

VIABILIDADE *in vitro* DE GRÃOS DE PÓLEN DE BANANEIRA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO BÓRICO E SACAROSE

In vitro viability of banana pollen grain under different concentrations of boric acid and sucrose

Ronaldo Viana dos Reis¹, Lucymeire de Souza Morais-Lino², Sebastião de Oliveira e Silva³,
Edson Perito Amorim³, Carlos Alberto da Silva Ledo³, Alexandre Pio Viana⁴

RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a germinação do grão de pólen e o comprimento do tubo polínico das bananeiras diplóides M53, 8987-01 e 9197-03, Calcutá, Lidi e 86B79-12. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com cinco doses de sacarose (0, 5, 10, 15, 20%) e seis concentrações de ácido bórico (0, 100, 200, 300, 400 e 500 Mg L⁻¹) com quatro repetições. Foram utilizados grãos de pólen retirados da inflorescência masculina dos diplóides *Musa acuminata* (AA). O pólen foi distribuído em placas de Petri, contendo o seguinte meio de cultura: 1,27 mM de Ca(NO₃)₂·2H₂O, 0,87 mM de MgSO₄·7H₂O, 0,99 mM de KNO₃, 0,7% de ágar com pH ajustado para 7,0, variando as concentrações de sacarose e de ácido bórico. As avaliações foram realizadas 24 horas após a distribuição do pólen no meio de cultura. O meio de cultura padrão para germinação de grãos de pólen suplementado com 15% de sacarose proporcionou uma maior percentagem de germinação para os diplóides de bananeira avaliados. A concentração de ácido bórico adicionado ao meio de cultura para a germinação de grãos de pólen de bananeira diplóide é dependente do genótipo.

Termos para indexação: *Musa acuminata*, diplóides, germinação, tubo polínico.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the germination of pollen grain and pollen tube length of banana diploids (M53, 8987-01 and 9197-03, Calcutta, Lidi and 86B79-12). Five concentrations of sucrose (0, 5, 10, 15 and 20%) and six concentrations of boric acid (0, 100, 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹) were used, in a completely randomized experimental design, with four replicates. The pollen was distributed in Petri dishes containing the following culture medium: 1.27 mM Ca(NO₃)₂·2H₂O, 0.87 mM MgSO₄·7H₂O, 0.99 mM KNO₃, and 0.7% agar; pH adjusted to 7.0, varying the sucrose and boric acid concentrations. The evaluations were performed 24 hours after the distribution of the pollen in the culture medium. The standard culture medium for germination of pollen grains with 15% sucrose provided the highest germination percentage for the banana diploids. The concentration of boric acid added to the culture medium for pollen grain germination of diploid banana is dependent on the genotype.

Index terms: *Musa acuminata*, diploids, germination, pollen tube.

(Recebido em 13 de janeiro de 2009 e aprovado em 6 de julho de 2010)

INTRODUÇÃO

A transferência de genes de interesse em espécies cultivadas, muitas vezes, é limitada em virtude das barreiras existentes durante o processo de polinização, fertilização e embriogênese (Zenkler, 1990).

A fertilidade do grão de pólen é condição preliminar indispensável ao melhoramento genético clássico, uma vez que dados sobre a viabilidade e o desenvolvimento de grãos de pólen são fundamentais para os estudos da biologia reprodutiva e para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, pois permitem obter maiores sucessos nos cruzamentos realizados (Flanklin et al., 1995).

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado em testes de viabilidade de pólen (Marcellán & Camadro, 1996). Entretanto, o desenvolvimento desse método é influenciado por diferentes fatores, entre eles: os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação. A cultura de tecido vem sendo utilizada no intuito de melhorar os meios de culturas *in vitro* e suas várias funções (Camolesi, et al., 2010). A viabilidade do pólen também é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da flor, quando da coleta do pólen, e pelas condições de armazenamento (Stanley & Linskens, 1974).

O meio básico usado nesses testes é constituído de açúcar e de ácido bórico, podendo variar ainda a

¹Universidade Federal de Viçosa/UFV – Avenida P. H. Holsfs – s/n – 36570-000 – Viçosa, MG – ronaldo.viana@ufv.br

²Universidade Estadual de Feira de Santana/UEFS – Feira de Santana, BA

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa – Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas, BA

⁴Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/UENF – Campos dos Goytacazes, RJ

combinação de outros nutrientes (Galletta, 1983, Miranda & Clement, 1990). O açúcar promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, e fornece energia para o desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974). O boro estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade destes se romperem (Franzon & Raseira, 2006).

