viability was evaluated by the coloration with 1% acetic carmine. The highest percentages of germination were obtained for the 9187-01 (90.0%) and M-53 (89.7%) genotypes in medium with pH 7.0. However, the length of the pollen tube of the 9187-01 genotype was approximately two times smaller (1.79mm), when compared to the M-53 (3.84mm) genotype. The pollen viability for the genotypes evaluated was superior to 85%, even for the diploids that presented low percentage of in vitro germination.

Key-words: Breeding diploids, genetic breeding, pollen tube, culture medium.

INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa spp.*) produz um dos frutos mais consumidos no mundo, sendo explorada na maioria dos países tropicais. Cultivada quase exclusivamente 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 o mercado local e internacional.

Em um programa de melhoramento genético, o conhecimento da viabilidade do pólen constitui um dos fatores importantes, especialmente quando se pretende utilizar a técnica de hibridação artificial, uma vez que a relação entre o pólen e o estigma depende da viabilidade dos grãos, da receptividade estigmática e das interações genéticas entre as partes. Em bananeira, estudos sobre a germinação de grãos de pólen *in vitro* auxiliarão a identificar os gametas masculinos com alta viabilidade para serem usados em programas de hibridação (KRISHNAKUMAR et al., 1992).

A germinação *in vitro* além de determinar a fertilidade do pólen, vem sendo utilizada em estudos citogenéticos, fisiológicos e bioquímicos envolvendo muitas espécies vegetais, por se tratar de um teste consistente e seguro. Assim, o conhecimento da capacidade de germinação do pólen e do crescimento do tubo polínico, como também dados sobre a viabilidade são fundamentais para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético de algumas frutíferas, pois permitem maior segurança nos cruzamentos (MARCELLÁN e CAMADRO 1996; DANE et al., 2004; SALLES et al., 2006).

A baixa percentagem de germinação e o lento crescimento do tubo polínico podem afetar a formação de sementes nas plantas. Buyukkartal (2003), constatou que estudos sobre a germinação de pólen *in vitro* e crescimento do tubo polínico são muito úteis para explicar a ausência da fertilidade.

Vários fatores que influenciam na germinação *in vitro* de pólen entre eles citam-se a espécie botânica, estado nutricional das plantas, o meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação, o horário de coleta, o estágio de desenvolvimento da flor quando da coleta do pólen, fotoperíodo, método de coleta, aplicação de agrotóxicos nas plantas, além das condições de armazenamento do pólen (STANLEY e LINSKENS 1974; NEVES et al. 1997).

Diferentes meios de cultura para a germinação *in vitro* de grãos de pólen

têm sido relatados para um grande número de espécies, com considerável variação entre e dentro de espécies (PFAHLER et al., 1997). A maioria dos trabalhos evidenciam a utilização de carboidratos e substâncias estimulantes da germinação (micronutrientes e hormônios) como os principais componentes do meio de cultura. Muitas substâncias orgânicas e inorgânicas como, sacarose, ácido bórico (H_3BO_3), nitrato de cálcio [$Ca(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$], nitrato de potássio (KNO_3) e sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) exercem efeito na germinação *in vitro* do pólen (PARTON et al., 2002; KOPP et al., 2002; MOUTINHO et al., 2001; BHATTACHARYA e MANDAL 2000; SILVA et al., 1999; GALLETTA, 1983). Outro fator que deve ser considerado é o pH, que também afeta a germinação do pólen (PIO et al., 2004).

Para se obter estimativas confiáveis de viabilidade do pólen, é necessário dispor de um meio de cultura que possibilite a expressão do seu potencial fisiológico para a formação do tubo polínico. Geralmente, as plantas frutíferas requerem somente água e sacarose como fonte para a germinação de pólen, no entanto, algumas espécies necessitam de um meio mais completo, como é o caso da bananeira cujo grão de pólen mesmo estando em estágio fisiológico adequado, requer uma combinação de substâncias para a sua germinação e crescimento do tubo polínico.

A manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos determina a integridade do pólen. Supõe-se que tal equilíbrio possa ser determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações de substâncias como ácido bórico e nitrato de cálcio, de forma que o excesso ou deficiência de qualquer um desses componentes poderá promover o rompimento dos grãos de pólen (SILVA et al., 1999).

Em condições laboratoriais, a viabilidade pode ser quantificada em meios que favoreçam o desenvolvimento do tubo polínico ou mediante uso de corantes como carmim acético, carmim propiônico, azul de anilina, corante de Alexandre, IKI (iôdo + iodeto de potássio), FDA (diacetato de fluoresceína), NBT (p-nitro blue tetrazolium) e TTC (2,2,5 - triphenyl tetrazolium chloride) (BOLAT e PIRLAK, 1999; WANG et al., 2004).

Os testes com corantes tem a vantagem como indicadores de viabilidade polínica, por serem mais rápidos e mais fáceis do que os ensaios com a germinação do pólen *in vitro*. No entanto, a utilização de diferentes tipos de

corantes podem produzir resultados distintos. Por outro lado, a real quantidade de pólen viável só é determinada com o teste de germinação *in vitro* (BOLAT e PIRLAK, 1999), desde que as condições de cultivo sejam adequadas, de modo a permitir a expressão do seu potencial fisiológico para a formação do tubo polínico.

Os diplóides do grupo genômico AA (*Musa acuminata*) são usados no melhoramento de bananeira para cruzamentos com triplóides (cultivares AAB) para geração de tetraplóides AAAB, que apresentam qualidade de fruto, produtividade e resistência à doença (SILVA et al., 2001). Entretanto, pouca informação existe sobre a viabilidade do pólen desses materiais.

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito de diferentes pHs sobre a germinação de grãos de pólen *in vitro* e o crescimento do tubo polínico, bem como examinar a viabilidade do pólen de bananeiras diplóides (AA).

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação dos grãos de pólen *in vitro*

Para a germinação do pólen *in vitro* foram coletadas flores em antese de híbridos diplóides listado na Tabela 1, no período de março a outubro de 2005, às 8:00 horas da manhã. Os grãos de pólen foram retirados de dez anteras/genótipo, com auxílio de um bisturi e, sem qualquer processo de desinfestação, foram inoculados placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 40 mL de meio de cultura, sendo distribuídos com auxílio de pincel, de modo a promover uma distribuição homogênea do material. As placas foram subdivididas em quadrantes, cada uma representando uma repetição com aproximadamente 300-350 grãos de pólen, totalizando 12 repetições para cada pH estudado (5,8 e 7,0).

Com base nos resultados preliminares de estudos desenvolvidos sobre a germinação *in vitro* do pólen de bananeira, decidiu-se utilizar exclusivamente o meio de cultura que apresentou melhor resultado na germinação dos grãos de pólen, contendo 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 e 7,0 e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

As placas foram mantidas em condições controladas de temperatura de

27±1°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 após a inoculação em meio de cultura, respectivamente, mediante observação em um estereomicroscópio na magnitude de 6x. O comprimento do tubo polínico foi medido em micrômetro, utilizando-se ocular e lâmina micrométrica, e os dados foram transformados em milímetros. Para a percentagem de germinação foram contabilizados todos os grãos da placa. Enquanto que, para o comprimento do tubo polínico foram selecionados aleatoriamente e mensurados 40 tubos polínicos para cada placa de Petri, totalizando 120 medições para cada genótipo/pH estudado. Os grãos de pólen foram considerados germinados quando o comprimento do tubo polínico foi igual ou maior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 20 x 2 (genótipo x pH) com 12 repetições. Para atendimento das pressuposições da análise de variância, os dados foram transformados para arc sen ($\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos a análise de variância e utilizou-se o teste de agrupamento Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade através do programa SAS (2000).

Viabilidade do pólen

Para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen a inflorescência masculina foi protegida com saco de polietileno no dia anterior à coleta, para evitar possíveis contaminações com pólen trazido por insetos. No dia seguinte pela manhã, foi retirada no campo uma bráctea com as flores em antese para cada genótipo. Os grãos de pólen foram retirados de anteras dos diplóides testados *in vitro* e sobre uma lâmina de vidro foram contrastados com uma gota de carmim acético a 1%, cobrindo-se com uma lamínula, e observados ao microscópio ótico com objetiva (10x). Foram analisadas três anteras por genótipo, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina. Estimou-se o percentual de fertilidade do pólen que representou a proporção entre o número de grãos de pólen corados (viáveis) e não corados ou com citoplasma retraído (não viáveis). O estudo foi conduzido em

delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada genótipo.

Os valores obtidos em relação ao número de pólen viáveis foram transformados para arc sen ($\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística e analisados pelo programa SAS (2000). As médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os diplóides melhorados, houve a formação de diferentes agrupamentos pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, na resposta dos genótipos avaliados com relação à germinação do pólen nos níveis de pH testados, tanto para a percentagem de germinação como comprimento do tubo polínico (Tabela 1).

