

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOÇA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E FERTILIDADE EM BANANEIRAS
DIPLOIDES E TRIPLOIDES**

ALESSANDRA OLIVEIRA BARBOSA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JUNHO 2015**

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E FERTILIDADE EM BANANEIRAS
DIPLOIDES E TRIPLOIDES**

ALESSANDRA OLIVEIRA BARBOSA

Bióloga
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como critério avaliativo para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADORA: JANAY ALMEIDA DOS SANTOS-SEREJO

COORIENTADORA: FERNANDA VIDIGAL DUARTE SOUZA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS – BA – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

B223 Barbosa, Alessandra Oliveira.

Aspectos reprodutivos e fertilidade em bananeiras diploides e triploides / Alessandra Oliveira Barbosa – Cruz das Almas, BA. 2015. 79 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Janay Almeida dos Santos Serejo
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Dissertação (Mestrado Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Federal da Bahia do Recôncavo da Bahia, 2015.

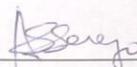
1. Banana. 2. Estigma. 3. Esterilidade. I. Serejo, Janay Almeida dos Santos. II. Souza, Fernanda Vidigal Duarte. III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia V. Título.

CDD: 634.7723 (21.ed.)

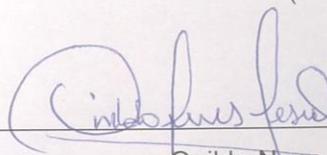
Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro- Bibliotecária CRB51161 – Embrapa Mandioca e Fruticultura

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

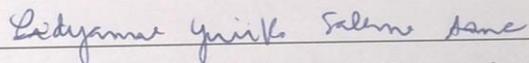
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ALESSANDRA OLIVEIRA BARBOSA



Jaňay Almeida dos Santos-Serejo
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)



Onildo Nunes de Jesus
Embrapa Mandioca e Fruticultura



Lidyanne Yuriko Saleme Aona
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos
Genéticos Vegetais em.....
conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais
em.....

A DEUS,

por ser o meu Guia e Protetor em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais **LUIZ PAULO LOPES BARBOSA** e

AURELICE OLIVEIRA BABOSA,

por me gerar, amar e muitas vezes abdicar dos seus sonhos
em prol da minha felicidade;

Ao meu noivo **NADSON PASSOS,**

pelo amor e companheirismo,

pelos momentos de consolo e alegria

e por fazer a diferença em minha vida a cada dia;

A **TODOS** que acreditaram e desejaram a minha vitória.

Dedico e agradeço

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo, pela oportunidade a mim concedida para realização desse trabalho, pela sua doçura e atenção, e pelos ensinamentos ao longo desses anos;

À Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o mestrado, pela ajuda e orientação;

Ao Dr. Everton Hilo de Souza, pela atenção, paciência, dedicação, amizade e encorajamento na realização desse trabalho, pois sem seu apoio, a caminhada seria muito mais árdua;

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por possibilitar a minha formação;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, por garantir infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho;

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/ USP e a Bióloga Mônica Lanzoni Rossi do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do CENA/ USP pelas análises e imagens realizadas de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A todos os docentes e pesquisadores da UFRB e Embrapa que de alguma forma, contribuíram diretamente para minha formação intelectual, ética e moral.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, Práticas Culturais de Banana, Fitopatologia, Biologia Molecular e Virologia Vegetal, pelo auxílio, amizade e compreensão.

A todos os amigos pela compreensão, dedicação e solidariedade.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigada!

SUMÁRIO

| | PÁGINA |
|---|--------|
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| Capítulo 1 | |
| ASPECTOS REPRODUTIVOS EM BANANEIRAS DIPLOIDES E TRIPLOIDES..... | 12 |
| Capítulo 2 | |
| DINÂMICA DO CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM BANANEIRAS DIPLOIDES E TRIPLOIDES..... | 46 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 69 |

ASPECTOS REPRODUTIVOS E FERTILIDADE EM BANANEIRAS DIPLOIDES E TRIPLOIDES

Autora: Alessandra Oliveira Barbosa

Orientadora: Janay Almeida dos Santos Serejo

Coorientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

RESUMO:

A banana está entre as principais frutas consumidas no mundo. A grande maioria das cultivares é triploide e apresenta diferentes níveis de esterilidade. As variedades mais aceitas pelo mercado internacional são as do subgrupo Cavendish que apresenta problemas no melhoramento genético por seu alto nível de esterilidade. Esse trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade polínica, assim como a morfoanatomia no que se refere à receptividade do estigma, e a dinâmica do crescimento do tubo polínico do estigma até o óvulo em bananeiras diploides e triploides, a fim de se verificar a existência de barreiras físicas que inviabilizem a fertilização em bananeira. Os grãos de pólen dos genótipos diploides e triploides são similares quanto ao tamanho e morfologia. Alta viabilidade polínica e receptividade estigmática ocorreram às 8 horas da manhã, no início da antese. A fertilização nos diploides ocorreu 32 horas após a polinização com geração de grande número de sementes. Nas cultivares triploides foram observadas diferentes anormalidades no crescimento do tubo polínico na região do nectário, que apresentou uma necrose, que impediu que os óvulos fossem fertilizados e, conseqüentemente houvesse a formação de sementes. Os resultados obtidos sugerem que a causa dos diferentes níveis de esterilidade em bananeiras triploides pode estar relacionada à presença desta região necrosada no nectário floral.

Palavras chave: *Musa* spp., estigma, esterilidade, fertilização *in vivo*, grãos de pólen.

REPRODUCTIVE ASPECTS AND FERTILITY IN DIPLOID AND TRIPLOID BANANA TREES

Author: Alessandra Oliveira Barbosa

Advisor: Janay Almeida dos Santos Serejo

Co-advisor: Fernanda Vidigal Duarte Souza

ABSTRACT: *Bananas* are among the most widely *consumed* foods in the *world*. The majority of cultivars are triploid and presents different levels of sterility. The varieties most widely accepted by the international market are the Cavendish, which presents problems in breeding for its high level of sterility. This work aimed to study the pollen viability, as well as morphoanatomy with regard to stigma receptivity and the dynamics of pollen tube growth of stigma to the egg in diploid and triploid bananas in order to verify the existence of physical barriers that can cause the sterility in banana. The pollen grains of diploid and triploid genotypes are similar in size and morphology. High pollen viability and stigmatic receptivity occurred at 8 am (anthesis). The diploid fertilization occurred 32 hours after pollination with generation of large numbers of seeds. In triploid cultivars were observed different abnormalities in pollen tube growth at the nectary region, who presented necrosis, which prevented the eggs fertilization and consequently the formation of seeds. These results suggest that different levels of sterility in triploid banana may be related to the presence of the necrotic region in floral nectary.

Key words: *Musa* spp.; stigma, in vivo fertility; sterility, pollen grains.

INTRODUÇÃO

Importância da cultura

A bananicultura é uma atividade de grande importância econômica e social nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em 2013 a produção atingiu cerca de 144,56 milhões de toneladas em uma área cultivada de 10,36 milhões de hectares, sendo a Índia, China, Filipinas, Equador e Brasil os maiores produtores. O Brasil é responsável por 6,46 % da produção mundial, que corresponde a 6,89 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 512,6 mil hectares (FAO, 2015).

No Brasil, a bananeira é a segunda fruteira mais cultivada, e além do expressivo volume produzido e da área ocupada é de suma importância por estar presente na mesa da maioria da população.

O mercado mundial concentra-se nas cultivares do subgrupo Cavendish como a 'Grande Naine', enquanto que as cultivares mais apreciadas no Brasil são dos subgrupos Prata, Maçã e Terra (Plátanos) (SILVA et al., 2001a). Entretanto, todas estas cultivares são suscetíveis a uma ou mais das principais doenças da cultura Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra e Mal-do-Panamá.

A criação de variedades de bananeira que sejam aceitáveis ao mercado e resistentes às principais doenças da cultura tem sido dificultada pela ocorrência de diferentes níveis de esterilidade nas bananeiras triploides, que resultam na ausência ou baixa produção de sementes em cruzamentos com genótipos diploides que apresentam algumas características agrônômicas favoráveis.

Em virtude dessas considerações, tendo em vista o problema da esterilidade nas cultivares triploides esse trabalho teve como objetivo geral estudar a viabilidade polínica, assim como a morfoanatomia no que se refere à receptividade do estigma, e a dinâmica do crescimento do tubo polínico do estigma até o óvulo em bananeiras diploides e triploides, a fim de se verificar a existência de barreiras físicas que inviabilizem a fertilização em bananeira.

Classificação botânica

O processo evolutivo das cultivares de banana ocorreu no continente Asiático, embora existam centros secundários de origem na África central e nas ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidade na África ocidental (CHAMPION, 1967; SOTO, 1992).

As bananeiras pertencem à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, ordem Zingiberales, família Musaceae e gênero *Musa*. A taxonomia do gênero *Musa* que divide o gênero em cinco seções, *Eumusa* ($x=11$), *Rhodochlamys* ($x=11$), *Australimusa* ($x=10$), *Callimusa* ($x=9, 10$) e *Ingentimusa* ($x=7$), tem sido questionada e vários reagrupamentos têm sido sugeridos. Estudos com diversos tipos de marcadores moleculares indicam a necessidade de uma revisão das seções do gênero *Musa* (BARTOS et al., 2005; LI et al, 2010; LIU et al., 2010). Com base nestes resultados, Häkkinen (2013) reduziu o número de seções para duas, a seção *Musa* que englobou as antigas seções *Eumusa* e *Rhodochlamys*, e a seção *Callimusa*, que englobou as seções *Callimusa*, *Australimusa* e *Ingentimusa*. O conteúdo 2C de DNA na seção *Musa* varia de 1,217 a 1,315 pg, enquanto que as espécies pertencentes à seção *Callimusa* apresentam 2C DNA variando de 1,390 a 1,772 pg (Čížková et al., 2015).

Cruzamentos entre espécies diploides selvagens de *Musa acuminata* (genoma A) e de *M. balbisiana* (genoma B), ambas pertencentes à seção *Musa*, deram origem a variedades diploides ($2n = 2x = 22$), triploides ($2n = 3x = 33$) e tetraploides ($2n = 4x = 44$), que produzem frutos comestíveis (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Em conformidade com estudos desenvolvidos por Simmonds e Shepherd (1955), vigora a classificação adotada em todo mundo, dos grupos genômicos de bananeiras diploides AA, BB e AB; triploides AAA, AAB e ABB e tetraploides AAAA, AAAB, AABB e ABBB.

Além da classificação considerando o grupo genômico, foi designado o termo subgrupo para nomear as cultivares que de alguma forma vieram de mutações de uma única cultivar original, a exemplo dos subgrupos 'Cavendish' (AAA), 'Prata' e 'Terra' (AAB) (SILVA et al., 2002).

A bananeira é considerada uma planta herbácea, com pseudocaule aéreo que tem origem de um rizoma (caule verdadeiro). As suas raízes têm origem na parte central dessa estrutura, na união entre o cilindro central e o

córtex, e distribuindo-se por toda a superfície do rizoma, em processo de diferenciação constante (SOTO, 1992).

O crescimento das folhas se inicia a partir do ponto de crescimento do rizoma, sendo que cada uma se desloca pelo interior do pseudocaulo, emergindo em formato de vela. As folhas são constituídas de bainha, pecíolo, limbo foliar, nervuras e aguilhão, sendo emitidas a cada sete a onze dias (SIMMONDS, 1966; MOREIRA, 1999).