A adição de ácido bórico, de um modo geral, aumenta a eficiência da sacarose na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (Almeida et al., 1987). O boro juntamente com o cálcio são elementos essenciais para o início do prolongamento da intina e formação do tubo polínico *in vitro* (Brewbaker & Kwack, 1963).

Pio et al. (2004), em algumas cultivares de *Citrus*, observaram que o boro na concentração de 200 mg L⁻¹ estimula a germinação de grãos de pólen das cultivares Pêra e Natal. Silva et al. (1999) concluíram que 200 mg L⁻¹ de ácido bórico forneceu as melhores condições para germinação dos grãos de pólen do maracujazeiro amarelo. Almeida et al. (1987), trabalhando com grãos de pólen de algodão mostraram que 300 mg L⁻¹ de ácido bórico obteve maior porcentagem de germinação.

A germinação de grão de pólen de citros, na ausência de boro resulta em maior rompimento das membranas do tubo polínico, liberando o conteúdo citoplasmático para o meio exterior (Pio et al., 2004).

A germinação *in vitro* de grãos de pólen de macieira não teve efeito positivo na presença de ácido bórico (Dantas et al., 2005). A adição de boro ao meio de cultura mostra respostas variáveis, conforme a espécie e seu mecanismo de ação, consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (Pfahler, 1967; Askin et al., 1990).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a germinação de grãos de pólen e o comprimento do tubo polínico de diplóides de bananeira em meio de cultura padrão com diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Como material vegetal foram utilizados grãos de pólen de bananeira de seis diplóides gerados pelo programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura tropical, resistentes à Sigatoka Negra.

Coletaram-se brácteas contendo flores masculinas de cada genótipo às 8 horas da manhã, que foram encaminhadas para o laboratório para serem trabalhadas em câmara de fluxo laminar.

Os grãos de pólen foram retirados das anteras, com auxílio de um bisturi e misturados em placa de Petri, em seguida, com um pincel foram distribuídos na superfície do meio de cultura, de modo a promover uma distribuição mais homogênea do material. Os grãos de pólen dos diplóides M53, 9179-03 e 8987-01 foram distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 30 mL de meio de cultura 300 mg L⁻¹ de Ca(NO₃)₂.2H₂O, 200 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 100 mg L⁻¹ de KNO₃, 1,62 mM de H₃BO₃, 0,7% de Agar com pH ajustado para 7,0, variando-se a concentração de sacarose (0, 5, 10, 15, 20%). Os grãos de pólen dos diplóides Calcutá, Lidi, 86B79-12, 8987-01 e 9179-03 foram distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 30 mL de meio de cultura [300 mg L⁻¹ de Ca(NO₃)₂.2H₂O, 200 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 100 mg L⁻¹ de KNO₃, 15% de sacarose 0,7% de agar com pH ajustado para 7,0 variando seis concentrações de ácido bórico (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹). Os meios de cultura foram autoclavados à 120° C por 15 min.

As placas foram mantidas em condições controladas de temperatura (27±1° C), no escuro, antes de se realizar a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento do tubo polínico.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com 15 tratamentos, com três diplóides (M53, 8987-01 e 9179-03), cinco doses de sacarose (0; 5; 10; 15 e 20%) e quatro repetições.

O segundo experimento seguiu o mesmo delineamento, com 30 tratamentos, foi realizado com cinco diplóides de bananeira (Lidi, 8987-01, 9179-03, Calcuta e 86B79-12), seis concentrações de ácido bórico (0,0; 100; 200; 300; 400 e 500 mg L⁻¹) e quatro repetições.

As avaliações foram realizadas 24 horas após a distribuição do pólen no meio de cultura. Foram considerados germinados os grãos de pólen onde o comprimento do tubo polínico atingisse ou ultrapassasse o seu diâmetro. Com auxílio de um estereomicroscópio procedeu-se à contagem dos grãos de pólen germinados e o comprimento do tubo polínico foi medido, utilizando uma ocular micrométrica e os dados foram transformados para milímetros. Foram contabilizados grãos de pólen germinados e não-geminados, e para o comprimento foram selecionados aleatoriamente dez tubos polínicos e mensurados em cada repetição.

Os dados foram submetidos a análise de variância e os graus de liberdades entre os fatores, assim com de suas interações, foram desdobrados via teste de comparações de médias e análise de regressão polinomial, com nível de significância a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças significativas nos valores de germinação dos grãos de pólen, tanto dentro das concentrações de sacarose quanto entre diplóides.