Houve diferenças significativas na resposta em relação ao pH, sendo que o meio de cultura ajustado para 7,0, proporcionou em média melhor germinação do pólen (19,6 %), assim como maior comprimento do tubo polínico (1,81 mm), em relação ao pH 5,8 (16,4 % e 1,62 mm, respectivamente) (Tabela 1). As mais altas percentagens de germinação foram obtidas pelo diplóide 9187-01 (90,0%), quando os grãos de pólen foram cultivados em meio com pH ajustado para 7,0 (Figura 1a), embora não diferiu estatisticamente do diplóide M-53 (89,7%), Entretanto, para a variável comprimento do tubo polínico, o genótipo 9187-01 foi aproximadamente duas vezes menor (1,79 mm), quando comparado ao M-53 (3,84 mm). O genótipo 8987-01 foi o único que apresentou melhor germinação em pH 5,8 que no pH 7,0, mas ainda assim os valores foram quase que a metade quando comparados aos diplóides 9187-01 e M-53 e crescimento intermediário em pH 7,0 do tubo polínico (Figura 1b). A mais baixa percentagem de germinação, assim como o menor comprimento do tubo polínico foi observado no genótipo 4279-13, com 1,81% e 0,64 mm, respectivamente, no pH 5,8. Embora as avaliações tenham sido realizadas 24 horas após a inoculação no meio de cultura, os grãos de pólen de alguns genótipos começaram a germinar uma hora após a inoculação no meio de cultura, emitindo tubo polínico com comprimento correspondendo a aproximadamente quatro vezes o diâmetro do grão de pólen de bananeira (0,3 mm).

Tabela 1. Germinação de pólen, comprimento do tubo polínico e viabilidade dos grãos de pólen de diferentes híbridos de diplóides de bananeira (AA).

Genótipos	Germinação de pólen (%)		Comprimento do tubo polínico (mm)		Viabilidade (%)
	pH 5,8	pH 7,0	pH 5,8	pH 7,0	
9187-01	81,75 ± 4,33Ba	90,00 ± 6,37Aa	1,91 ± 0,60Ac	1,79 ± 0,40Af	97,66a
M-53	80,08 ± 6,22Bb	89,66 ± 4,00Aa	3,19 ± 1,31Ba	3,84 ± 1,45Ab	98,33a
8987-01	42,03 ± 10,0Ac	33,33 ± 7,82Bb	3,09 ± 1,08Aa	2,19 ± 1,16Bd	87,33b
4154-08	21,00 ± 5,88Bd	30,08 ± 8,29Ab	3,19 ± 1,52Ba	4,25 ± 3,77Aa	93,00a
4285-02	13,94 ± 4,83Be	15,39 ± 5,59Ac	2,65 ± 1,03Ab	2,65 ± 1,07Ac	94,66a
7341-03	13,87 ± 2,59Ae	17,30 ± 3,26Ac	0,85 ± 1,38Ae	0,79 ± 0,94Ag	95,66a
87A79-01	10,75 ± 5,24Ae	12,07 ± 3,07Ad	2,16 ± 0,62Bc	2,47 ± 1,09Ac	96,66a
5854-03	9,55 ± 4,46Af	9,28 ± 3,75Ae	2,07 ± 0,87Ac	1,91 ± 1,00Ae	90,00b
SH3263	8,90 ± 2,66Af	12,70 ± 3,97Ad	1,12 ± 1,07Bd	1,52 ± 1,13Af	93,33a
5012-02	8,26 ± 2,55Af	8,17 ± 3,71Ae	2,14 ± 0,91Ac	1,90 ± 1,03Ae	92,33a
4279-06	7,63 ± 3,32Af	8,82 ± 2,88Ae	1,24 ± 1,18Ad	0,82 ± 1,03Bg	88,33b
9187-02	7,10 ± 2,19Bf	12,47 ± 3,28Ad	1,02 ± 0,83Bd	2,30 ± 0,92Ad	86,33b
86B79-12	6,15 ± 1,76Af	8,31 ± 4,80Ae	2,13 ± 1,07Ac	2,02 ± 0,99Ae	96,33a
86B79-10	4,62 ± 1,52Ag	8,67 ± 3,70Ae	0,57 ± 0,75Ae	0,74 ± 0,84Ag	93,00a
7341-01	3,82 ± 1,82Ag	7,96 ± 4,79Ae	0,76 ± 0,95Be	1,55 ± 0,97Af	92,33a
TH03-01	3,28 ± 2,39Ag	2,98 ± 1,12Af	1,36 ± 1,27Ad	0,67 ± 0,89Bg	88,00b
8694-15	3,26 ± 1,69Bg	11,53 ± 4,11Ad	0,55 ± 0,69Be	1,68 ± 0,84Af	92,00a
2803-01	3,00 ± 1,02Ag	4,46 ± 1,17Af	1,19 ± 0,66Bd	1,74 ± 0,86Af	93,33a
9179-03	2,33 ± 0,86Ag	6,69 ± 1,38Af	1,40 ± 0,79Bd	1,72 ± 0,84Af	97,00a
4279-13	1,81 ± 0,74Ag	3,87 ± 2,98Af	0,64 ± 0,80Ae	0,74 ± 0,81Ag	95,33a
C. V (%)		29,99		66,98	3,35
Média	16,4	19,59	1,62	1,81	93,05

Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F e de Scott-Knott.

Burke et al. (2004) observaram o efeito do pH na faixa de 6-8 em intervalos de 0,5 na germinação *in vitro* de pólen de algodoeiro, assim como no alongamento do tubo polínico e constataram que não houve diferenças entre os pHs testados. Por outro lado, Salles et al. (2006) verificaram que houve diferenças entre os pHs na faixa de 3,5-6,5 nas três variedades de citros estudadas, assim como a interação entre variedades e pHs, no que concerne a germinação *in vitro* de pólen. A importância da determinação do pH ideal nos processos fisiológicos que envolvem os grãos de pólen está associada à maior porcentagem de germinação que estes possam oferecer, garantindo maiores chances de fertilização (SALLES et al., 2006), além de influenciar na disponibilidade de nutrientes, reguladores vegetais e no grau de solidificação do ágar (PASQUAL et al., 2002).

Estudos têm indicado diferenças na germinação dos grãos de pólen *in vitro* como resultado da complexa interação entre a morfologia e a fisiologia do grão de pólen e os componentes do meio (GWATA et al., 2003). Por outro lado, as diferenças observadas na germinação *in vitro* e crescimento do tubo polínico de doze cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum*) foram consideradas como reflexo da variabilidade existente entre as cultivares (KAKANI et al., 2005). De forma semelhante Frazon et al. (2005) constataram que existem diferenças entre espécies e entre cultivares dentro da espécie no que se refere às condições necessárias do meio para a germinação do pólen *in vitro*.

Existe uma extrema variação na taxa de crescimento do tubo polínico em angiospermas. Todavia, existem poucas informações a respeito do crescimento do tubo polínico em bananeira. Neste estudo, o comprimento médio de crescimento do tubo polínico, independente do pH, variou de 0,65-3,72 mm após 48 horas de incubação.

Em Angiospermas, a energia requerida para a germinação dos grãos de pólen e formação dos componentes da parede celular e calose é fornecida pelas reservas nutritivas do próprio grãos de pólen (BAKER e BAKER, 1979). Essas reservas são importantes para a regulação da concentração da sacarose usada para a germinação *in vitro*. O açúcar empregado no meio de cultura tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e a solução de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (NUNES et al., 2001; BHATTACHARYA e MANDAL, 2000).

Além da fonte de carboidrato, o boro e o cálcio exercem papel importante na germinação do pólen e crescimento do tubo polínico. Ausência de cálcio ou boro geralmente afeta a germinação do pólen em várias espécies de plantas (BAÉZ et al., 2002). O ácido bórico é um agente estimulatório para a germinação do pólen e alongamento do tubo polínico, pois está envolvido com a translocação e metabolismo da sacarose. O boro, proveniente do estigma e estilete, tem um papel na produção de pectina no tubo polínico (GIBERNAU et al., 2003). A contribuição do ácido bórico ainda não está clara, mas admite-se que esta substância tenha habilidade para formar um complexo com o açúcar, que melhora a translocação das moléculas dessa substância. Além disso, esse complexo ionizável reage mais rapidamente com as membranas celulares (FRANZON et al., 2005; BHATTACHARYA e MANDAL, 2000).

O cálcio adicionado ao meio de cultura para germinação de grãos de pólen propicia características fisiológicas como tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade, crescimento linear e aparência rígida do tubo polínico (BHOJWANI e BHATNAGAR, 1974). Há maior permeabilidade da membrana do tubo polínico na ausência de cálcio, causando a liberação de metabólitos internos para o meio externo (STANLEY e LINSKENS, 1974). Além disso, o cálcio está envolvido com a síntese de pectina e controle das condições osmóticas (GIBERNAU et al., 2003).