A inflorescência masculina (coração) é constituído de brácteas que vão se soltando e expondo as flores que se desidratam e caem, formando um eixo chamado de ráquis. Os grãos de pólen apresentam coloração amarelada, podendo ser inviáveis em grande parte das cultivares de bananeira (CASTRO; KLUGE, 1988; DANTAS et al., 1999). A inflorescência é do tipo terminal, crescendo através do pseudocaulo para alcançar a superfície na copa da planta e seu desenvolvimento converterá na formação do cacho (SOTO, 1992).

As flores da bananeira caracterizam-se por se apresentarem em formato de inflorescência e possuir ovário ínfero trilobular, com vários óvulos por lóculos, estilete único e estigma trilobado, sendo que nas flores femininas os ovários são bem desenvolvidos enquanto que nas flores masculinas o ovário é atrofiado e os estames apresentam anteras bastante desenvolvidas (CASTRO; KLUGE, 1988).

A antese ocorre mais antecipadamente nas flores femininas do que nas flores masculinas (protoginia) e desse modo, no momento em que os grãos de pólen estão viáveis para a polinização, os ovários das flores femininas já não se encontram mais receptivos, o que dificulta a autofecundação (MOREIRA, 1999). O cacho da bananeira é formado pelo pedúnculo da inflorescência (engajo), os conjuntos de frutos (pencas), o eixo onde partem as flores das inflorescências (ráquis) e pelo conjunto de flores masculinas (coração).

Os frutos de bananeira manifestam duas vias de desenvolvimento, a seminífera e a partenocárpica. As bananeiras selvagens diploides apresentam frutos com sementes. A semente da banana deriva de um óvulo bitegumentar anátropo, dividido em duas câmaras, sendo que na primeira encontra-se o embrião e o endosperma e na segunda a calaza. O tegumento externo é um arcabouço massivo constituído de 30 a 35 camadas de células finas. Além disso, a semente exhibe um formato irregular, geralmente achatado, variando

entre 3 a 6,5 mm de diâmetro, possuindo uma membrana escariosa que recobre a casca que é extremamente dura (Mc GAHAN, 1961).

Nas cultivares, os frutos são produzidos por partenocarpia, ou seja, não apresentam sementes e caracterizam-se como bagas carnosas e alongadas resultantes do desenvolvimento dos ovários das flores femininas de uma inflorescência (CASTRO e KLUGE, 1988).

As bananeiras que apresentam sementes (selvagens), na maioria das vezes são diploides e podem ser propagadas por sementes ou vegetativamente, ao passo que as bananeiras de interesse comercial, as triploides, que não apresentam sementes, são disseminadas apenas por meio da propagação vegetativa (SHEPHERD et al., 1986; MOREIRA, 1999).

Melhoramento genético

As primeiras pesquisas na área de melhoramento genético de bananeira ocorreram no final de 1920, motivadas pela doença do mal-do-Panamá, sendo lançada a primeira cultivar tetraploide, a partir de uma cultivar triploide AAA (Gros Michel) com um diploide AA (selvagem). Com base nesse princípio iniciou-se uma estratégia de hibridações com resultados satisfatórios, e que vem permitindo o melhoramento de algumas cultivares diploides e triploides de banana (SHEPHERD, 1992; SILVA et al. 2001b).

O programa de melhoramento genético da bananeira, conduzido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, iniciou em 1983 e baseia-se principalmente no melhoramento de diploides, e posterior cruzamento destes com triploides, gerando híbridos tetraploides, que sejam produtivos e resistentes às principais doenças (SILVA et al., 2004). Os genótipos diploides contribuem com resistência às principais doenças existentes, tais como mal-do-Panamá, Sigatoka amarela, Sigatoka-negra, moko, e também outras características de interesse. A concentração de um maior número de características favoráveis em um único genótipo, como partenocarpia, elevado número de frutos e pencas, maior comprimento de dedos, boa formação de cachos e resistência às doenças, é de suma importância para a posterior transferência delas para as variedades triploides comerciais, mediante a síntese do tetraploide (DANTAS et al., 1993; AMORIM et al., 2013).

Como os híbridos tetraploides apresentam alguns inconvenientes como frutos muito grandes, despencamento dos frutos e certo nível de fertilidade que leva a formação de sementes, o programa de melhoramento da Embrapa tem utilizado a estratégia de realizar cruzamentos dos híbridos tetraploides com diploides melhorados a fim de se obter triploides secundários, com a vantagem de se obter cultivares com frutos menores, que são os preferidos pela maioria dos consumidores, sem o problema do despencamento e que não produzem sementes (AMORIM et al., 2013).

Além da Embrapa Mandioca e Fruticultura no Brasil, outros centros de pesquisas ao redor do mundo realizam melhoramento genético da bananeira, como a *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA), em Honduras; o *Internacional Institute of Tropical Agriculture* (IITA), na Nigéria; o *National Research Centre for Banana* (NRCB) e o *Tamil Nadu Agricultural University* (TNAU), na Índia; o *Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains* (CARBAP), nos Camarões; e o *La recherche agronomique pour le développement* (CIRAD), em Guadalupe.

No mercado internacional, se destacam as cultivares do grupo 'Cavendish' que, no entanto, são difíceis de serem melhoradas geneticamente em razão do elevado grau de esterilidade. A ausência de sementes nas cultivares também pode estar relacionada à intensa seleção agrônômica para essa característica, devendo ser, portanto, um reflexo do processo de obtenção dessas cultivares sem semente ou talvez de alguns outros fatores ainda não investigados (SHEPHERD et al., 1986).

Shepherd et al. (1987) afirmaram que a esterilidade em bananeira pode ocorrer devido a um crescimento tardio e irregular do tubo polínico; diminuição da taxa de crescimento do pólen de alguns genótipos; tubos polínicos curtos, que não atingem o óvulo; ocorrência de sementes somente nos frutos das primeiras pencas de algumas cultivares e necrosamento precoce na região do nectário das flores femininas impedindo a passagem do tubo polínico. Entretanto, não existe na literatura estudos sobre a dinâmica do crescimento do tubo polínico em cultivares de bananeira que evidenciem a ocorrência dos eventos citados acima.

Anormalidades meióticas são registradas como sendo uma das causas de esterilidade em variedades de bananeiras (SHEPHERD et al., 1987;

FORTESCUE; TURNER, 2005). De modo geral, os triploides exibem uma alta frequência de distúrbios meióticos, que vão desde as fases iniciais até o final da meiose. A formação de univalentes, ascendência precoce de cromossomos, fuso anormal com segregação irregular, cromossomos aderentes, até a formação de células com tamanhos desiguais, eliminação de cromossomos, citomixia (migração de organelas, produtos gênicos e material genético entre meiócitos por meio de conexões citoplasmáticas), células binucleadas são algumas anormalidades observadas (LINDE-LAURSEN; BOTHMER, 1993; PAGLIARINI, 2000; TECHIO et al., 2007).

Aspectos da polinização em bananeira

A polinização é um evento de extrema importância para a manutenção da biodiversidade da flora e essencial para a propagação de muitas espécies (GULLAN, 2007). É fundamental o estudo da polinização a fim de se investigar as causas da esterilidade em plantas, como também para a compreensão da reprodução de uma população e da ocorrência de possíveis problemas de fertilidade (PEÑALOZA, 1995).

Com base no processo de polinização, a viabilidade do pólen é um parâmetro de elevada importância, pois, além de destacar o potencial reprodutor masculino da espécie, auxilia em estudos ecológicos e taxonômicos, fornecendo informações primordiais para o melhoramento e conservação genética (GUINET 1989).

A viabilidade polínica consiste em um dos fatores essenciais ao melhoramento de plantas, visto que cada grão de pólen carrega consigo os materiais genéticos oriundos da recombinação, transferindo-os à próxima geração (SOUZA et al. 2002).

Considerando-se que a exibição do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição cedida pelos gametas no momento da fertilização, quanto maior a taxa de viabilidade polínica, maior será a probabilidade de combinações variadas entre os alelos, e de modo consequente, da variabilidade genética (AKORODA, 1983). A perda da viabilidade dos grãos de

pólen em diferentes espécies tem sido correlacionada com a perda de água e a manutenção do estado de desidratação tanto em condições naturais como em laboratório (LINSKENS; CRESTI, 1988; NEPI; PACINI, 1993).

A viabilidade do grão de pólen pode ser estimada através de diferentes técnicas como a indução da germinação *in vitro* e *in vivo* e parâmetros citológicos como a coloração utilizando corantes específicos (KEARNS; INOUE, 1993; SOARES et al. 2008; 2014; 2015). Contudo, deve-se ter cuidado na escolha do teste de viabilidade, pois no uso de testes colorimétricos, os corantes podem reagir com estruturas ou constituintes celulares, causando erros de leitura e interpretação nos resultados obtidos (STANLEY; LINSKENS, 1974).

O conhecimento do momento da antese floral de uma espécie também é bastante importante para direcionar o melhor momento da coleta dos grãos de pólen para se obter uma máxima viabilidade e conseqüentemente uma maior produção de sementes (SOARES et al., 2014).

Soares et al. (2015) correlacionando a influência do horário de coleta sobre a viabilidade de grãos de pólen de bananeira, verificou que às 8 horas da manhã, o pólen apresenta uma maior porcentagem de viabilidade, sendo considerado, portanto, o horário mais recomendado para a realização das polinizações.

Outro ponto importante é a receptividade do estigma que é um aspecto de grande relevância para determinação do melhor momento de deposição dos grãos de pólen sobre a flor, para a obtenção de sucesso nas hibridações. Além disso, a receptividade do estigma e os processos de desenvolvimento floral, também se tornam necessários aos estudos da biologia reprodutiva (GRIFFIN; HAND, 1979).

O estigma produz substâncias aderentes que promovem a hidratação, germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no interior do estigma, aumentando a possibilidade de uma provável fertilização, e conseqüentemente, a produção de sementes (TAYLOR; HEPLER, 1997).

A esterilidade em cultivares triploides de bananeira tem dificultado o melhoramento genético da cultura. Portanto, torna-se de grande relevância uma melhor compreensão da morfoanatomia floral, da interação pólen-pistilo e da dinâmica do crescimento do tubo polínico em bananeiras diploides e

triploides, visto a existência de poucos estudos sobre os processos envolvidos a esterilidade.

REFERÊNCIAS

AKORODA, M. D. Floral biology in relation to hand pollination of white yam. **Euphytica**, Wageningen, v.32, n.3, p.831-838, 1983.

AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V.B.O.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O. Banana Breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p.171-176, 2013.

BARTOŠ, J.; ALKHIMOVA, O.; DOLEŽELOVÁ, M.; DE LANGHE, E.; DOLEŽEL, J. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (*Musaceae*): taxonomic implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 50–57, 2005.

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

CHAMPION, J. **Les bananiers et leur culture; Tome I: Botanique et genetique**. Paris: IFAC, 1967. 214 p. 1967.

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

ČÍŽKOVÁ, J.; HŘIBOVÁ, E.; CHRISTELOVÁ, P.; VAN DEN HOUWE, I.; HÄKKINEN, M.; ROUX, N.; SWENNEN, R.; DOLEŽEL, J. Molecular and Cytogenetic Characterization of Wild *Musa* Species. **PLOS ONE** | DOI:10.1371/journal.pone.0134096, v. 10, p. 1-19, 2015.

DANTAS, J. L. L.; SHEPERD, K.; SOARES FILHO, W. S.; CORDEIRO, Z. J. M., SILVA, S. O., SOUZA, A. S. **Citogenética e melhoramento de genético da bananeira (*Musa* spp.)**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF. 61p. (Embrapa-CNPMPF. Documentos, 48).1993.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Faostat. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 17 Apr. 2015.