Observaram-se uma grande quantidade de grãos de pólen estourados nos genótipos em meio sem sacarose (Figura 1). A germinação desses genótipos foi muito baixa, variando de 0,25% do diplóide M53 a 6,62% para o diplóide 8987-01 (Tabela 1). Segundo Stanley & Linskens (1974), a sacarose promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, e fornece energia para o desenvolvimento do tubo polínico.

Em todas as concentrações de sacarose, o diplóide 9179-03 apresentou o mais baixo percentual

de germinação (Figura 2), seus valores de germinação variou de 0,25% na concentração de 0% de sacarose a 6,7% na concentração de 15% de sacarose demonstrando a baixa eficiência de germinação dos grãos de pólen desse genótipo (Tabela 1).

O diplóide 8987-01 apresentou níveis de germinação, variando de 6,62% na concentração 0% de sacarose a 62,82% na concentração de 15% de sacarose (Tabela 1). O que demonstra uma diferença significativa entre esses dois genótipos em relação a sua germinação e esses dados são importantes e vêm sendo usados para orientar novos cruzamentos dentro do programa de melhoramento de diplóides da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.



Figura 1 – Grãos de pólen do diplóide 9179-03 em meio de cultura padrão sem sacarose.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação de grãos de pólen dos diplóides de bananeira 9197-03, M-53 e 8987-01 em meio de cultura padrão com diferentes doses de sacarose (0, 5, 10, 15 e 20%), Cruz das Almas - BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008.

Doses de sacarose (%)	Diplóide 9179-03 (%)	Diplóide M-53 (%)	Diplóide 8987-01 (%)
5	2,38cB	16,47bC	43,07aB
10	4,93bA	33,45aB	34,89aB
15	6,72bA	69,33aA	62,82aA
20	1,66bB	55,31aA	57,02aA
0	0,25cC	1,17bD	6,62aC

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Dentre os diplóides avaliados, o M-53 teve o maior índice de germinação (Figura 3), apresentando um alto nível de germinação 69% na concentração de 15% de sacarose (Tabela 1). Dentre outras características favoráveis desse diplóide como resistência a doenças, essa alta germinação é uma das mais importantes, pois, este diplóide é muito usado em programas de melhoramento dessa cultura. A viabilidade de seus grãos de pólen é fundamental para a transmissão de suas características favoráveis.

Dentre as concentrações de sacarose testadas, a melhor resposta em germinação foi obtida na concentração de 15% sacarose, uma vez que, os diplóides M53 e 8987-01 tiveram os maiores percentuais de germinação, 69,33% e 62,82%, respectivamente, já, o diplóide 9179-03 apresentou baixos percentuais de germinação 6,72% (Tabela 1).

A análise de variância dos dados da germinação de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico de cinco diplóides de bananeira e seis concentrações de ácido bórico revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) para todos os fatores.

As médias de germinação de grãos de pólen dos diplóides de bananeira submetidos a diferentes concentrações de ácido bórico são apresentadas na Tabela 2. Para essa variável, observa-se que na ausência de ácido bórico, não houve diferenças entre os diplóides

estudados, com taxas abaixo de 4%. As maiores porcentagens de germinação foram obtidas para o diplóide 8987-01, nas concentrações de 200 e 400 mg L⁻¹ e para o diplóide 9179-03 na concentração de 300 mg L⁻¹, com valores de 87,71, 79,48 e 82,59%, respectivamente. Valores semelhantes foram obtidos por Silva et al. (1999), que concluíram que 200 mg L⁻¹ de ácido bórico forneceu as melhores condições para germinação dos grãos de pólen do maracujazeiro amarelo.

Com relação ao comprimento do tubo polínico, os valores variaram, também, conforme o diplóide estudado e as concentrações utilizadas (Tabela 2). Para a concentração de 300 mg L⁻¹, o diplóide Lidi foi estatisticamente superior às demais, com 20,06 mm. Para a concentração de 500 mg L⁻¹, os diplóides Lidi e 86B79-12, não diferiram estatisticamente entre si, com valores de 19,50 e 21,38 mm, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre os diplóides para as concentrações de 0 e 400 mg L⁻¹. Dantas et al. (2005), mostraram que o ácido bórico não teve efeito positivo para essa característica em experimento com maçã, enquanto Milutinovic et al. (1996), obtiveram resultados positivos utilizando ácido bórico em variedades distintas de macieiras, 64,2 e 88,3% de germinação para as cultivares Jonathan e Golden Delicious, respectivamente.