São raros os relatos em que o meio contendo apenas água pura e sacarose tenha proporcionado uma boa germinação de pólen. Estudos efetuados por Souza-Lang e Pinto Júnior (1997), com diferentes açúcares na germinação de pólen de araucária (*Araucaria angustifolia*) mostraram que as maiores percentagens de germinação foram observadas nos meios sem qualquer um dos açúcares. Provavelmente, as concentrações utilizadas podem não ter surtido efeito, em função do desequilíbrio osmótico produzido entre o pólen e o meio de cultura. Por outro lado, Sahar e Spiegel-Roy (1984), não obtiveram germinação *in vitro* de pólen de abacate em meio de cultura contendo apenas sacarose e ágar. Segundo os autores, para que ocorra a germinação, o meio deve conter alguns nutrientes, como exemplo, cálcio, sulfato de magnésio, nitrato de potássio e ácido bórico. Similar resultado foi observado com grãos de pólen de *Sorghum bicolor* (L.) que não germinaram quando cultivados somente com sacarose e os poucos que germinaram, apresentaram um baixo desenvolvimento do tubo polínico (TUINSTRA e WEDEL, 2000). No geral, o meio usado para a germinação do pólen varia de acordo com a espécie de planta (DANE et al., 2004).

A freqüente eclosão dos grãos de pólen e tubo polínico é a maior dificuldade nos trabalhos de cultura de pólen (BALOCH et al., 2001). Existem vários relatos sobre a eclosão dos grãos de pólen *in vitro*, cultivados em meio contendo apenas água ou baixas concentrações de sacarose e de alta percentagem de germinação em concentração de sacarose variando de 20-30%. Para a germinação do pólen de *Agrostis stolonifera* L. cultivado em meio com sacarose a 0,025%, 0,05% e 0,1%, FEI e NELSON (2003), observaram que não houve eclosão do grão de pólen em nenhum dos tratamentos estudados. No presente estudo, ocorreu a eclosão dos grãos de pólen para alguns genótipos, embora em número inexpressivo (Figura 1c). Os grãos de pólen se rompem

devido, entre outros fatores, à alta umidade e à variação do meio, ocasionados pelo aumento da pressão osmótica e da baixa resistência da parede celular Pio et al. (2002).

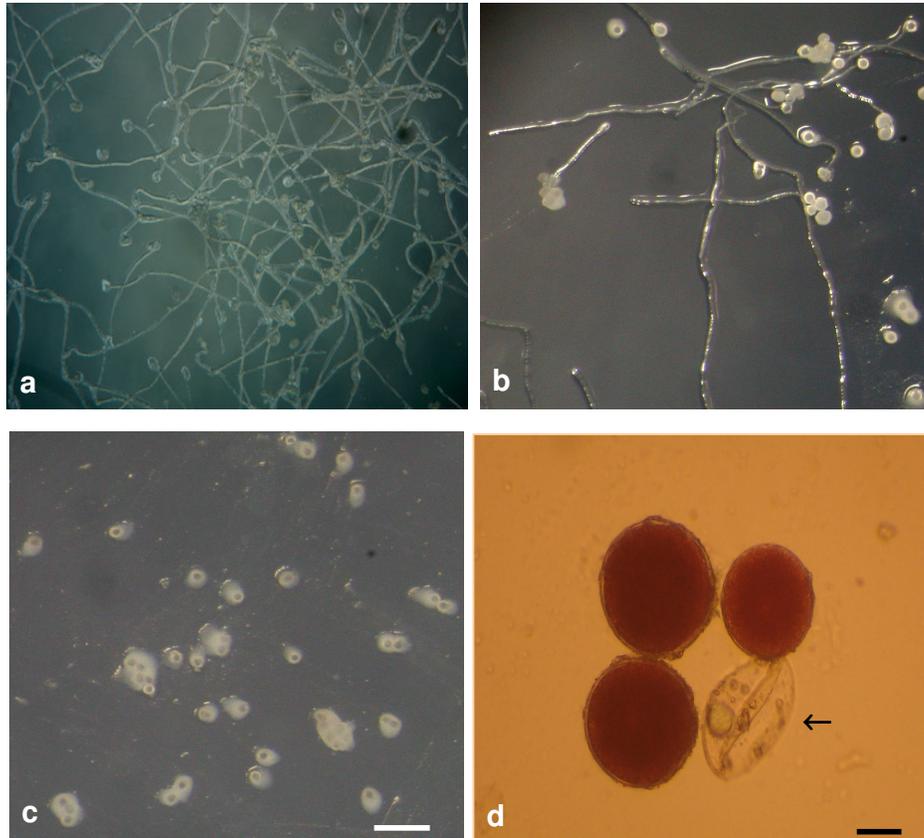


Figura 1. Germinação de grãos de pólen in vitro de híbridos diplóides de bananeira, em meio de cultura com pH 7,0 (a-c). a) 9187-01, alta percentagem de germinação e tubo polínico longo; b) 8987-01, menor crescimento do tubo polínico em relação ao 9187-01; c) 2801-03, eclosão dos grãos de pólen. Barra = 1,2 mm; d) Coloração com carmim acético dos grãos de pólen viáveis. Grãos de pólen não viáveis não coraram (seta). Barra = 0,9 mm.

Os grãos de pólen dos diferentes genótipos foram coletados de inflorescências no mesmo estágio fisiológico. A coloração com carmim acético se mostrou eficiente para diferenciar grãos de pólen viáveis e inviáveis (Figura 1d). Entre os vinte diplóides estudados, quinze apresentaram viabilidade acima de 90% (Tabela 1). Dentro deste grupo, os genótipos M-53 e 9187-01 foram os que apresentaram maior percentagem de pólen viáveis com 98,3% e 97,7%,

respectivamente, embora não diferindo estatisticamente entre si. No grupo dos cinco restantes, a viabilidade variou de 86,3 a 90%. A análise de variância mostrou que houve diferença significativa entre os dois grupos de genótipos ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Para Adhikari e Campbell (1998) a viabilidade do pólen é grandemente influenciada pela temperatura, umidade, diferenças genóticas, vigor e estágio fisiológico das plantas e idade das flores. Para este estudo, as diferentes respostas de viabilidade do pólen foi devido ao genótipo, já que as condições de temperatura e umidade foram controladas e as inflorescências masculinas foram coletadas no mesmo estágio fisiológico.

Neste estudo, a viabilidade dos grãos de pólen dos diferentes genótipos testados não correspondeu à percentagem de germinação *in vitro*, indicando que as condições de cultivo utilizadas não foram adequadas para todos genótipos testados, necessitando, portanto, de ajustes.

A otimização do meio de germinação *in vitro* será utilizada para identificação dos melhores genitores masculinos visando sua utilização tanto no melhoramento convencional quanto no processo de fertilização *in vitro* de bananeira.

CONCLUSÕES

O pH do meio ajustado para 7,0 proporcionou melhores respostas em relação a germinação dos grãos de pólen e comprimento do tubo polínico independentemente dos híbridos de diplóides avaliados, destacando-se os diplóides 9187-01 e M-53.

A viabilidade do pólen, estimada através do uso de carmim acético, foi superior a 80% nos genótipos testados.

Não houve correspondência entre a viabilidade observada e a germinação *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, K. N.; CAMPBELL, C. G. *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. **Euphytica**, v. 102, p. 87-92, 1998.

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, 2002.

BAKER, H. B.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and; its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v. 66 , n. 5, p. 591-600, 1979.

BALOGH, M. J. et al. Impact of concentrations on *in vitro* pollen germination of okra, *Hibiscus esculentus*. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 402-403 ,2001.

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

BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Pollination biology in *Bombax ceiba* Linn. **Current Science**, v. 79, n.12, p. 1706-1712, 2000.

BOLAT, I.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Journal of Agriculture and Florest**, v. 23, p. 383-389, 1999.

BUYUKKARTAL, H. N. *In vitro* pollen germination and pollen tube characteristics in tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.). **Turkish Journal of Botany**, v.27 p. 57-61, 2003.

BURKE, J. J.; VELTEN, J.; OLIVER, M. J. *In vitro* analysis of cotton pollen germination. **Agronomy Journal**. v. 96, p. 359-368, 2004.

DANE, FERUZAN; GÖKSEL OLGUN; ÖZLEM DALGIÇ. *In vitro* pollen germination of some plant species in basic culture medium. **Journal of Cell and Molecular Biology** v. 3, p. 71-76, 2004.

FEI, S.; NELSON, E. Estimation of pollen viability, shedding pattern, and longevity of creeping bent grass on artificial media. **Crop Science**, v. 43, p.2177-2181, 2003.

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

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

GIBERNAU, M.; MACQUART, D.; DIAZ, A. Pollen viability and longevity in two species of *Arum*. **Aroideana**, v. 26, p.58-62, 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.

KAKANI, V, G.; REDDY, K. R.; WALLACE, T. P.; PRASAD, P. V.; REDDY, V. R.; ZHAO, D. Differences *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. **Annals of Botany**, v. 96, p. 59-67, 2005.

KOPP, R. F.; MAYNARD, C. A.; NIELLA, P. R.; SMART, L. B.; ABRAHAMSON, L. P. Colection and storage of pollen from salix (Salicaceae). **American Journal of Botany**, v. 89, n. 2, p. 248-252, 2002.

KRISHNAKUMAR, M. P.; VALSALAKUMARI, P. K.; ARAVINDAKSHAN, M. Pollen production, fertility and viability in different nodes of the banana cultivars. **Agric. Res. Kerala**, v. 30, p. 53-57, 1992.

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

MOUTINHO, A. et al. Antisense perturbation of protein function in living pollen tubes. **Sex Plant Reprod**, v. 14, p. 101-104, 2001.

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, n. 2, p. 207-211, 1997.