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

GRIFFIN, A. R.; HAND, F. C. Post-anthesis development of flowers of *Eucalyptus regnans* F Muell and the timing of artificial pollination. **Australian Forestry Research**, Canberra, v. 9, n. 1, p. 9-15, 1979.

GULLAN, P. J. **Os insetos: um resumo de entomologia**. São Paulo: Roca, 2007. p.440.

LI, L-F.; HÄKKINEN, M.; YUAN, Y-M.; HAO, G.; GE, X-J. Molecular phylogeny and systematics of the banana family (*Musaceae*) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus *Musa*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, p. 1–10, 2010.

LINDE-LAURSEN, I. B.; BOTHMER, R. V. Aberrant meiotic divisions in a *Hordeum lechleri* x *H. vulgare* hybrid. **Hereditas**, Lund, v. 118, p. 145-153, 1993.

LINSKENS, H. F.; CRESTI, M. The effect of temperature, humidity and light on the dehiscence of tobacco anthers **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie an Wet.**, Amsterdam, v. 91, p. 369-375, 1988.

LIU, A.Z.; KRESS, W.J.; LI, D.Z. Phylogenetic analyses of the banana family (*Musaceae*) based on nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (trnL-F) evidence. **Taxon**, v. 59, p. 20–28, 2010.

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

MOREIRA, R. S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. Campinas: Fundação Cargill, 1999.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**. Oxford. n. 72, p. 527-536, 1993.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 997-1002, 2000.

PEÑALOZA, A. P. S. **Caracterização de componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae)**. 1995. 82 p.

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

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

SHEPHERD, K. History and methods of banana breeding In: MANAGEMENT REVIEW OF THE INTERNATIONAL NETWORK FOR THE IMPROVEMENT OF BANANA AND PLANTIN. **Report**. The World Bank, Washington, v. 1, p.108-110. 1992.

SILVA, S. O; SANTOS-SEREJO, J. A; CORDEIRO, Z. J. M. Variedades. In: BORGES, A. L; SOUZA, L. S. (Eds.) **O cultivo da bananeira**. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas. p. 45-58. 2004.

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

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

SILVA, S. O.; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. **Banana Breeding Program in Brazil - Recent Results**. Cruz das Almas-BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 39p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura, Documento 122). 2001b.

SIMMONDS, N.W. **Bananas**. 2. ed. London: Longmans Group, 1966. 478p.

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

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.

SOARES, T. L., SOUZA, E. H de, COSTA, M. A. P. C., SILVA, S. O., SANTOS-SEREJO, J. A. *In vivo* fertilization of banana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.1, p.37-42, jan, 2014.

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

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; SAMPAIO, L. F. S.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. Effect of collection time on the viability of banana pollen grains. **African Journal of Botany**. Amsterdam. v. 14, n.14, p. 1207-1214. 2015.

SOTO, B. M. **Bananas: cultivo y comercialización**. 2. ed. San José: LIL, 1992. 674 p.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

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

TAYLOR, L. P.; HEPLER P. K. Pollen Germination and Tube Growth. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 48, p. 41-51, 1997.

TECHIO, V. H; DAVIDE, L. C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 4, p. 7-18, 2007.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS REPRODUTIVOS EM BANANEIRAS DIPLOIDES E TRIPLOIDES¹

¹Artigo a ser ajustado e submetido a Scientia Horticulturae.

ASPECTOS REPRODUTIVOS EM BANANEIRAS DIPLOIDES E TRIPLOIDES

RESUMO: Objetivou-se realizar um estudo sobre a morfoanatomia floral, viabilidade polínica e receptividade do estigma em cultivares diploides e triploides de bananeira. A fertilidade masculina e a morfologia dos grãos de pólen foram estudadas nos genótipos diploides, Calcutta 4 e SH3263, mediante a germinação *in vitro* dos grãos de pólen, testes histoquímicos, acetólise e microscopia eletrônica de varredura. Para os estudos morfoanatômicos do estigma, estilete e porção inicial do ovário utilizou-se microscopia eletrônica de varredura e cortes anatômicos observados em microscopia de luz em quatro genótipos, dois diploides, Calcutta 4 e SH 3263 e dois triploides, Prata-anã e Grande Naine. A receptividade do estigma foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio 3 %. Os grãos de pólen dos genótipos diploides são de tamanho muito grandes, simetria radial, esferoidal, âmbito circular, inaperturado, com ornamentação da exina pisilada. A maior porcentagem de germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico foi observada às 8 horas (antese) permanecendo até às 12 horas. Os testes histoquímicos, TTC e solução de Alexander 2% são os mais adequados para estimar a viabilidade polínica e bananeira, pois indicam valores próximos à germinação *in vitro*. Os estigmas são trilobados com papilas estigmáticas pluricelulares bastante desenvolvidas por toda a superfície. A maior receptividade do estigma ocorreu na antese (às 8 horas) e foi declinando ao passar do tempo. O necrosamento que se encontra na região do nectário da flor feminina, pode estar influenciando os mecanismos de fertilização nos genótipos triploides de bananeira.

Palavras Chave: *Musa* spp., grãos de pólen, germinação *in vitro*, receptividade estigmática, fertilidade, morfoanatomia.

REPRODUCTIVE ASPECTS IN DIPLOID AND TRIPLOID BANANA

ABSTRACT: The aim of this work was to carry out a study on the floral morphoanatomy, pollen viability and stigma receptivity in diploid and triploid cultivars of banana. Male fertility and pollen morphology of the diploid genotypes, Calcutta 4 and SH3263, were studied by in vitro germination of pollen grains, histochemical tests, acetolysis and scanning electron microscopy. For the morphological and anatomical studies of the stigma, style and the initial portion of the ovary the scanning electron microscopy and anatomical cuts were performed using four genotypes, two diploids, Calcutta 4 and SH3263 and two triploids, Prata-anã and Grande Naine. The stigma receptivity was performed with 3% hydrogen peroxide solution. The pollen grains of diploid genotypes have big size, radial symmetry, spheroidal, circular part, inaperturado, with ornamentation of exine plicata. The highest percentage of in vitro germination and length of pollen tube was observed at 8 h (anthesis) remaining up to 12 h. The histochemical tests, TTC and Alexander 2% solution are the most reliable to estimate pollen viability since they indicate values near to the in vitro germination. The stigmas are trilobados with stigmatic multicellular papillae well developed over the entire surface. The major stigma receptivity occurred at 8:00 am (anthesis) and was declining in the course of time. The necrosis in the nectary of the female flower may influence the fertilization mechanisms in triploid genotypes of banana.

Key words: *Musa* spp. L., pollen grains, in vitro germination, stigma receptivity, fertility and morphoanatomy.

INTRODUÇÃO

Pertencente à família Musaceae, a bananeira (*Musa* spp. L.) engloba as espécies *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla, prováveis parentais da maioria das bananeiras comestíveis (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

As variedades triploides são as mais comercializadas no mercado mundial, em virtude de suas características agronômicas favoráveis como melhor palatabilidade e qualidade nutricional, enquanto que os genótipos diploides são importantes para o melhoramento da cultura por serem fonte de alelos de resistência às doenças e outras características de interesse (STOVER; SIMMONDS, 1987).

O melhoramento genético da cultura tem sido impossibilitado devido ao grau de esterilidade presente das cultivares triploides, que gera um número reduzido ou até mesmo a ausência de sementes nos cruzamentos com os diploides férteis. Com isso tornar-se de grande importância o estudo dos aspectos reprodutivos, como a viabilidade polínica e a receptividade estigmática, assim como estudos anatômicos das estruturas reprodutivas, com o objetivo de investigar as possíveis causas dessa esterilidade.

A compreensão da morfologia floral é fundamental para avaliar as interações entre grãos de pólen e estigma, bem como o sucesso reprodutivo das espécies vegetais. Esse conhecimento permite conclusões importantes sobre os genótipos em relação à capacidade de germinação, coleta, condições de armazenamento dos grãos de pólen e o melhor período em que o estigma se encontra receptível ao grão de pólen, garantindo sucesso nos cruzamentos controlados e consequente obtenção de híbridos (STANLEY; LINSKENS, 1974, DAFNI; MAUES, 1998, NUNES et. al., 2001).

A viabilidade polínica pode ser determinada utilizando os seguintes métodos: germinação *in vitro*; *in vivo*, métodos histoquímicos e porcentagem de frutificação efetiva (GALETTA, 1983). Esses parâmetros destacam a potencialidade reprodutiva da espécie e são importantes nos estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos e no melhoramento genético (KRISHNAKUMAR et al., 1992; SOUZA et al., 2014).

A germinação *in vitro* é um dos métodos mais utilizados para determinar a fertilidade dos grãos de pólen e permite observar o desenvolvimento do tubo polínico. O sucesso da germinação *in vitro* depende de vários fatores tais como: espécie vegetal, estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e composição do meio de cultura (TAYLOR; HEPLER, 1997; SOARES et al., 2008).

Dentre os corantes utilizados para estimar a viabilidade dos grãos de pólen destacam-se o carmim acético, solução de Alexander, sudan IV, iodeto de potássio e 2,3,5-cloreto-de-trifeniltetrazólio (STANLEY; LINSKENS, 1974; ALEXANDER, 1980; SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen, fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo.

Outro fator importante em estudos dos aspectos reprodutivos é a receptividade do estigma, pois o sucesso das hibridações depende consideravelmente de reações favoráveis e desfavoráveis que ocorrem entre os grãos de pólen e os tecidos carpelares (DAFNI; MAUES, 1998, DAFNI, 1992, PRECZENHAK, 2011).

Para avaliar essa receptividade, dentre os métodos mais utilizados destaca-se o teste com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por sua facilidade de condução, aplicabilidade, obtenção de material, diagnóstico facilitado e baixo custo. O peróxido de hidrogênio indica a receptividade por meio da formação de bolhas de ar, porém a presença de qualquer dano ao tecido pode levar a um falso resultado (KEARNS; INOUYE, 1993).

Em vista do problema da esterilidade em cultivares triploides, este trabalho teve como objetivo estudar a morfoanatomia, viabilidade polínica e receptividade do estigma, a fim de se obter uma maior compreensão do processo de fertilidade e esterilidade em cultivares diploides e triploides de bananeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizados genótipos de bananeira diploides e triploides do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que se encontra a 12° 40' de latitude sul e 39° 06' de longitude oeste, localizado no município de Cruz das Almas, Recôncavo da Bahia, Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Genótipos de bananeiras diploides e triploides utilizados nos estudos reprodutivos.

| Nome | Grupo Genômico | Características |
|--------------|-----------------------|--|
| Calcutta 4 | AA | Selvagem, produz elevado número de sementes |
| SH3263 | AA | Híbrido selecionado pela Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FIHA), produz elevado número de sementes |
| Prata Anã | AAB | Cultivar, raramente produz sementes em cruzamentos controlados |
| Grande Naine | AAA | Cultivar, elevado nível de esterilidade |

O clima do município de Cruz das Almas, segundo classificação de Köppen, é uma transição entre as zonas Am e Aw, com precipitação pluviométrica média anual de 1.143 mm, temperatura média de 24,28 °C e umidade relativa de 60,47%. O solo da área experimental é um Latossolo Amarelo distrófico típico, A moderado, textura franco-argiloarenosa, caulínico, hipoférrico, fase transição floresta tropical subperenifólia/subcaducifólia com declive de 0 a 3 %.