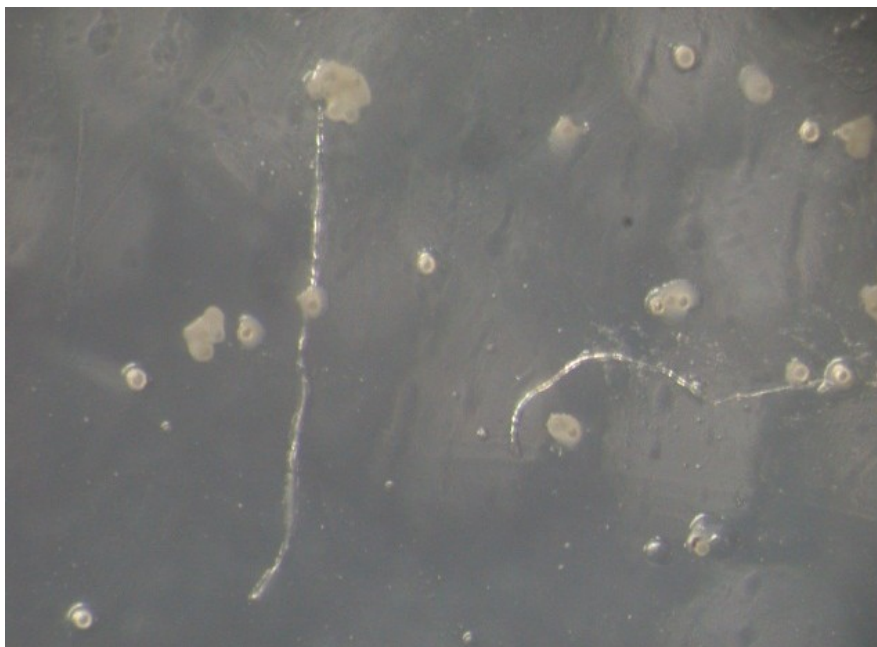


Figura 2 – Grãos de pólen do diplóide 9179-03 em meio de cultura padrão com 15% de sacarose.



Figura 3 – Grãos de pólen do diplóide M53 em meio de cultura padrão com 15% de sacarose.

Tabela 2 – Valores médios de germinação de grãos de pólen e comprimento de tubo polínico para os diplóides de bananeira submetidas a diferentes concentrações de ácido bórico (mg L^{-1}) Cruz das Almas - BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008.

Variedades	Concentrações de ácido bórico					
	0	100	200	300	400	500
Grãos de pólen germinados (%)						
Calcutá	0,1761 a	75,8256 a	25,9337 c	36,4547 c	66,1168 b	62,3547 a
Lidi	1,7951 a	79,0147 a	60,4389 b	65,7016 b	55,3873 c	59,1242 a
9179-03	1,6265 a	29,5985 b	32,3935 c	82,5949 a	36,8211 d	40,2662 b
8987-01	1,8243 a	74,4967 a	79,4844 a	41,3237 c	87,7106 a	3,1344 c
86B79-12	3,1344 a	31,7061 b	53,1434 b	68,4778 b	49,8704 d	68,0381 a
Comprimento do tubo polínico (mm)						
Calcuta	8,0000 a	16,2500 a	11,5625 c	12,8750 b	14,5625 a	13,9375 b
Lidi	3,2500 a	10,5000 b	18,2500 a	20,0625 a	16,3750 a	19,5000 a
9179-03	3,2500 a	17,5000 a	15,1875 b	15,3125 b	15,3125 a	14,4375 b
8987-01	4,0833 a	20,1875 a	18,0000 a	16,6875 b	17,5625 a	6,0000 c
86B79-12	6,0000 a	17,7500 a	21,1250 a	16,8125 b	12,9375 a	21,3750 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Tukey 5% de probabilidade do erro.

Na Tabela 3, são apresentados às equações polinomiais ajustadas, com seus respectivos valores dos coeficientes de determinação e pontos de máximo, para os

diferentes diplóides de bananeira em função das concentrações de ácido bórico (mg L^{-1}). Para a variável porcentagem de germinação dos grãos de pólen para o

Tabela 3 – Equações polinomiais, coeficientes de determinação (R²) e pontos de máximo de germinação de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico para diplóides de bananeira submetidos a diferentes concentrações de ácido bórico (mg L⁻¹). Cruz das Almas - BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008.