NUNES, J. C. O.; DANTAS, A.C. de 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.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência** 8 (3): 199-202, 2002.

PARTON, E. et al. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, v. 125, p. 155-161, 2002.

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. ; PIO, R.; PASQUAL, M. Utilização de ácido bórico na germinação de pólen de citros. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, SBF, Belém, **Anais...**, p. 1-4, 2002.

PIO, L. et al. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n.3, p. 293-296, 2004.

SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SILVA, A. B. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's guide: statistics, Version 8 ed.** SAS Institute, Cary, NC, 2000.

SAHAR, N. SPIEGEL-ROY, P. *In vitro* germination of avocado pollen. **Hort Science**, v. 19, n. 6, p. 886-888, 1984.

SILVA, M. M.; BRUCNER, 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, 1999.

SOUZA-LANG, V. A.; PINTO JUNIOR, J. E. Influência do meio de cultura na germinação do pólen de três espécies de *Eucalyptus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v.34, p.45-54, 1997.

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

TUINSTRA, M. R.; WEDEL, J. Estimation of pollen viability in Grain Sorghum. **Crop Science**, v. 40, p. 968-970, 2000.

WANG, Z. Y. et al. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca Arundinacea*) (Poaceae) plants. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 4, p. 523-530, 2004.

CAPÍTULO 2

FERTILIZAÇÃO *IN VIVO* DE BANANEIRA CAVENDISH¹

¹ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Euphytica

FERTILIZAÇÃO *IN VIVO* DE BANANEIRA CAVENDISH

RESUMO

As bananeiras selvagens são diplóides enquanto a maioria das variedades comerciais são triplóides. As cultivares triplóides do subgrupo Cavendish apresentam esterilidade que têm inúmeras causas, mas não se sabe ao certo que barreiras pré-zigóticas são essas que impedem a fertilização dos óvulos. O objetivo do trabalho foi comparar o desenvolvimento dos óvulos de diplóides (AA) e triplóides (AAA) do subgrupo Cavendish, após a polinização *in vivo*. Foram realizadas polinizações controladas em flores de 20 plantas diplóides e 20 triplóides, utilizando-se grãos de pólen do genitor masculino, o diplóide (AA) M-53. Diariamente foram retiradas amostras de flores, com 1 a 30 dias após a polinização. Verificou-se que os óvulos de diplóides aumentaram de tamanho gradualmente, iniciando o processo de formação de sementes, enquanto nos triplóides, ocorreu diminuição do tamanho dos óvulos à medida que os frutos se desenvolviam, caracterizando-se a não fertilização. As flores de cultivares Grande Naine e Nanicão 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. Este fato, provavelmente pode estar relacionado à ausência de sementes em bananeiras deste subgrupo.

Palavras-chave: *Musa* spp., Hibridação, óvulos, melhoramento genético.

IN VIVO FERTILIZATION OF CAVENDISH BANANA

ABSTRACT

Wild bananas are diploids, whereas many commercial varieties are triploids. Triploid cultivars from the Cavendish subgroup present sterility due to innumerable causes but it is not yet well known which pre-zygotic barriers are they that hamper ovule fertilization. The objective of the present work was to compare the development of ovules from diploids (AA) and triploid (AAA) from the Cavendish subgroup after in vivo pollination. Controlled pollinations were carried out in flowers of twenty diploid and twenty triploid plants using pollen grains from the male genitor, the M-53 (AA) diploid. Samples of flowers were taken daily from 1 to 30 days after pollination. It was observed that ovules from diploids gradually increased in size, initiating a process of seed formation, whereas in the other triploids, a decrease in the size of the ovules occurred as the fruits developed, characterizing the non fertilization. The flowers from the cultivars from the Cavendish subgroup presented necrosis in the initial part of the ovary, detected as soon as the first day after pollination not only in plants which were pollinated, but also in the control. This fact can probably be related to the lack of seeds in bananas of this subgroup.

Key-words: *Musa* spp., Hybridization, ovules, genetic breeding.

INTRODUÇÃO

As bananeiras são plantas economicamente importantes e cultivadas em mais de 120 países. Os frutos de bananeira mostram duas vias de desenvolvimento: seminífera ou partenocárpica. As bananeiras silvestres são diplóides ($2n = 2x = 22$), seminíferas, geralmente alógamas e apresentam sementes férteis em grande quantidade, das quais dependem para sua dispersão, enquanto as cultivares comerciais são principalmente triplóides ($2n = 3x = 33$), partenocárpicas, 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, estas cultivares são 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.

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

Em polinizações controladas envolvendo banana e plátano, Fortescue e Turner (2005c) comentam que a produção de sementes é baixa, na ordem frequente de 1-5 sementes por 100 frutos, sendo que cada fruto deve conter no mínimo 300 óvulos. A ausência de sementes pode estar relacionada à intensa seleção agrônômica, devendo ser, portanto, um reflexo da domesticação da espécie. Este alto nível de infertilidade tem várias causas e limita a transferência de genes desejáveis de pais triplóides refletindo por exemplo na incapacidade dos

genótipos AAA de formarem sementes, o que dificulta o melhoramento das cultivares do subgrupo Cavendish 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 diplóides como triplóides.

O objetivo do estudo foi investigar o processo de fertilização *in vivo* da bananeira mediante a comparação do desenvolvimento dos óvulos em diplóides melhorados com óvulos de cultivares triplóides do subgrupo Cavendish.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, no período de fevereiro a setembro de 2005.

O sistema reprodutivo do gênero *Musa* foi estudado a partir de experimentos de polinizações manuais cruzadas realizadas no campo. Como material vegetal foram utilizados indivíduos diplóides (AA) e triplóides (AAA), estes do subgrupo Cavendish, listados na Tabela 1. Foram utilizados vinte plantas diplóides e vinte triplóides, 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 diplóides melhorados (AA) e dos triplóides (AAA) 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 (AA) M-53, que foi selecionado em função de apresentar alta percentagem de germinação. 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 um ou dois dias após a antese tendem a reduzir a viabilidade (Tangmitcharoen e Owens, 1997).

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, foram colocadas etiquetas com informações sobre o número da polinização e anotados no caderno de campo o genitor masculino utilizado, o local e a data da polinização, assim como o número de flores polinizadas. Foi mantida a proteção dos frutos com o 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.

Foram realizadas coletas diárias de amostras de flores com 1 a 30 dias após a polinização e avaliado o tamanho (diâmetro) do óvulo com auxílio de um estereomicroscópio (aumento de 6x), utilizando-se ocular e lâmina micrométrica, sendo os dados, posteriormente, transformados em milímetros.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 20 (genótipos) x 30 (dias) sendo composto por três repetições, mensurando-se 30 óvulos/repetição. Os dados foram analisados pelo programa SAS, 2000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a avaliação da polinização, observou-se que nos diplóides os grãos de pólen depositados sobre o estigma emitiam e desenvolviam mais rapidamente o tubo polínico que os triplóides. Cerca de quatro horas após a polinização os grãos de pólen não eram mais visíveis sobre o estigma, indicando completa germinação, enquanto que nos triplóides 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. Um dia após a polinização, os estigmas dos diplóides se desprenderam do fruto. Nos triplóides, entretanto, persistiram até o terceiro dia.

Cortes longitudinais da flor feminina mostraram a ocorrência de uma necrose na porção inicial do ovário das cultivares triplóides (Figura 1b-c), em uma frequência de quase 100% já no primeiro dia após a polinização, tanto em plantas que foram polinizadas quanto no tratamento controle, o que não aconteceu nos diplóides (Figura 1a). Este fato pode ser responsável pela esterilidade natural que ocorre nas bananeiras do subgrupo Cavendish. É provável que, esteja havendo a produção de substâncias na região necrosada, que afetam o crescimento do tubo polínico, impedindo a ocorrência de fertilização.



Figura 1. Inflorescência feminina da bananeira após dois dias da polinização. a) Diplóide 86B79-12, sem necrose na região distal do ovário; b-c) 'Grande Naine Rossete' apresentando necrose na região distal do ovário; d) Desenvolvimento dos óvulos fertilizados 30 dias após a polinização no diplóide 1304-06 e e) na cultivar triplóide Nanicão Rossete.

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. Fortescue e Turner (2005c) observaram que na antese a maioria dos sacos embrionários de cultivares comestíveis não apresentam membrana nuclear e um conteúdo desorganizado, especialmente nas cultivares com genoma AAA. Além disso, verificaram que após a antese o saco embrionário começa a se deteriorar. Por sua vez, Shepherd et al. (1986) 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.

Os dados obtidos no presente estudo indicam que a ocorrência de necrose na região distal do ovário constitui uma possível causa adicional da esterilidade em Cavendish.

Os genótipos testados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com relação ao desenvolvimento dos óvulos, nos diferentes períodos após a polinização, tanto entre os diplóides e triplóides como dentro de cada ploidia.