As condições de manejo fitotécnico se constituem de irrigação por microaspersão, e os tratos culturais seguem as recomendações sugeridas por Alves & Oliveira (1999) e Borges et al. (1999).

Morfologia dos grãos de pólen

Grãos de pólen dos genótipos Calcutta 4 e SH3263 foram fixados em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [paraformaldeído (2 %), glutaraldeído (2 %), cloreto de cálcio (0,001 M), cacodilato de sódio (0,05 M),

em pH 7,2] por 72 horas. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente (35%-100%), de 24 horas cada. As amostras foram secas em hexametildisilazano (HMDS) e montadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas através do microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

A mensuração do tamanho dos grãos de pólen foi realizada em genótipos de Calcutta 4 e SH3263 após submetidos ao processo de acetólise láctica fraca, conforme descrito por Raynal e Raynal (1979). Foi medido o diâmetro de 25 grãos de pólen de cada genótipo por meio do programa ImageJ 1.46 (RASBAND, 2012).

Os grãos de pólen foram caracterizados conforme nomenclatura descrita por Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009). A estimativa do número de grãos de pólen foi realizada segundo a metodologia descrita por Kearns e Inouye (1993), mediante a contagem em três flores masculinas de cada genótipo, levando-se em consideração a existência de seis anteras em cada flor.

Germinação *in vitro* dos grãos de pólen

As flores masculinas dos genótipos Calcutta 4 e SH3263 foram coletadas em campo em diferentes horários: pré-antese (18h do dia anterior à antese); na antese (8h da manhã), e 4, 10 e 24 horas após a antese (respectivamente, às 12h e 18h no dia da antese, e às 8h da manhã no dia seguinte à antese). Os grãos de pólen foram inoculados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 35 mL do meio de cultura descrito por Soares et al. (2008) contendo 0,01 % de ácido bórico, 0,01 % de nitrato de potássio, 0,03 % de nitrato de cálcio, 0,02 % de sulfato de magnésio, 15 % de sacarose, 0,8 % de Agar, com pH 7,0.

Com auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram distribuídos sobre o meio de cultura e depois de acondicionados no escuro, em temperatura de 27 °C, por 24 horas. Procedeu-se a contagem em 12 repetições, dos grãos de pólen germinados e do comprimento do tubo polínico em um estereomicroscópio Leica EZ4 D (Leica, Wetzlar, Alemanha). Para a porcentagem de germinação foram contabilizados todos os grãos de pólen por

repetição. Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

O comprimento do tubo polínico foi determinado aleatoriamente pelo comprimento médio de cinco tubos de cada uma das 12 repetições. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados para arc sem (raiz $X/100$) antes da análise estatística. Para a comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e utilizou-se o teste Tukey a 1 % de probabilidade por meio do programa SAS (2010).

Testes histoquímicos dos grãos de pólen

Os testes histoquímicos foram realizados nos genótipos diploides Calcutta 4 e SH3263 com o uso de três corantes: solução de Alexander 2% (ALEXANDER, 1980), carmim acético 1 % (KEARNS; INOUYE, 1993) e 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992).

Foi adicionada uma gota do respectivo corante sobre a lâmina e uma pequena quantidade de grãos de pólen foi misturada ao corante. Após cobertura com lamínula os grãos de pólen foram observados em microscópio óptico Olympus U-RFL-T (Olympus, Tokyo, Japão). Com o objetivo de se obter uma amostragem ao acaso, foi realizado o método de varredura da lâmina, sendo contabilizados 100 grãos de pólen por lâmina com três repetições, totalizando 300 grãos de pólen para cada corante. Foram considerados viáveis os grãos de pólen que apresentavam a exina intacta e protoplasma bem corado conforme especificação de cada corante e inviáveis os que apresentaram tamanho anormal, coloração fraca, protoplasma reduzido ou ausente. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e utilizou-se o teste Tukey a 1 % de probabilidade por meio do programa SAS (2010).

Morfoanatomia do estigma, estilete e região da necrose do ovário

Foram utilizados três genótipos, Calcutta 4, Prata Anã e Grande Naine, coletados antes da polinização, para os estudos morfoanatômicos. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (KARNOVSK, 1965) modificada [paraformaldeído (2 %), glutaraldeído (2 %), cloreto de cálcio (0,001 M),

cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2] por 72 horas, em seguida desidratadas em série etílica crescente (35 -100%). As amostras foram secas ao ponto crítico através de CO₂ líquido e montadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP (Carl Zeis, Jena, Alemanha).

Para as análises anatômicas as amostras foram fixadas na mesma solução fixadora, desidratadas em série etílica crescente por 24 horas, infiltradas e emblocadas utilizando o kit Historresina (hidroxietilmetacrilato, Leica Helderberg). A polimerização da resina foi feita à temperatura ambiente por 48 horas. Os cortes histológicos seriados (5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo (Leitz 1516, Bensheim, Alemanha), dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina ácida (0,1 % p/v), seguido de azul de toluidina (0,05 % p/v) (FEDR; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em microscópio de luz Olympus U-RFL-T (Olympus, Tokyo, Japão).

Receptividade do estigma

Para a determinação da receptividade do estigma foram utilizados os genótipos, Calcutta 4, Prata-Anã e Grande Naine. Os estigmas foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio (3 %) por três minutos até a observação da liberação de bolhas de ar, significando que o estigma está receptivo através da reação do peróxido de hidrogênio com a enzima peroxidase (ZEISLER, 1933).

Considerou-se cinco intervalos de tempo para coleta dos estigmas: pré-antese (14 horas antes da antese); na antese (8h da manhã), e 4, 10 e 24 horas após a antese, em três repetições cada. A receptividade do estigma foi estimada conferindo graus, conforme adaptação de Dafni e Maués (1998): (-) sem reação; (+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta positiva muito forte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia dos grãos de pólen

Os grãos de pólen de bananeiras diploides (Calcutta 4 e SH3263) apresentam características similares quanto ao tamanho e morfologia. De acordo com classificação proposta por Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009) os grãos de pólen destes diploides são grandes (Tabela 2), possuem simetria radial, esferoidal, âmbito circular, inaperturado, com ornamentação da exina pisilada (Figura 1).

Tabela 2. Características morfométricas dos grãos de pólen acetolisados de bananeiras diploides, tamanho e estimativa de número de grãos por flor.

| Genótipos | Diâmetro ¹ (μm) | Espessura da Exina ¹ (μm) | Tamanho ² | Número de grãos de pólen por flor ³ |
|------------|---|---|----------------------|--|
| Calcutta 4 | $89,16 \pm 0,98a$ | $11,22 \pm 1,35a$ | Grande | 48.750 |
| SH3263 | $83,53 \pm 0,69b$ | $9,27 \pm 1,48b$ | Grande | 69.100 |

¹ Os resultados correspondem à média de 25 repetições \pm desvio padrão.

² De acordo com classificação proposta por Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009);

³ Conforme metodologia de Kearns e Inouye (1993).

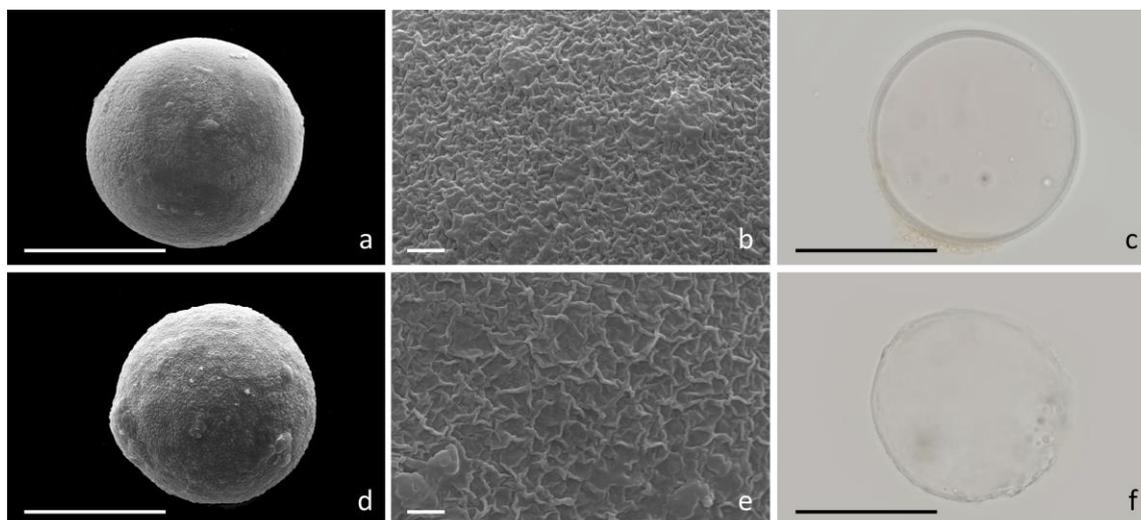


Figura 1. Morfologia e detalhes da exina de grãos de pólen de bananeiras diploides. a-c) Calcutta 4; d-f) SH3263; a-d) grãos de pólen em microscopia eletrônica de varredura (MEV); b-e) detalhes da ornamentação da exina em MEV; c-f) grãos de pólen acetolisados. Barras: a, c-d, f = 50 μm ; b, e = 2 μm .

Osebele et al. (2014) realizando um estudo de diversidade de pólen, viabilidade e estrutura floral em genótipos de bananeira observaram que os grãos de pólen apresentaram cinco aberturas (poliporado e policolporado). Esses resultados discordam com os apresentados nesse trabalho, pois os grãos de pólen analisados dos dois genótipos são classificados como inaperturados. Essa discordância pode estar relacionada à diferença dos genótipos estudados ou pela técnica utilizada pelos autores, que não realizaram microscopia eletrônica de varredura para a observação dos grãos, o que dificulta fazer inferências sobre a morfologia polínica.

Em relação ao tamanho dos grãos de pólen, Dodds (1943), observou grãos haploides (n) com 129 μm e diploides com 147 μm . Em outro estudo desenvolvido por Sathiamoorthy e Balamohan (1993) em diploides férteis, o diâmetro dos grãos variaram de 85 μm a 128 μm , sendo que diâmetro registrado para o genótipo Calcutta 4 foi de 128 μm .

A variação de tamanho dos grãos de pólen pode estar relacionada ao grupo genômico, à ploidia e ao genótipo estudado (Ortiz, 1997). Esse mesmo autor estudando grãos de pólen de bananeiras verificou que houve diferença significativa entre as espécies *M. balbisiana* e *M. acuminata*, com 94 μm a 104 μm de diâmetro, respectivamente.

A espessura da exina no genótipo Calcutta 4 foi de 11,22 μm e do SH3263 foi 9,27 μm (Tabela 2). Furness (2007) relatou que uma menor espessura da exina pode oferecer menor resistência à germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico.

O número de grãos de pólen por flor, para o genótipo Calcutta 4 e SH3263 foi de 48.750 e 69.100, respectivamente (Tabela 2). Esses valores são superiores aos observados por Mukasa e Rubaihayo (1993) em bananeiras diploides e triploides cultivadas na África do Sul, onde foi verificada uma variação de 5.325 até 36.280 grãos de pólen por flor. Essa diferença está em concordância com outros trabalhos que mostram a superioridade dos diploides no que se refere a produção de pólen.