Variedades	Equação	R ²	Ponto de máximo
Grãos de pollen germinados (%)			
Calcutá	-(¹)	-	-
Lidi	$\hat{y}^{**} = -0,0006x^2 + 0,3617x + 17,887$	0,5705	301,4167 Máx.
9179-03	$\hat{y}^{**} = -0,0006x^2 + 0,3587x - 0,5803$	0,6437	298,9167 Máx.
8987-01	$\hat{y}^{**} = -0,0011x^2 + 0,5564x + 10,479$	0,6148	252,9091 Máx.
86B79-12	$\hat{y}^{**} = -0,0004x^2 + 0,3021x + 4,93$	0,8900	377,625 Máx.
Comprimento do tubo polínico (mm)			
Calcutá	-	-	-
Lidi	$\hat{y}^{**} = -0,0001x^2 + 0,088x + 3,5134$	0,9136	440,0000 Máx.
9179-03	$\hat{y}^{**} = -0,0001x^2 + 0,0734x + 6,0134$	0,6657	367,0000 Máx.
8987-01	$\hat{y}^{**} = -0,0002x^2 + 0,1127x + 6,2202$	0,8013	281,7500 Máx.
86B79-12	-	-	-

(¹)sem ajuste de equações significativas com significado biológico.

diplóide Calcutá, não foi possível o ajuste de equação significativa e com significado biológico. As concentrações que propiciaram a máxima germinação para os diplóides 8987-01 e 86B79-12 variaram de 252, 91 a 377, 63 mg L⁻¹, respectivamente. A variável comprimento do tubo polínico para os diplóides Calcutá e 86B79-12, não foi possível o ajuste de equação significativa e com significado biológico. Os valores de ácido bórico para os diplóides 8987-01 e Lidi que propiciaram o maior comprimento do tubo polínico variaram de 281,75 a 440,00 mg L⁻¹, respectivamente.

Os resultados obtidos neste experimento são semelhantes ao encontrados em outras espécies (Almeida et al., 1987; Silva et al., 1999; Pio et al., 2004).

CONCLUSÕES

O meio de cultura padrão para a germinação de grãos de pólen suplementado com 15% de sacarose, proporciona uma maior percentagem de germinação para os diplóides de bananeira avaliados.

A concentração de ácido bórico adicionado ao meio de cultura para a germinação de grãos de pólen de bananeira diplóide é dependente do genótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.C.G.; SILVA, J.F. da; ALVES, J.F.; SILVA, F.P. da; ALMEIDA, F.A.G. Estudo da germinação do

pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L. *in vitro*: II., efeitos do ácido bórico e do sulfato de manganês. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.18, n.1, p.117-123, 1987.

ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise**, Dergise, v.27, n.3, p.105-116, 1990.

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

CAMOLESI, M.R.; MARTINS, A.N.; SOUZA, L.D. de; SACONI, C.G. Enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) em diferentes meios de cultivo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.6, p.1446-1451, nov./dez., 2010.

DANTAS, A.C. de M.; PEIXOTO, M.L.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.356-359, 2005.

- FLANKLIN, F.H.C.; LAWRENCE, M.J.; FLANKLIN-TONG, V.E. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. **International Review of Cytology**, Cambridge, v.158, p.1-62, 1995.
- FRANZON, R.C.; RASEIRA, M.C.B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (MYRTACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.18-20, 2006.
- GALLETA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Eds.). **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University, 1983. p.23-47.
- MARCELLÁN, O.N.; CAMADRO, E.L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.67, p.101-104, 1996.
- MILUTINOVIC, M.; MOMIROVIC, G.S.; NIKOLIC, D. Functionality of poll and fruit set in apples. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.423, p.167-169, 1996.
- MIRANDA, P.A.; CLEMENT, C.R. Germination and storage of pejobaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v.38, n.1, p.29-33, 1990.
- PFAHLER, P.L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium and boron effects. **Canadian Journal of Botany**, Toronto, v.45, p.839-845, 1967.
- PIO, L.A.S.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M.; RAMOS, J.D.; ARAÚJO, A.G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Goiânia, v.10, n.3, p.293-296, 2004.
- SILVA, M.M.; BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C.D. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.3, p.347-352, mar. 1999.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer-Verlag, 1974. 172p.
- ZENKTELER, M. *In vitro* fertilization and wide hybridization higher plants. **Critical Review in Plant Sciences**, London, v.9, n.3, p.267-279, 1990.