De modo geral, observou-se que o tamanho dos óvulos fertilizados dos diplóides (AA) aumentou linearmente ao longo dos dias após a polinização, estabilizando-se a partir do vigésimo dia. Já os óvulos das cultivares triplóides (AAA) apresentaram um comportamento inverso, haja vista que houve uma redução no diâmetro com o passar dos dias (Figura 2). Os valores médios evidenciam que um dia após a polinização os óvulos dos diplóides e triplóides apresentaram um tamanho de 0,90 e 1,4 mm, respectivamente. Entretanto, à medida que transcorreram os dias após a polinização ocorreu um aumento no tamanho dos óvulos nos diplóides e redução dos mesmos nas cultivares triplóides, atingindo em média 1,8 mm e 0,8 mm, respectivamente, 30 dias após a polinização (Figura 1d-e).

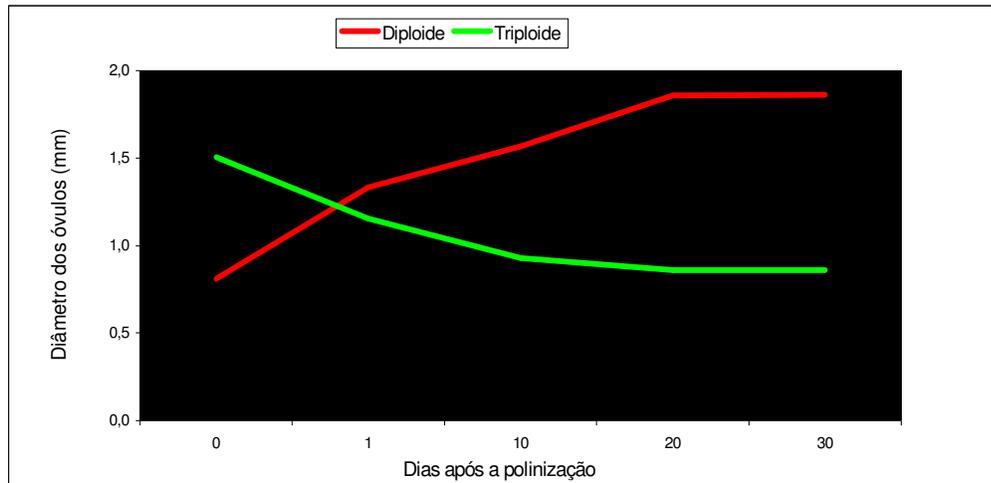


Figura 2. Alterações no diâmetro dos óvulos de bananeiras diplóides (AA) e triplóides (AAA), até os trinta dias após a polinização manual.

Estudando a anatomia dos óvulos de bananeira, Fortescue e Turner (2005c) observaram que até a antese o desenvolvimento dos óvulos de diplóides e triplóides foi semelhante, e que após a antese os óvulos dos triplóides 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.

Aos 30 dias após a polinização o maior tamanho médio dos óvulos ocorreu no diplóide 9187-02, com 4,400 mm, enquanto que entre os triplóides os óvulos de 'Nanicão SC-063' alcançaram um valor médio de 0,948 mm (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro (mm) dos óvulos de genótipos diplóides (AA) e triplóides (AAA) após 1, 10, 20 e 30 dias da polinização com M-53.

Genótipos	Diâmetro dos óvulos (mm)			
	Dias após a polinização			
Diplóides AA	1	10	20	30
0304-02	0,915	1,518	2,008	2,710
1741-01	0,950	1,568	1,982	(¹)
4154-08	1,175	0,994	0,781	0,929
4215-02	0,822	1,530	1,685	1,498
4252-04	1,108	1,508	1,403	(¹)
4252-05	0,742	1,433	1,667	1,315
4279-06	1,052	0,768	(¹)	(¹)
5854-03	0,750	1,585	1,863	1,927
7279-06	0,913	1,092	0,935	0,848
7341-01	0,830	1,170	1,292	1,302
7341-03	0,922	1,468	1,494	1,456
86B79-09	0,770	1,607	(¹)	(¹)
8987-01	0,750	1,323	1,481	2,821
9179-03	0,815	1,439	1,995	3,467
9187-02	0,768	1,393	2,042	4,400
Triplóides AAA				
Nanicão Rossete	1,478	1,116	0,864	0,853
Nanicão SC-063	1,332	1,237	0,949	0,948
Grande Naine Magario	1,436	0,912	0,919	0,897
Grande Naine Rossete	1,505	1,360	(¹)	(¹)
Grande Naine SC-074	1,327	0,898	0,898	0,768

(¹) Génótipos que apresentaram número de pencas

Nos diplóides 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 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.

No caso das cultivares tipo Cavendish, dada a ocorrência de necrose na região distal do ovário, uma técnica alternativa de polinização cruzada para superar essas barreiras pré-zigóticas poderia envolver o corte do estilete e da região necrosada antes da polinização.

CONCLUSÃO

1) Novas técnicas de polinização *in vivo* precisam ser estudadas 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.

2) A ocorrência de uma necrose na região distal do ovário pode estar relacionada com a esterelidade que acontece em Cavendish.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's guide: statistics, Version 8 ed.** SAS Institute, Cary, NC, 2000.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Banana breeding in Brasil. In: PERSLEY, G. J. DE LANGHE, E. A. (ed.). **Banana and plantain breeding strategics**; proceedings of an international workshop led of cairns. Austrália: ACIAR, p.78-83. 1986.

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, 1999.

SILVA, S. de O.; ALVES, É. 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.

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

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE BANANEIRA GRANDE NAINÉ

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE BANANEIRA ‘GRANDE NAINE’

RESUMO

O melhoramento de bananeira é dificultado pela baixa quantidade ou ausência total de sementes. As causas da não produção de sementes estão relacionadas à existência de barreiras físicas e/ou bioquímicas que impedem o processo de fertilização, a exemplo de cultivares do subgrupo Cavendish. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia de fertilização *in vitro* para a obtenção de híbridos de Cavendish, resistentes à Sigatoka-negra. O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, em duas etapas. Na primeira foram inoculados grãos de pólen de ‘Pa Songkla’ com óvulos de ‘Grande Naine’, com e sem placenta, em meio de cultura contendo 60 g. L⁻¹ de sacarose e 100 mg. L⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₃) e pH ajustado em 5,8. Na segunda etapa, foram feitos cortes longitudinais no ovário de ‘Grande Naine’ e introduzidos no meio com 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 8 g. L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 ou 7,0. Posteriormente, os grãos de pólen de M-53 foram distribuídos em cima dos ovários. Verificou-se que em ambas as etapas o pólen germinou abundantemente sobre os óvulos, no entanto, não foi possível identificar se ocorreu a fertilização, uma vez que a oxidação foi intensa comprometendo assim o processo.

Palavras-chave: *Musa* spp.; Cavendish; grãos de pólen; óvulos; melhoramento genético

IN VITRO FERTILIZATION OF 'GRAND NAINE' BANANA

ABSTRACT

Banana breeding has been difficult due to low number or total lack of seeds. The causes of the not production of seeds is related to the existence from physical and/or biochemical barriers that hamper the process of fertilization, as it happens in the cultivars of the Cavendish subgroup. The objective of the present study was to develop an in vitro fertilization methodology for the obtainment of Cavendish hybrids resistant to black-Sigatoka. The study was carried out in the Tissue Culture Laboratory at Embrapa Cassava and Tropical Fruits in two phases. In the first phase, 'Grand Naine' ovules, with and without placenta, in culture medium containing 60 g.L⁻¹ sucrose and 100 mg.L⁻¹ of boric acid (H₃BO₃) and pH adjusted to 5.8, were inoculated with 'Pa-Songkla' pollen grains. In the second phase, longitudinal cuts were made in the ovaries of 'Grande Naine' and introduced in medium containing 15% sucrose, 0.01% boric acid, 0.01% potassium nitrate, 0.03% calcium nitrate and 0.02% magnesium sulfate solidified with 8 g.L⁻¹ of agar and pH adjusted to 5.8 or 7,0. Afterwards, the M-53 pollen grains were distributed on top of the ovaries. It was observed that in both techniques the pollen germinated abundantly over the ovaries, however, it was not possible to identify if fertilization occurred, since the oxidation was intense compromising the entire process.

Key-words: *Musa* spp.; Cavendish; pollen grains; ovules; genetic breeding.

INTRODUÇÃO

A polinização e a fertilização *in vitro* incluem a manipulação do tecido maternal para permitir a penetração do tubo polínico no saco embrionário por meios de processos diferentes daquele que acontece normalmente *in situ* (STEWART, 1981).

No início da década de 60, a Universidade de Delhi na Índia concentrou esforços no sentido de desenvolver metodologias para o cultivo de órgãos reprodutivos de angiospermas. Os resultados positivos obtidos com a polinização ovariana (aplicação do pólen no ovário excisado) levou ao desenvolvimento de métodos de fertilização de óvulos isolados aderidos ou não à placenta, designados como polinização placentária ou ovular, respectivamente. Kanta et al. (1962), pioneiros da utilização da polinização ovular, obtiveram a formação de sementes viáveis após a aplicação do pólen sobre a superfície dos óvulos excisados, em *Papaver somniferum*. Trabalhos posteriores de fertilização *in vitro* realizados com outras espécies de plantas, basearam-se na mesma metodologia utilizada com *Papaver*. Os melhores resultados têm sido observados em espécies em que os ovários são grandes e contêm muitos óvulos, principalmente as espécies pertencentes as famílias de *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Liliaceae*, *Papaveraceae*, *Primulaceae* and *Solanaceae* (ZENKTELER 1992, 1994).