Segundo Petri et al. (1996) uma quantidade maior de anteras em uma flor, não é indicativo de grande número de grãos de pólen, sendo o número de grãos de pólen em uma flor pode sofrer variações devido às condições ambientais em que as plantas estão submetidas. Albuquerque et. al (2010)

observaram que cultivares de macieira desenvolvidas do Sul do Brasil apresentaram uma quantidade maior de grãos de pólen por flor em relação a outras cultivares importadas, e atribuíram essa variação às condições climáticas.

Germinação *in vitro* dos grãos de pólen

As análises estatísticas mostram interação significativa entre os genótipos e os horários de coleta, tanto para a porcentagem de germinação *in vitro* como para o comprimento do tubo polínico (Figura 2 e 3).

Após 24 horas de incubação no meio, foi possível verificar uma alta germinação dos grãos de pólen nos dois genótipos estudados (Figura 2). Nyine e Pillay (2007), estudando 20 genótipos de bananeiras de diferentes ploidias observaram que após 24 horas a porcentagem de germinação se torna estável, não sendo necessário tempo mais prolongado para avaliação.

Segundo esses autores, tempos prolongados de incubação são importantes para espécies que apresentam dormência dos grãos de pólen ou não atingiram a maturidade fisiológica.

A coleta dos grãos de pólen às 8 horas da manhã na fase de antese proporcionou a maior porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico (Tabela 3) (Figuras 2b e 2e). O diploide Calcutta 4 e SH3263 apresentaram 70,52% e 63 63,54%, de germinação respectivamente, sendo que nos demais horários de coleta não houve diferença significativa entre os genótipos, assim como se observou uma queda da germinação com o tempo até uma perda quase total de viabilidade às 24 horas pós antese.

Por outro lado, o comprimento do tubo polínico no diploide SH3263 foi significativamente maior que o observado no Calcutta 4, com 3,02 mm e 2,14 mm, respectivamente (Tabela 3) quando medidos na antese. Apesar da queda no comprimento do tubo polínico depois da antese não foram observadas diferenças no comprimento do tubo polínico entre os genótipos a partir de 10 horas após a antese.

Tabela 3. Germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico de grãos de pólen de bananeiras diploides (AA) nos diferentes horários de coleta.

| Genótipos | Pré-antese | Antese | 4h Pós-antese | 10h Pós-antese | 24h Pós-antese |
|-----------------------------------|------------|---------|---------------|----------------|----------------|
| | | 8h | | | |
| Porcentagem de germinação (%) | | | | | |
| Calcutta 4 | 11,78aC | 70,52aA | 50,30aB | 41,54aB | 3,05aC |
| SH3263 | 9,29aC | 63,54bA | 49,26aB | 38,87aB | 8,72aC |
| Comprimento do tubo polínico (mm) | | | | | |
| Calcutta 4 | 1,81aB | 2,12bA | 1,19bB | 1,21aB | 1,34aB |
| SH3263 | 0,32bC | 3,02aA | 1,81aB | 1,41aB | 1,19aB |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

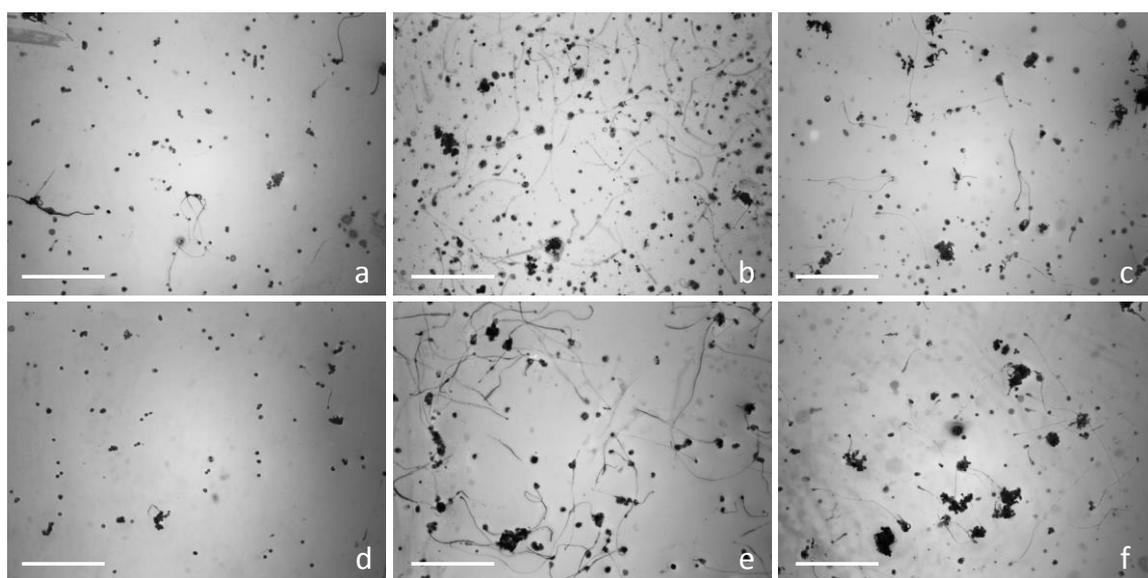


Figura 2. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de bananeiras diploides (AA) Calcutta 4 (a-c) e SH3263 (d-f). a,d) Pré-antese (18 horas antes da antese); b,e) Antese (8 horas da manhã); c,f) Pós-antese (24 horas após a antese). Barras: 3 mm.

Nos períodos da pré-antese e pós-antese ambos os genótipos apresentaram valores de germinação bem reduzidos, alcançando 11,78% (pré-antese) e 3,05% (pós-antese) no Calcutta 4, e 9,29% (pré-antese) e 8,72% (pós-antese) no SH3263 (Tabela 3).

Dumpe e Ortiz (1996) e Nyine e Pillay (2007) estudando a fertilidade masculina de bananeira em diferentes genótipos, observaram uma maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen no estigma entre 7:30 h e 10:30 h da manhã.

A influência do horário da coleta, assim como a fase de desenvolvimento da flor vem sendo registrada para várias espécies. Em bananeira, Soares et al. (2015) constataram que para todos os genótipos estudados a germinação *in vitro* dos grãos de pólen foi mais elevada às 8 horas da manhã. A semelhança do observado deste trabalho, eles também constataram uma queda nas taxas de germinação à medida que aumentou o tempo após a abertura floral.

Até 12 horas pós-antese pode-se utilizar os grãos de pólen para a polinização, pois estes mantem uma porcentagem de germinação considerada satisfatória. Scorza e Sherman (1995) consideram que um pólen com boa viabilidade deve apresentar de 50 a 80% de grãos germinados com tubos polínicos bem desenvolvidos. Souza (2002), considerou uma baixa viabilidade de grãos de pólen quando as porcentagens de germinação atingiam um máximo de 30 %, intermediária de 31 a 69 %, e acima de 70 % apresentam alta viabilidade. Grãos de pólen com alta viabilidade aumentam a probabilidade de que haja fertilização.

Reis et al. (2011) obtiveram resultados bem superior ao encontrado nesse estudo para o comprimento do tubo polínico no genótipo Calcutta 4 com 16,2 mm, esse maior desenvolvimento pode ser atribuído pela utilização de uma maior concentração de ácido bórico no meio de cultura, já que a concentração de sacarose foi a mesma utilizada neste trabalho.

Os mesmos autores consideraram que o meio de cultura para a germinação de grãos de pólen de acessos diploides de bananeira suplementado com 15 % de sacarose, propicia uma melhor porcentagem de germinação, e que dependendo do genótipo, pode ocorrer variação na concentração requisitada de ácido bórico para a germinação dos grãos de pólen.

Nyine e Pillay (2007) perceberam que a adição do néctar diluído em solução de sacarose ao meio de cultura, aumenta o percentual de germinação e viabilidade dos grãos de pólen em genótipos de bananeira.

Por outro lado, em um estudo de germinação de grãos de pólen de bananeira, Soares et al. (2008) observaram que o extrato do estigma em concentrações reduzidas (2,5 e 5 %) adicionado ao meio de cultura promoveu a germinação dos grãos de pólen (92,75 %), ao passo que em concentrações mais elevadas, o efeito foi negativo (21,88 %).

O sucesso da germinação *in vitro* é influenciado por diversos fatores como alguns constituintes do meio de cultura (sacarose, cálcio, boro e ágar), temperatura e o tempo de incubação. A sacarose e o ácido bórico fornecem energia e estimulam o desenvolvimento do tubo polínico, sendo variável a presença de outros nutrientes (MIRANDA; CLEMENT, 1990; TAYLOR; HEPLER, 1997).

Youmbi et al. (2011) otimizando as condições para a germinação *in vitro*, conservação e armazenamento de pólen de três genótipos diploides de bananeira (*Musa acuminata*), observaram que o meio com valores de pH entre 6,5 e 6,8 permitiram uma maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen *in vitro*.

Entretanto, apesar da germinação *in vitro* ser o método mais utilizado para avaliação da viabilidade polínica, o meio de cultura utilizado pode não simular completamente as condições ideais do estigma, e não atender totalmente aos requisitos para alongação normal do tubo polínico (SHI-QIANG, 2008). Por isso a utilização de outros estudos complementares pode subsidiar melhor as avaliações realizadas.

Testes histoquímicos dos grãos de pólen

Os três corantes utilizados permitiram a detecção de grãos de pólen viáveis e inviáveis (Figura 3). No entanto, foi observada uma interação significativa entre os fatores (genótipos x corantes). Os grãos de pólen corados com carmim acético 1 %, demonstraram altas taxas de viabilidade para ambos os genótipos, Calcutta 4 com 81,67 % e SH3263 com 88 %. Para os corantes TTC e solução de Alexander 2 % as porcentagens de viabilidade dos grãos de pólen foram menores nos dois genótipos, quando comparado com o carmim acético (Tabela 4). Entretanto os valores obtidos foram mais próximos ao que foi observado na germinação *in vitro* (Tabela 3), caracterizando o corante TTC

e a solução de Alexander como os mais adequados para estimar a viabilidade polínica dos grãos de pólen de bananeira.

A viabilidade polínica é uma característica decisiva à fertilização, podendo ser determinada através de um grande número de técnicas que incluem a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e os métodos baseados em parâmetros citológicos, como as reações usando corantes e fluorocromos (SHIVANNA; JOHRI, 1985; DAFNI, 1992; KEARNS; INOUE, 1993; OLIVEIRA et al., 1999). No entanto, a utilização de apenas uma técnica para se estimar a viabilidade do grão de pólen pode superestimar ou subestimar os resultados, sendo de suma importância adotar diferentes métodos com o intuito de se obter resultados mais confiáveis na determinação de viabilidade polínica (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000).