De acordo com Razdan (2003), os métodos de polinização *in vitro* podem ser classificados, de acordo com o tipo de explante utilizado, como:

- 1) Estigmática: aplicação do pólen sobre a superfície do estigma;
- 2) Ovariana: corte do estilo e aplicação do pólen sobre a superfície do ovário;
- 3) Placentária: cultivo de óvulos aderidos a placenta com grãos de pólen depositados ao redor e na superfície dos óvulos;
- 4) Ovular: aplicação do pólen nos óvulos isolados;

A polinização ovular é uma técnica mais complicada quando comparada a polinização placentária ou ovariana. Até o momento, existem poucos relatos com sucesso em experimentos com óvulos isolados polinizados *in vitro*. Plântulas foram obtidas através da auto-polinização de óvulos excisados de *Brassica oleracea* (KAMEYA et al., 1966), *Cichorium intybus* (CASTAÑO e DE PROFT, 2000) e *Helianthus annuus* (POPIELARSKA, 2005) e através da polinização cruzada interespecífica de *Gossypium* (STEWART, 1981).

A utilização de técnicas de polinização e fertilização *in vitro* permite: estudar os processos de polinização, fertilização e desenvolvimento do embrião em condições controladas (SHIVANNA e RANGASWAMY, 1969; ZENKTELER, 1980); transpor barreiras de incompatibilidade que, poventura estejam no estigma, estilete ou ovário (KANTA et al., 1962; KANTA e MAHESHWARI, 1963) ou pela abscisão precoce da flor (RAO, 1965); recuperar híbridos interespecíficos e intergenéricos que não podem ser obtidos pelos métodos convencionais *in vivo* (ZENKTELER, 1980; CHIN et al. 1997; ZENKTELER e RELSKA-ROSZAK, 2003); induzir haplóides partenogênicos através da polinização com pólen inviável de algumas espécies ou com pólen de espécies distantes (HESS e WAGNER, 1974); reduzir o intervalo de tempo entre a polinização e a fecundação (KAMEYA e HINATA, 1970); estudar a fisiologia do pólen e do processo de fertilização (DUPUIS e DUMAS, 1989)

As bananeiras do subgrupo Cavendish (AAA), também conhecidas como bananas d'água (Nanica, Nanicão e Grande Naine) que representam 44% das bananas cultivadas no mundo, devido ao seu sabor e textura, são as preferidas pelo mercado internacional para consumo principalmente *in natura*. Um dos grandes problemas nos plantios comerciais de bananeiras deste subgrupo é a ausência de cultivares resistentes às Sigatokas amarela e negra, o que eleva o custo de produção pela necessidade de aplicação de fungicidas para controle destas doenças, e, dependendo do grau de severidade, pode causar a perda total da produção.

A maioria dos programas de melhoramento convencional se baseia na obtenção de diplóides melhorados, os quais são utilizados como parentais em cruzamentos com outros diplóides ou alguns triplóides que conservam certa fertilidade feminina (ESCALANT e SANDOVAL, 1992; SILVA et al., 2001). O melhoramento genético convencional de Cavendish é dificultado pela sua quase total esterilidade.

O número reduzido ou ausência de formação de sementes em algumas espécies ocorre devido a barreiras físicas e bioquímicas, pré-zigóticas e/ou pós-zigóticas, que interferem no processo de fecundação sob condições naturais.

Na literatura são relatadas como causas da esterilidade em *Musa* a ocorrência de anomalias na meiose como assinapse, aborto de sacos embrionários e translocação. 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 de fusão dos núcleos (SHEPHERD et al., 1986; SILVA, 2002; FORTESCUE E TURNER, 2005).

Yeung et al. (1981) relatam que o sucesso da técnica de polinização e fertilização *in vitro* depende da utilização de óvulos no estágio fisiológico adequado e da obtenção de meios nutritivos para a germinação dos grãos de pólen, crescimento do tubo polínico e desenvolvimento do embrião. Dessa forma, é fundamental o conhecimento dos aspectos relacionados à biologia floral da espécie estudada. Estes incluem antese, deiscência das anteras, polinização, germinação do pólen, crescimento do tubo polínico, penetração do óvulo, fertilização e desenvolvimento do embrião e endosperma.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de fertilização *in vitro* de bananeira 'Grande Naine' para obtenção de híbridos tetraplóides.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*.

Como material vegetal foram utilizados grãos de pólen de diplóides (AA) 'Pa Songkla' e 'M53', que são resistentes às sigatocas amarela e negra, e óvulos da cultivar Grande Naine (AAA), oriundos do Banco de Germoplasma da Embrapa.

Visando identificar as condições adequadas para o procedimento de fertilização *in vitro* dos óvulos foram testados diferentes explantes: 1) óvulos isolados; 2) segmento do ovário; e 3) ovário inteiro.

1) Inoculação de óvulos isolados, oriundos das três primeiras pencas correspondendo a diferentes estádios fisiológicos: um dia antes da antese (abertura da flor feminina), no dia da antese e um dia após a antese. Os ovários da bananeira são triloculares com duas filas de óvulos em cada lóculo. Para isolar os óvulos foi feito um corte transversal ao longo do ovário, retirando-se o pericarpo e expondo os lóculos onde se encontram os óvulos (aproximadamente 100 óvulos/lóculo). Os óvulos foram removidos do ovário, com ou sem placenta,

com auxílio de pinça e bisturi e cultivados com grãos de pólen de 'PA Songkla', em placas de Petri contendo 40 mL de meio de cultura com 60 g de sacarose, 100 mg L⁻¹ de ácido bórico, solidificado com ágar (0,8%) e pH ajustado em 5,8. Utilizou-se de 20 placas de Petri, sendo que a metade com óvulos sem placenta (Figura 1a) e o restante dos óvulos aderidos à placenta (Figura 1b). As placas foram subdivididas em quatro quadrantes cada uma representando uma repetição, totalizando 80 repetições.

2) Inoculação de segmento do ovário: o pericarpo foi retirado e segmentos do ovário foram introduzidos, no meio de cultura contendo 15% de sacarose, 0,01% de ácido bórico, 0,01% de nitrato de potássio, 0,02% de sulfato de magnésio, 0,03% de nitrato de cálcio e solidificado com 0,8% de ágar, pH ajustado em 5,8 ou 7,0. Os grãos de pólen do diplóide M-53 foram distribuídos na superfície dos cortes do ovário (Figura 1c). Foram utilizados 10 placas de Petri, cada placa continha oito secções de ovários.

3) Inoculação do ovário inteiro: após a retirada do pericarpo, o ovário foi cultivado no mesmo meio de cultura utilizado para segmentos do ovário (Figura 1d).

Os grãos de pólen foram coletados na antese, pela manhã, às 8:00 horas, sendo transferidos imediatamente para o meio de cultura, sem qualquer processo de desinfestação, enquanto que os óvulos foram desinfestados em álcool 70% por 5 minutos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio a 50% com algumas gotas de Tween 20 durante 25 minutos, sob agitação, lavando-os por três vezes com água destilada esterilizada. Após a inoculação do material no meio, as placas foram incubadas no escuro, sob condições controladas de temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A partir de 24 horas de cultivo *in vitro* foram realizadas observações periódicas, utilizando-se um estereomicroscópio (aumento 6x), a fim de se avaliar o crescimento do tubo polínico e a ocorrência de fertilização dos óvulos.

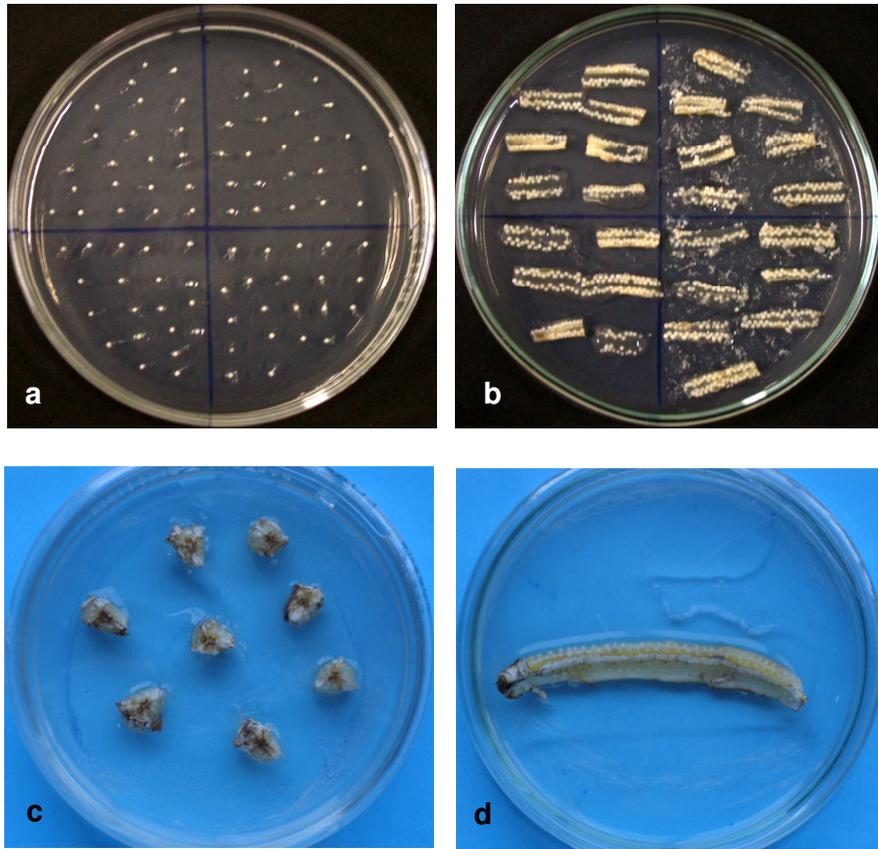


Figura 1. Fertilização *in vitro* de óvulos isolados da cultivar Grande Naine, na ausência (a) ou presença (b) da placenta. Inoculação de segmentos de ovário (c) e do ovário inteiro no meio de cultura (d).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Polinização de óvulos isolados

O pólen germinou abundantemente sobre os óvulos após a polinização *in vitro*, mas somente ocasionalmente a penetração na micrópila ocorreu nos óvulos sem a placenta (Figura 2). Observou-se que as placas que continham óvulos com placenta contaminaram mais rapidamente, provavelmente em função da alteração na consistência do meio de cultura sólido quando em contato com este material gelatinoso, o que dificultou o processo de germinação do pólen. Além disso, verificou-se, aos sete dias após a inoculação no meio de cultura, a presença de uma oxidação e murchamento dos óvulos com e sem placenta, dificultou o processo de fertilização *in vitro*.

As técnicas de polinização de óvulos isolados e de polinização placentar tem resultado na fertilização de mais de 50 espécies, entretanto, a produção de sementes viáveis foi obtida em somente 36. Cruzamentos interespecíficos e intergenéricos e entre espécies de famílias distintas foram realizados em 55 combinações, das quais 19 produziram sementes viáveis (ZENKTELER, 1980). Exemplos de espécies onde a polinização de óvulos isolados resultou na formação de sementes, foram encontrados em *Papaver somniferum* (KANTA, 1962) e no cruzamento de *Brassica chinense* x *B. pekinense* (KAMEYA e HYNATA, 1970).

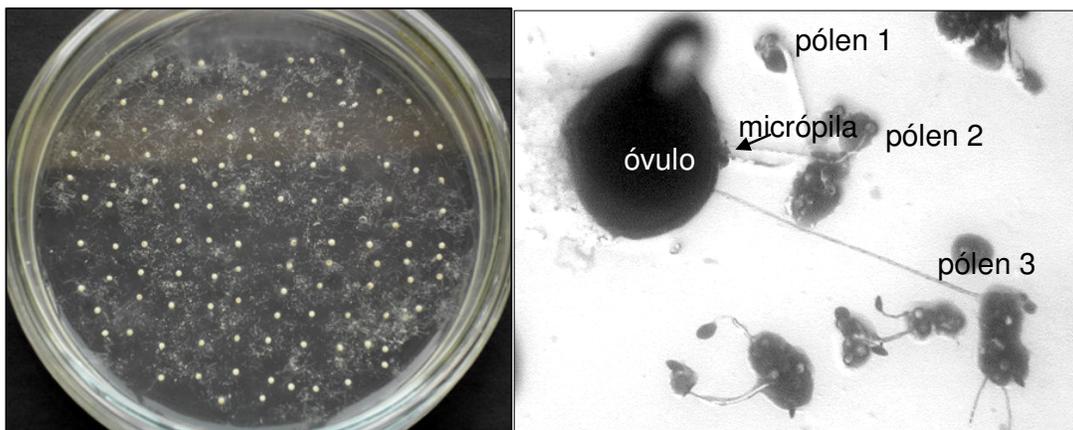


Figura 2. Polinização de óvulos isolados em 'Grande Naine'. O tubo polínico se desenvolveu em direção ao óvulo, alcançando a micrópila .

Polinização de segmentos do ovário e de ovário inteiro

No teste em que foram utilizados segmentos do ovário, observou-se que muitos grãos de pólen germinaram sobre a superfície do ovário, principalmente no carpelo e na placenta (Figura 3a). Acredita-se que a intensa germinação nesta estrutura é devido à disponibilidade de boro, que é considerado elemento indispensável na germinação dos grãos de pólen. Não foi possível, no entanto, constatar se esses grãos de pólen penetraram realmente na micrópila, já que o desenvolvimento dos óvulos cultivados de forma seccionados ou inteiros, foram acometidos por uma intensa oxidação (Figura 3b). Os ovários seccionados cultivados em meio de cultura com pH ajustado em 5,8 apresentou uma oxidação mais intensa quando comparado ao pH 7,0 (Figura 4).

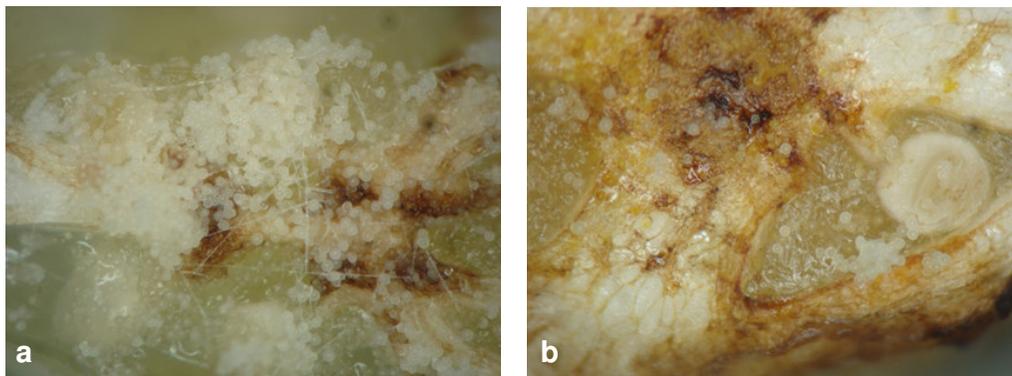


Figura 3. Segmento do ovário de 'Grande Naine' com intensa germinação dos grãos de pólen na superfície (a) e oxidação

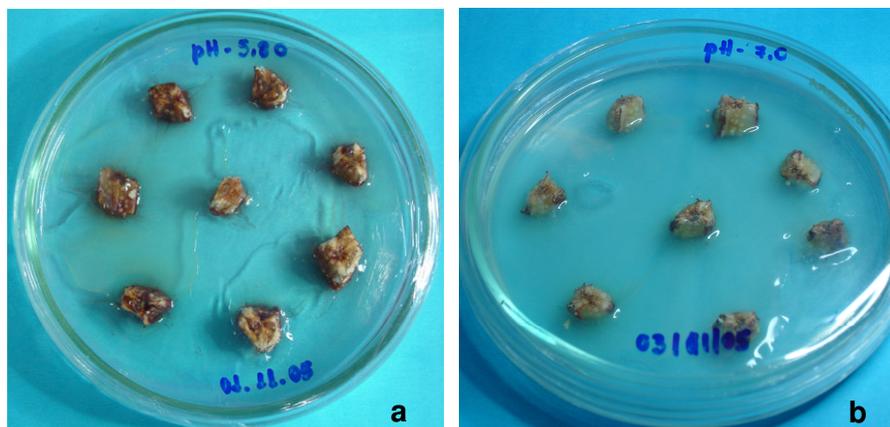


Figura 4. Cultivo de ovário segmentado de 'Grande Naine' com intensa (a) e baixa oxidação (b) após 7 dias de cultivo *in vitro*.

O baixo índice de penetração observado após a polinização *in vitro*, pode ser resultado de uma inabilidade do tubo polínico para reagir a sinais da micrópila (VERVAEKE et al., 2002). Geralmente, o crescimento do tubo polínico não alcança o comprimento que deveria ser necessário para assegurar a fertilização *in vitro* (STONE, et al., 2004). A maior parte dos tubos polínicos têm seu crescimento interrompido antes de atingirem o tamanho normalmente alcançado no estigma, o que dificulta o processo de fertilização (SALLES et al., 2006).

Alguns trabalhos como o de Cheung et al. (2000), salientam que o estigma não é absolutamente necessário para obter a fertilização. Por outro lado, a germinação de pólen e crescimento do tubo polínico são, em princípio, necessários para a fertilização e formação de sementes em plantas em floração (BUYUKKARTAL, 2003).

O pólen de muitas espécies germinam e crescem em meio quimicamente simples, entretanto, o crescimento do tubo polínico *in vitro* nunca alcança a percentagem de crescimento correspondente *in vivo* (CHEUNG et al., 2000). Em *Torenia fournieri* o tubo polínico germinado *in vitro* alongou ao redor dos óvulos, mas, não alcançou o fim da micrópila do saco embrionário sem revestimento (HIGASHIYAMA et al., 1998). Considera-se o óvulo fertilizado quando o tubo polínico penetra na micrópila (VERVAEKE et al., 2002).