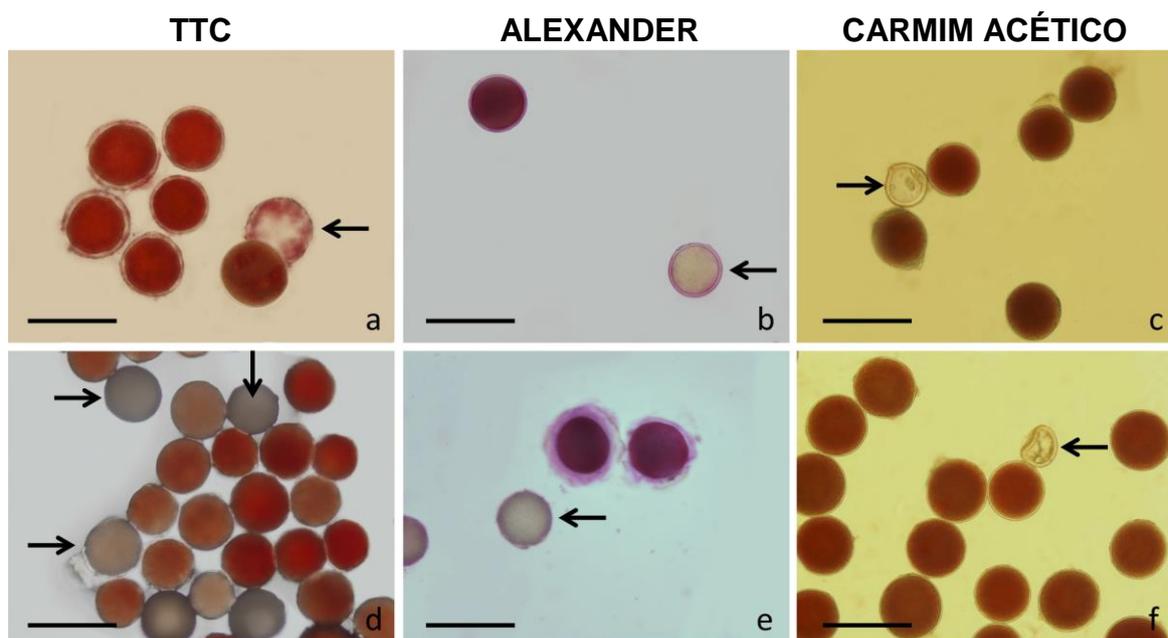


Figura 3. Viabilidade dos grãos de pólen de bananeiras diploides por meio de testes histoquímicos, evidenciando a presença de grãos de pólen viáveis e inviáveis (setas). a-c) Calcutta 4; d-f) SH32-63; a-d) TTC; b-e) Solução de Alexander 2 %; c-f) Carmim acético 1 %. Barras: 200 μ m.

Tabela 4. Viabilidade de grãos de pólen em genótipos de bananeiras diploides em diferentes testes histoquímicos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (genótipos) e letras maiúsculas (testes histoquímicos) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$).

| Genótipo | TTC 1 % | Solução de Alexander 2 % | Carmim Acético 1 % |
|------------|------------|-----------------------------|-----------------------|
| Calcutta 4 | 76,33 aB | 72,33aB | 88,00aA |
| SH3263 | 62,33bB | 69,67aB | 81,67aA |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

O uso de corantes é um método relativamente seguro para estimar a viabilidade de grãos de pólen, permitindo a elaboração de conclusões importantes sobre a integridade dessas estruturas (MENCK et al., 1990).

A solução de Alexander é considerada como um dos corantes mais confiáveis em estudos de viabilidade polínica, pela diferenciação da coloração do protoplasma e a parede celular (AULER et al., 2006). Os grãos de pólen inviáveis coram-se de verde, e os viáveis de roxo/avermelhado, sendo que o verde de malaquita reage com a celulose da parede do grão de pólen, enquanto que a fucsina ácida reage com o protoplasma (ALEXANDER, 1980).

O corante TTC detecta a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos, sendo que essa atividade está intimamente associada à germinabilidade dos grãos de pólen (DERIN; ETI, 2001).

Por outro lado, o carmim acético é um método simples para verificar a presença do citoplasma em grãos de pólen e determinar a quantidade de grãos de pólen normalmente desenvolvidos e maduros, distinguindo-os dos subdesenvolvidos. O carmim acético indica a presença de elementos estruturais, o que não implica na consequente viabilidade dos grãos de pólen que se coraram (FERRARA et al., 2007). Por isso, geralmente os valores obtidos mediante coloração com carmim geralmente são superiores ao de outros corantes, como o TTC e FDA.

Mazzeo et al (2014) compararam três técnicas para determinar a viabilidade do pólen em oliveira (*Olea europaea* L.), coloração com carmim acético, fluoresceína diacetato (FDA) e germinação em meio de cultura, e concluíram que a coloração com carmim é um indicativo do número de grãos de pólen completamente formados e os resultados geralmente são superestimados. Por outro lado, as outras duas técnicas apresentaram valores mais baixos e são mais realistas para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen.

Em bananeira, Dumpe e Ortiz (1996) comparando a viabilidade dos grãos de pólen em cultivares diploides (AA e BB), triploides (AAB, AAA) e tetraploides (AAAB) por meio de testes histoquímicos utilizando o TTC, observaram que a ploidia e o grupo genômico interferem significativamente na viabilidade e na quantidade de grãos de pólen. O genótipo diploide Calcutta 4 apresentou 100 % de viabilidade, assim como os genótipos Higa III-97, Long Tavoy, Pa Songkla e Waigu, sendo todos esses diploides. Nos genótipos triploides e tetraploides a viabilidade variou de 30 a 90%. Entretanto, os autores relatam que nenhum dos acessos triploides avaliados apresentou níveis de produção de pólen suficientes para justificar a sua utilização como progenitores masculinos em programas de melhoramento. Além disso, os triploides possuem gametas desbalanceados e não são recomendados como doadores de grãos de pólen em programas de melhoramento genético.

A alta viabilidade polínica dos genótipos reflete um comportamento meiótico regular que está intimamente relacionado ao grau de fertilidade dos gametas. Qualquer espécie de anormalidade durante esse processo pode acarretar o surgimento de grãos de pólen anormais ou inviáveis (MASCARENHAS, 1992; HORNER; PALMER, 1995).

Comparando-se o resultado da germinação *in vitro* com o dos testes histoquímicos aplicados nos genótipos Calcutta 4 e SH3263 neste estudo, nota-se que o carmim acético apresentou valores mais elevados de viabilidade que os observados com o TTC e a germinação *in vitro*. Como o carmim acético mostra a integridade dos grãos de pólen, e não necessariamente que aqueles se coram são viáveis, esta técnica não foi considerada a mais adequada para a determinação da taxa de fertilidade dos grãos de pólen em bananeira. Resultados semelhantes foram obtidos por Soares et al. (2008) em que a

coloração com carmim acético superestimou a viabilidade em grãos de pólen de bananeiras diploides.

Munhoz et al. (2008) observaram que o teste histoquímico utilizando o carmim acético superestimou os valores de germinação *in vitro* em mais de 90%, enquanto que o uso do teste com o TTC forneceu uma estimativa de viabilidade mais próxima ao teste de germinação *in vitro*.

Considerando todos os testes que foram realizados, o genótipo Calcutta 4 apresentou maior viabilidade polínica em comparação com o híbrido SH3263. Esses resultados podem estar relacionados por um genótipo ser silvestre e outro melhorado. Vieira et al. (2012) encontrou maiores percentuais de viabilidade polínica em espécies silvestres de *Manihot*, em detrimento das espécies cultivadas. As mais altas percentagens de germinação e comprimento de tubo polínico foram também observadas em genótipos silvestres de abacaxizeiro (Soares et al. 2011).

Morfoanatomia do estigma e estilete

As bananeiras Calcutta 4 (diploide), Prata Anã e Grande Naine (triploides) não apresentaram diferenças morfoanatômicas no estigma e estilete (Figura 4). O estigma da bananeira é trilobado, úmido (Figura 4b, f), com papilas estigmáticas pluricelulares bastante desenvolvidas por toda superfície, que identificam quimicamente os grãos de pólen (Figura 4c, d).

Os estiletos apresentam uma estrutura sólida, comprida e lisa e são formados por epiderme unisseriada, sendo que as células da face externa apresentam paredes periclinais externas levemente convexas, revestidas por cutícula estriada. Na face interna as células epidérmicas apresentam citoplasma denso, núcleo proeminente e cutícula lisa. Os estiletos apresentam três feixes vasculares maiores externamente e seis feixes vasculares menores próximo ao canal estilar dispostos no parênquima fundamental (Figura 4e, f, g, i).

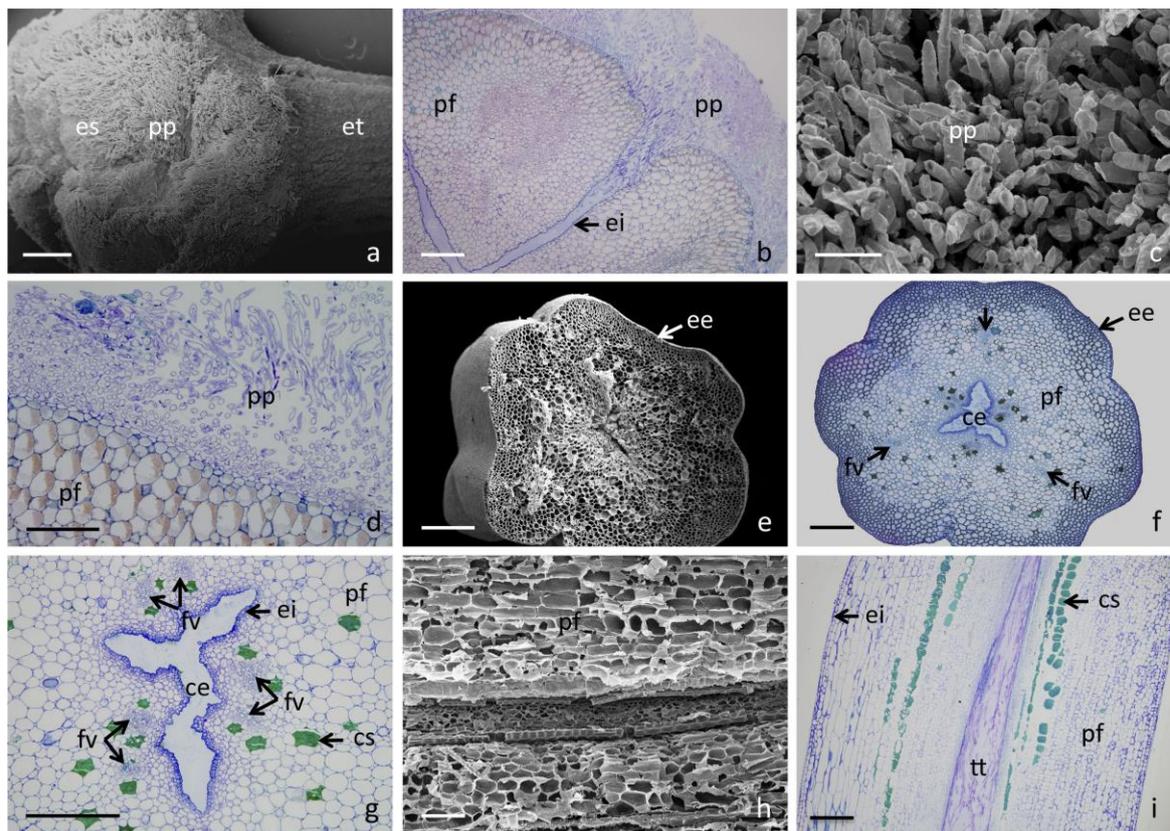


Figura 4. Morfoanatomia do estigma e estilete nos genótipos Calcutta 4, Prata Anã e Grande Naine. a) Vista geral do estigma e estilete; b, d) Secção longitudinal do estigma; c,d) papilas tubulares da superfície estigmática; e, f, g) Secção transversal do estilete; h, i) Secção longitudinal do estilete; b, d, f, g, i) Secções anatômicas observadas em microscópio de luz (ML); a, c, e, h) Características morfológicas observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). ce) canal do estilete; cs) células secretoras; ee) epiderme externa; ei) epiderme interna; es) estigma; et) estilete; fv) feixe vascular; pf) parênquima fundamental. pp) papilas; tt) tecido transmissor. Barras: a) 1 mm; b, e, f, i) 500 µm; g, h) 200 µm; c, d) 100 µm.

O estigma se apresenta como uma região bastante propícia ao crescimento do tubo polínico, por ser composto de inúmeras papilas que tem a função de secretar substâncias e enzimas que irão auxiliar na germinação dos grãos de pólen. Essa estrutura possui uma grande importância na seleção dos grãos de pólen no processo de reconhecimento, durante reações de compatibilidade ou incompatibilidade (MARIATH et al. 2006).

A incompatibilidade depende de fatores favoráveis e desfavoráveis, como a viabilidade do pólen, a receptividade estigmática e da interação

genética que ocorrem entre o grão de pólen e tecidos carpelares, no caminho a ser percorrido pelo tubo polínico (DAFNI, 1992; MASCARENHAS, 1992).

Receptividade do estigma

A receptividade do estigma foi muito forte desde a antese (às 8h da manhã) até 10 horas pós-antese (às 18h) nos três genótipos estudados. Essa receptividade foi bastante reduzida na pré-antese (14 horas antes da antese), assim como 24 horas após a antese (Tabela 5 e Figura 5).

Tabela 5. Receptividade do estigma com peróxido de hidrogênio em genótipos de bananeiras em diferentes horários de avaliação.

| Genótipos | 14 horas antes da antese | Antese | 4 horas pós-antese | 10 horas pós-antese | 24 horas pós-antese |
|--------------|--------------------------|--------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Calcutta 4 | + | +++ | +++ | +++ | + |
| Prata Anã | + | +++ | +++ | +++ | + |
| Grande Naine | + | +++ | +++ | +++ | + |

(+) resposta positiva fraca; (+++) resposta positiva muito forte. Metodologia adaptada de Dafni e Maués, 1998.

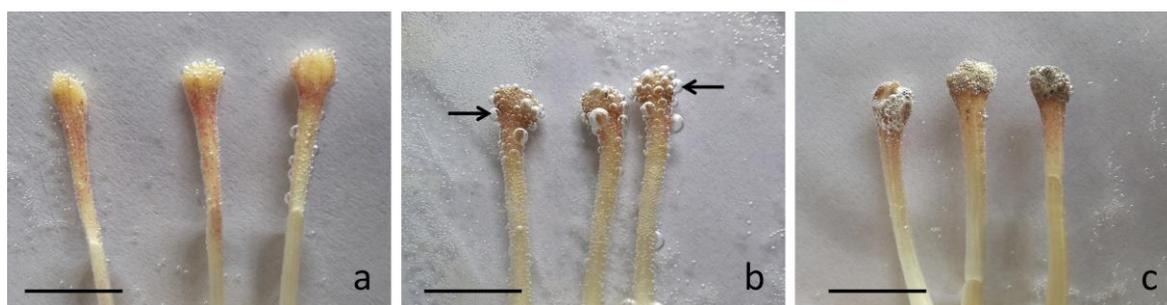


Figura 5. Avaliação da receptividade do estigma em bananeira (Calcutta 4) com peróxido de hidrogênio; a) Pré-antese; b) antese; c) pós-antese. Setas = região da receptividade. Barras: 0.8 mm.

No teste com peróxido de hidrogênio a 3 % a receptividade é caracterizada pela presença de bolhas de ar na superfície estigmática, indicando que o mesmo se encontra apto para receber os grãos de pólen (Figura 8-b). A menor quantidade ou ausência dessas bolhas indica que o

estigma não está receptivo. Esta metodologia é considerada simples e barata e identifica a reação da enzima peroxidase presente no estigma no qual promove essa liberação de bolhas de ar (DAFNI; MAUÉS, 1998).

A presença de enzimas esterases e peroxidases na superfície do estigma tem sido correlacionada como um indicativo de receptividade (HESLOP-HARRISON; SHIVANNA, 1977; DAFNI; MAUES, 1998, PRECZENHAK, 2011).

Em algumas espécies a receptividade pode variar de acordo com o genótipo e com o estágio floral de desenvolvimento. Em um estudo realizado por Preczenhak et. al. (2011) utilizando o peróxido de hidrogênio para estimar a receptividade estigmática, foi observado que todas as cultivares de tomate analisadas apresentaram estigmas receptivos antes da ocorrência da antese, sendo que a velocidade de formação de bolhas aumentava de acordo com o desenvolvimento floral.

O método utilizando o peróxido de hidrogênio para observação da receptividade deve ser realizado tomando-se um cuidado especial, a fim de evitar erros de leitura dos dados, ou uma resposta falsa positiva uma vez que o teste também acusa a presença de bolhas, caso o estigma apresenta danos mecânicos em sua superfície.

Morfoanatomia da região apical do ovário

Na região apical do ovário das flores femininas de bananeira, acima dos lóculos e da inserção dos primeiros óvulos encontra-se o nectário (KIRCHOFF, 1992). O nectário é um órgão especializado que contém milhares de células que formam um labirinto e possui um parênquima subglandular vascularizado com citoplasma denso e bem corado, caracterizando-as como células secretoras.

No genótipo diploide (Calcutta 4) não foi observada nenhuma necrose aparente nem antes e nem após polinização (Figura 6a). Entretanto nos genótipos triploides (Prata-anã e Grande Naine) foi observada a presença de uma necrose no nectário mesmo antes da antese (Figuras 6b e 6c), e que se intensifica após a polinização e resulta na desintegração das células.

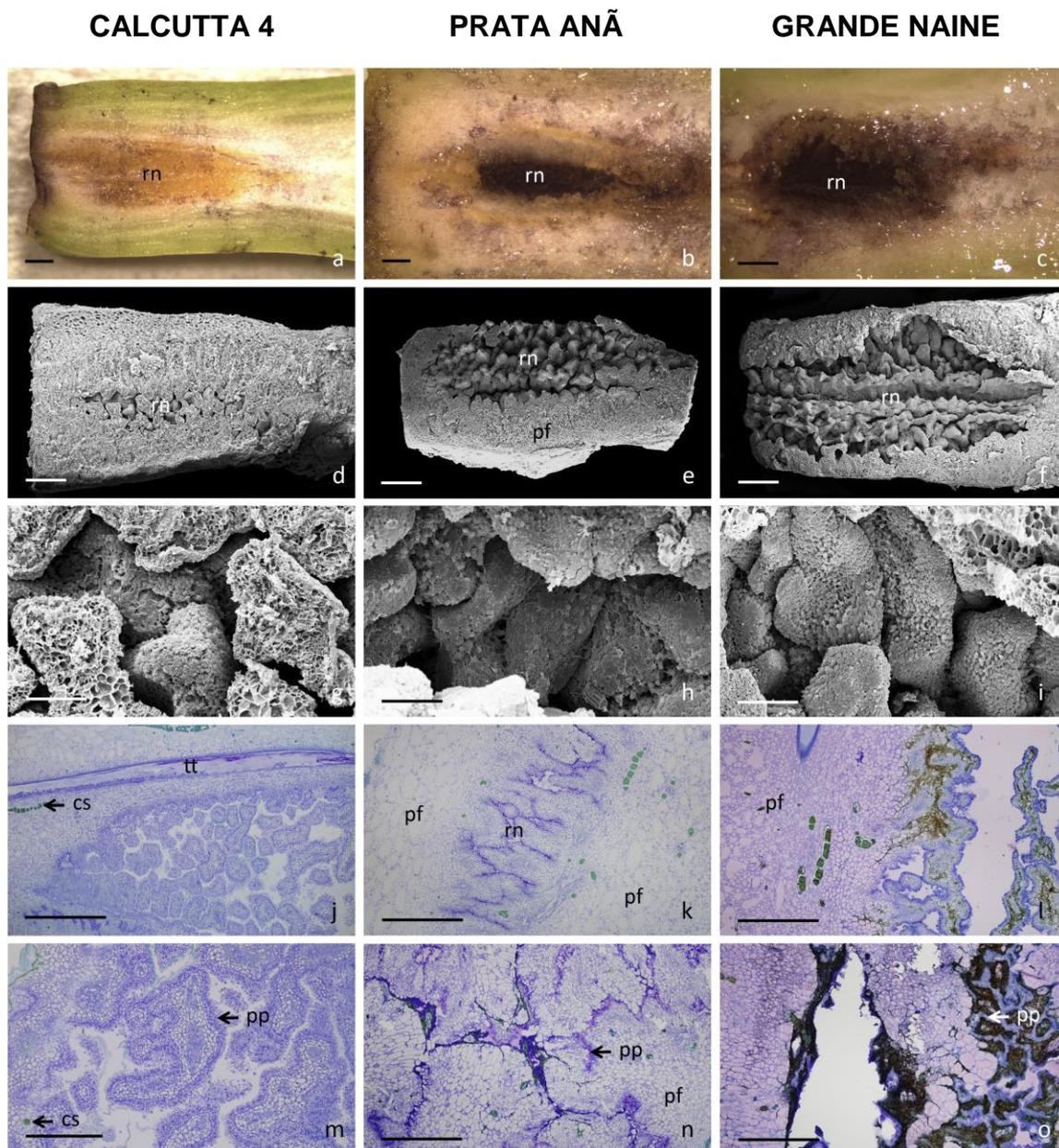


Figura 6. Cortes frescos, microscopia varredura e de luz da região do nectário em genótipos de bananeira: Calcutta (a, d, g, j, m), Prata Anã (b, e, h, k, n) e Grande Nainé (c, f, i, l, o). a, b, c - Corte fresco do nectário, evidenciando presença de necrose nos genótipos Prata Anã (b) e Grande Nainé (c). d-i - Microscopia de varredura do nectário mostrando que a morfologia é semelhante nos três genótipos, apesar da presença de necrose nos triploides. j-o - Secção longitudinal do nectário, onde no diploide as células epiteliais apresentam-se normais e nos triploides observa-se células do parênquima fundamental com coloração escura em consequência da necrose. cs); células secretoras; pf) parênquima fundamental; pp) papilas; rn) região do nectário; tt) tecido transmissor. Barras: 0,5 mm.

Mesmo com a presença de necrose, não foram observadas diferenças morfológicas na região do nectário nos genótipos estudados (Figuras 6d-i). Esses resultados corroboram com os encontrados em um estudo sobre a anatomia do ovário em três espécies da família Musaceae (*Musa velutina* H. Wendl. & Drude, *Musa ornata* W. Roxburgh e *Musa* cv. Go Sai Yung), onde foi observada semelhança na estrutura anatômica nas três espécies investigadas (KIRCHOFF, 1992).

Resultados semelhantes também foram observados por Ren e Wang (2007), nas descrições do nectário em *Musa basjoo* Siebold & Zucc. ex Linum. Esses autores, estudando os nectários florais de três gêneros (*Musa*, *Musella* e *Ensete*), observaram semelhança nas células epiteliais (, nos tecidos vasculares e nas aberturas dos nectários, no entanto, as diferenças encontradas foram na forma das seções longitudinais e transversais, no arranjo das cutículas secretoras e na presença do material fibrilar.

Fahn e Benouaiche (1978) sugerem que a secreção do nectário ocorre em função das organelas (retículo endoplasmático e complexo de Golgi) presentes no parênquima fundamental do tecido. O parênquima é revestido por uma epiderme unisseriada e inúmeras papilas pluriestratificadas (Figura 6d, e, f, g, h, i).

Foi possível observar em todos os genótipos um tecido transmissor localizado em paralelo à região do nectário, com destaque para o genótipo Calcutta 4 (Figura 9j). O tecido transmissor se estrutura logo abaixo do estigma e segue centralmente posicionado por todo o comprimento do estilete até o ovário, apresentando células alongadas de paredes espessas. Esse tecido é responsável pelo direcionamento dos tubos polínicos para o ovário e possivelmente a fertilização (SMITH et al., 2013).