A ativação do óvulo em *Lilium longiflorum* não desencadeou o processo que induziu o tubo polínico entrar na micrópila, semelhante quando os óvulos

fertilizados estavam presentes nas mesmas flores (JANSON, 1993). A ativação do ovário de *Aechmea fasciata* por meio da polinização correspondente ao período de 6 horas não melhorou a penetração no tubo polínico (VERVAEKE et al., 2002). Talvez a prepolinização não foi suficientemente para induzir a ativação do óvulo ou mesmo o tubo polínico não foi capaz de compreender os sinais do óvulo.

Cabe enfatizar que as interações entre o tubo polínico e o saco embrionário são fundamentais para o sucesso da fertilização de plantas frutíferas (HIGASHIYAMA et al., 1998).

A polinização seguida da fertilização conduz à produção do embrião, que na planta está associada ao desenvolvimento normal da semente.

CONCLUSÕES

Independentemente dos óvulos cultivados com e sem placenta ocorreu oxidação e murchamento dos mesmos, inviabilizando o processo de fertilização *in vitro*.

Observou-se que muitos grãos de pólen germinaram sobre os ovários seccionados transversalmente. Embora, não tenha sido constatado se esses grãos de pólen penetraram realmente na micrópila.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUYUKKARTAL, H. N. *In vitro* pollen germination and pollen tube characteristics in tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.). **Turkish Journal of Botany**, v.27 p. 57-61, 2003.

CASTAÑO, C. I.; PROFT, M. P. In vitro pollination of isolated ovules of *Cichorium intybus* L. **Plant Cell Reports** v.19, p. 616-621, 2000.

CHEUNG, A. Y et al. Pollen-pistil interactions in *Nicotiana tabacum*. **Annals of Botany**, v. 85, p. 29-37, 2000.

Chin, S. W. et al. Dominant expression and heat tolerance of *Lilium longiflorum* germplasm in distant hybridization with asiatic and oriental lilies. **Acta Horticulture**, v. 430, p.495–502, 1997.

DUPUIS, I. DUMAS, C. In vitro pollination as a model for studying fertilization in maize (*Zea mays* L.). **Sex Plant Reproduction**, v. 2, p. 265-269, 1989.

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

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.

HESS, D. WAGNER, G. Induction of haploid parthenogenesis in *Mimulus luteus* by in vitro pollination with foreign pollen. *Z Pflanzenphysiol* v. 72, p.466-468, 1974.

HIGASHIYAMA, T. et al. Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri*. **Plant Cell**, v. 10, p. 2019-2031, 1998.

JANSON, J. Placental pollination in *Lilium longiflorum* Thunb. **Plant Science**, v. 90, p. 105-115, 1993.

KAMEYA, T.; HINATA, K.; MIZUSHIMA, U. Fertilization in vitro of excised ovules treated with calcium chloride in *Brassica oleraceae* L. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 42, p.165-167, 1966.

KAMEYA, T.; HINATA, K. Test-tube fertilization of excised ovules in *Brassica*. *Japanese Journal of Breeding*, v. 20, p. 253-260, 1970.

KANTA, K.; RANGASWAMY, N. S.; MAHESHWARI, P. Test-tube fertilization in a flowering plant. **Nature**, v. 194, p. 1214–1217, 1962.

KANTA, K.; MAHESHWARI, P. Test-tube fertilization in some angiosperms. **Phytomorphology**, v. 13, p.230-237, 1963.

POPIELARSKA, M. *In vitro* pollination of isolated ovules of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Acta Biologica Cracoviensia Serie Botanica**, v. 47, n. 1, p. 85-92, 2005.

RAO, P. S. The *in vitro* fertilization and seed formation in *Nicotiana rustica* L. **Pirton**, v. 22, n. 2, p. 165-167, 1965.

SALLES, L. A. et al. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência Agrotecnica**, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Banana breeding in Brasil. In: PERSLEY, G. J. DE LANGHE3, E. A. (ed.). *Banana and plantain breeding strategics*; proceedings of an international wokshop led of cairns. Austrália: ACIAR, 1986. p.78-83.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris*. I. Delayed pollination, pollination with stored pollen, and bud pollination. **Phytomorpholog**, v. 19, p. 372-380, 1969.

SILVA, S. O. et al. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, p. 399-436, 2001.

STONE, L. M. et al. Fast pollen tube growth in *Conospermum* species. **Annals Botany**, v. 93, p. 329-378, 2004.

STEWART, J. *In vitro* fertilization and embryo rescue. **Environmental and Experimental Botany**, v. 21, p. 301-315, 1981.

TORRES, C. A.; NISHIJIMA, M. L.; GATTONY, M. K. Polinização e fertilização *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, v. 1, parte 2, p. 335-369, 1998.

VERVAEKE, I. et al. Pollen tube growth and fertilization after different *in vitro* pollination techniques of *Aechmea fasciata*. **Euphytica**, v.124, p. 75-83, 2002.

YEUNG, E. C.; THORPE, T. A.; JENSEN, C. J. *In vitro* fertilization and embryo culture. In: THORPE, T. A. (ed). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, p. 253-271, 1981.

ZENKTELER, M. Intraovarian and *in vitro* pollination. In: Vasil IK (ed) **Perspectives in plant cell and tissue culture**. (Int Rev Cytol Suppl 11B.) Academic Press, New York, p. 137-156, 1980.

ZENKTELER, M. Wide hybridization in higher plants by applying the method of test tube pollination of ovules. In: Datté Y, Dumas C, Gallais A (eds). **Reprod Biol Plant Breed 13th Eucarpia Meet**, Angers, France, Springer-Verlag, Berlin, p. 205–214, 1992.

ZENKTELER, M. Self and cross pollination of ovules in test tubes. S5-5. **Abstr 8th Int Congr Plant Tissue Cell Cult**. IAPTC, Firenze June 12–17, p. 108, 1994.

ZENKTELER, M.; RELSKA-ROSZAK, D. Bidirectional pollination of Angiosperm and Gymnosperm ovules. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.45, n.1, p. 7-81, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura da bananeira é bem adaptada às condições tropicais, sendo praticada em todas as regiões brasileiras, principalmente, por pequenos produtores. A banana apresenta grande importância econômica e social sendo uma fonte contínua de alimento, uma vez que pode ser produzida o ano todo. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de banana, com uma produção estimada na ordem de 6,5 milhões de toneladas e área colhida de 485 mil ha (FAO, 2005).

As cultivares mais conhecidas (Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra) são muito suscetíveis à Sigatoka-negra e, à exceção da 'Terra' e "Maçã", são também suscetíveis à Sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-Panamá, as cultivares Grande Naine e Terra, são resistentes, a 'Maçã' é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis. Para contornar este problema foi criado um programa de melhoramento de bananeira onde são produzidos tetraplóides (AAAB) a partir do cruzamento de cultivares comerciais (AAB) com diploides (AA) (SILVA et al. 2001).

Uma das limitações do melhoramento genético da bananeira é a baixa ou ausência total de produção de sementes, provocada por barreiras físicas e/ou bioquímicas que impedem o processo de fertilização, a exemplo do que ocorre nas cultivares do Subgrupo Cavendish. Técnicas biotecnológicas podem constituir-se em importantes ferramentas de auxílio ao melhoramento convencional, visando sempre incrementar e melhorar a eficiência na obtenção de variedades melhoradas.

O presente trabalho avaliou alternativas de cultivo *in vitro* e *in vivo* de pólen e óvulo com o objetivo de conhecer as barreiras que impedem a fertilização natural em bananeiras e estabelecer uma metodologia de obter híbridos *in vitro*.

Observou-se que os genótipos, comportaram-se de forma diferente com relação a germinação do pólen *in vitro*. Corroborando com Loguercio,2002 e Gwata et al., 2003) que revelaram diferenças na germinação *in vitro* dos grãos de pólen como resultados da complexa interação entre a morfologia e a fisiologia do grão de pólen e os componentes do meio.

A viabilidade dos grãos de pólen mediante a coloração com carmim acético 1% nos diferentes genótipos avaliados foi superior à percentagem de germinação *in vitro*, indicando que as condições de cultivo *in vitro* utilizadas não foram adequadas, necessitando, portanto de ajustes. Entretanto a germinação pode ser usada para inferir sobre a capacidade do pólen no processo de fertilização.

Constatou-se que a fertilização *in vivo* foi eficiente para o aumento de volume dos óvulos de diploides (AA) cujo o volume foi aumentando ao longo dos dias após a polinização. O mesmo não ocorreu nos triplóides (AAA), cujos os óvulos regrediram de tamanho.

Por fim, foram avaliadas várias metodologias de fertilização *in vitro*, mas não se constatou a ocorrência efetiva do processo. Sugere-se que outros trabalhos sejam desenvolvidos para estabelecer a fertilização *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Banana**. São Paulo: FNP. Consultoria & Agoimformativos, 2005. p.220-229.

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 de mar. 2005.

GWATA, E. T. et al. Pollen morphology and *in vitro* germination characteristics of nodulating and nonnodulating soybean (*Glicine max* L.) genotypes. **Theor Appl Genet**, v. 106, p. 837-839, 2003.

LOGUERCIO, L. L. Pollen treatment in high osmolarities: a simple tool for *in vitro* preservation and manipulation of viability in gametophytic populations. **Braz. J. Physiol**, v. 14, n. 1, p. 65-70, 2002.

SILVA, S. O. et al . Banana breeding program at Embrapa.. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.