Fahn e Benouaiche (1978) estudando a ultraestrutura e o desenvolvimento dos nectários em flores da bananeira perceberam que nas fases iniciais do seu desenvolvimento, a ultraestrutura do nectário de *Musa paradisiaca* L. var. *sapientum* Kuntze e Dwarf Cavendish eram semelhantes. Esses mesmos autores verificaram que nas bananeiras triploides (Cavendish), em alguns estádios de desenvolvimento, os nectários não secretavam néctar, e que as células do epitélio se desintegravam antes mesmo da maturação.

CONCLUSÕES

Os grãos de pólen dos genótipos diploides se mostraram similares quanto ao tamanho e morfologia, sendo que a maior porcentagem de germinação *in vitro* ocorreu às 8 horas da manhã (antese), no entanto, grãos de pólen coletados 4 horas após a antese também podem ser utilizados em cruzamentos, pois ainda mantêm cerca de 50% de viabilidade.

Não foram observadas diferenças morfoanatômicas no estigma de bananeiras diploides e triploides, sendo constatada uma maior receptividade estigmática às 8 horas, no mesmo período em que os grãos de pólen apresentam maior viabilidade.

A morfologia do nectário das cultivares triploides, que apresenta necrosamento, é muito semelhante à de cultivares diploides que não apresentam necrose. Entretanto, cortes histológicos mostram a ocorrência de desintegração das células do parênquima fundamental.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55. n. 1, p. 13-18, 1980.

ALBUQUERQUE JR, C. L.; DENARDI, F.; DANTAS, A. C. M.; NODARI, R. O. Número de anteras por flor, grãos de pólen por antera e capacidade germinativa do pólen de diferentes cultivares de macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n 4, p.1255-1260, 2010.

ALVES, E. J.; OLIVEIRA, M. A. Práticas culturais. In: ALVES, E. J. (Org). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindústrias**. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPMF, 1999. p. 335-352.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Paulínia, v. 8, n. 2, p. 55-63. 2006.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; SOUZA, L. S. Solos, nutrição e adubação. In: ALVES, E. J. (Org). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPMF, 1999. p.197-260.

DAFNI, A.; MAUES, M. M. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**. Berlin, v. 11, n. 3, p. 177-180, 1998.

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

DERIN, K.; ETI, S. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Istanbul, v. 25, n. 1, p. 169-173, 2001.

DOBRTSA, A. A.; NISHIKAWA, S.; PREUSS, D.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; SUMNER, L. W.; HAMMOND, A.; CARLSON, A. L.; SWANSON, R. J. LAP3, a novel plant protein required for pollen development, is essential for proper exine formation. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 22, n. 3, p. 167-177, 2009.

DODDS, K. S. Genetic and cytological studies of *Musa*. V. Certain edible diploids. **Journal of Genetics**, Varanasi, v. 43, p. 113-138. 1943.

DUMPE, B. B.; ORTIZ, R. Apparent Male Fertility in *Musa* Germplasm. **Hortscience**, St Joseph, v. 31, n. 6, p. 1019-1022. 1996.

FAHN, A.; BENOUAICHE, P. Ultrastructure, development and secretion in the nectary of banana. **Annals of Botany**, Oxford. v. 44, n. 1, p. 85-93. 1978.

FAO, FOOD AND AGRICULTUR ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 17 Apr. 2015.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**. v. 55. p. 123-42. 1968.

FERRARA, G.; CAMPOSEO, S.; M.; GODINI, A. Production of total and stainable pollen grains in *Olea europaea*. Grana, v.46, p. 85–90, 2007.

FORTESCUE, J. A.; TURNER, D.W. Growth and development of ovules of banana, plantain and enset (Musaceae). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, n. 4, p. 463- 478, 2005.

FURNESS, C. A. Why does some pollen lack apertures? A review of inaperturate pollen in eudicots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, n. 1, p. 29-48, 2007.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N., JANICK, J. (eds.) **Methods in Fruits Breeding**. Indiana, Purdue University. p.23-47. 1983.

GUINET, P.H. **Advances in legume biology**: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 842p.1989.

HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K. R. The receptive surfasse of the Angiosperm stigma. **Annals of Botany**, Oxford, v. 41, p. 1233-1258, 1977.

HESSE, M.; HALBRITTER, H.; WEBER, M.; BUCHNER, R.; FROSCH-RADIVO, A.; ULRICH, S. **Pollen terminology**. An illustrated handbook. Wien: Springer, 2009. 259 p.

HORNER, H. T.; PALMER, R. G. Mechanisms of genetic male sterility. **Crop Science. Madison**, v. 35, p. 1527-1535. 1995.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138A, 1965.

KEARS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993.

KIRCHOFF, B. K. Ovary structure and anatomy in the Heliconiaceae and Musaceae (Zingiberales). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, p. 2490-2508. 1992.

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

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR, N. S. **Anatomia Vegetal**. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. A. (Eds), 2. ed. Atual. Viçosa: Ed. UFV. 2006.

MASCARENHAS, J. P. Pollen gene expression: Molecular evidence. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 140, p. 3-18.1992.

MAZZEO, A.; PALASCIANO, M.; GALLOTTA, A.; CAMPOSEO, S.; PACIFICO, A.; FERRARA, A. Amount and quality of pollen grains in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars as affected by 'on' and 'off' years. **Scientia Horticulturae**, v. 170, p. 89-93, 2014.

MENCK, A. L. M.; ODA, S.; MARCHI, E. L.; KOVALSKI, M. E. Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. **IPEF**, Piracicaba, n. 43/44, p. 20-23. 1990.

MIRANDA, P.A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejobaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biología Tropical**, Costa Rica, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.

MOORE, P. D.; WEBB, J. A. **An illustrated guide to pollen analysis**. 1.ed. New York: A Halsted Press Book, 133 p. 1978.

MUKASA, S. B.; RUBAIHAYO, P. R. Male fertility in Uganda banana germplasm. **African Crop Science Journal**, Uganda, v 1, n. 2, p. 87-93. 1993.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 31, p. 209-214. 2008.

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

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

OLIVEIRA, S. O.; ALVES, E. J.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L. Cultivares. In: ALVES, E. J. (Org.) **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2.ed., Brasília: Embrapa- SPI / Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, p. 85-105, 1999.

ORTIZ, R. Occurrence and Inheritance of 2n Pollen in *Musa*. **Annals of Botany**. Oxford, v. 79, n. 4, p. 449–453. 1997.

OSELEBE, H. O.; NNAMANI, C. V., IKEH E. Pollen diversity, viability and floral structure of some *Musa* genotypes. **Nigerian Journal of Biotechnology**, Nigerian, v. 27, n. 1, p. 21-27. 2014.

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; SHUCK, E.; DUCROQUET, J. P. H. J.; MATOS, C. S.; POLA, A. C. Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado. Florianópolis: **EPAGRI**, 1996. 110p. (Boletim Técnico, 75).

PRECZENHAK, A. P.; RESENDE, J. T. V.; SILVA, P. R.; SCHWARZ, K.; BAIER, J. E.; CHAGAS, R. R.; QUARTIERO, A. Receptividade estigmática em cultivares de tomate rasteiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29: p. 3411-3416, 2011.

PUNT, W.; HOEN, P. P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 143, n. 1-2, p.1-81, 2007.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. **Adansonia**, Paris, v. 2, n. 11, p. 77-79, 1979.

REIS, V. D.; MORAIS-LINO, R. S.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S.; VIANA, A. P. Viabilidade in vitro de grãos de pólen de bananeira sob diferentes concentrações de ácido bórico e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 35, n. 3, p. 547-553, 2011.

REN, Z. WANG, H. Morphological comparison of floral nectaries in Musaceae, with reference to its pollinators. **Biodiversity Science**, v.15, n. 6, p. 652-657, 2007.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 12, n. 4, p. 241-244, 2000.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. **Contribuição à palinologia dos cerrados**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 1973.

SATHIAMOORTHY, S.; BALAMOCHAN, T. N. Improvement of banana. **Advances in Horticulture**, India, v. 1, p. 303-335. 1993.

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

SHI-QIANG, C.; ZHONG, W.; MAN-XI, L.; ZHAO-WEI, X.; HUI-HUI, W. Pollen Grain Germination and Pollen Tube Growth in Pistil of Rice. **Rice Science**, Hangzhou, v. 15, n. 2, p. 25-130. 2008.

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

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

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

SILVA, R. M.; BANDEL, G.; FARALDO, M. I. F.; MARTIN S, P. S. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 101-107, 2001a.

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

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.

SMITH A. G.; EBERLE, C. A.; MOSS N. G. ANDERSON, N. O.; CLASEN, B. M.; HEGEMAN, A. D. The transmitting tissue of *Nicotiana tabacum* is not

essential to pollen tube growth, and its ablation can reverse prezygotic interspecific barriers. **Plant Reproduction**. v. 26, n.4. p. 339-50. 2013.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 26, n. 6, p.1209-1217, 2002.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; BRANCALLEÃO, N.; LEDO, C. A. S.; MARTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. Wageningen. **Euphytica**. Wageningen. p.1-16, 2014.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; ROSSI, M. L.; SOUZA, F. V. D. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1744-1749, 2011.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; SAMPAIO, L. F. S.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. Effect of collection time on the viability of banana pollen grains. **African Journal of Biotechnology**. Victoria Island, v. 14, n. 14, p.1207-1214. 2015.

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

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, Biochemistry management**. New York: Springer-Verlag, 1974. 172 p.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Banana**. 3 th ed. London: Longmans, 1987. 468 p.

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 461-491, 1997.

VIEIRA, L. J.; SOARES, T. L.; ROSSI, M. L.; ALVES, A. A. C.; SANTOS, F. A. R.; SOUZA, F. V. D. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 26, n. 2, p. 340-356. 2012.

YOUMBI, E.; FONKAM, N.J.P.; TOMEKPE, K.; FONBAH, C. In vitro germination and pollen conservation of some *Musa* species. **Asian Journal of Biotechnology**, Malásia, v. 3, n. 6, p.554-563. 2011.

ZEISLER, M. Über die Abgrenzung des eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. **Beihefte zum Botanischen Centralblatt**, Jena, v. 58, p. 308-318, 1933.

CAPÍTULO 2

DINÂMICA DO CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM BANANEIRAS DIPLOIDES E TRIPLOIDES²

² Artigo a ser ajustado e submetido à Scientia Horticulturae.

DINÂMICA DO CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM BANANEIRAS DIPLOIDES E TRIPLOIDES

RESUMO: Objetivou-se estudar a dinâmica do crescimento do tubo polínico em genótipos de bananeira e verificar a existência de barreiras físicas que inviabilizem a fertilização e conseqüentemente a produção de sementes em cultivares triploides. As flores femininas do diploide Calcutta 4, e dos triploides Prata Anã e Grande Naine foram polinizadas manualmente, coletadas 8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas após a polinização e submetidas à reação fluorocromática. Amostras de flores foram coletadas de 0 até 60 dias após a polinização, sendo contabilizados o número e o diâmetro dos óvulos, bem como o número de sementes geradas após o amadurecimento dos frutos. Utilizou-se uma análise de regressão e os modelos matemáticos foram ajustados de acordo com as equações e coeficiente de determinação. Todos os genótipos apresentaram alta porcentagem de germinação dos grãos de pólen sobre o estigma e crescimento do tubo polínico 8 horas após a polinização. Observou-se fecundação 32 horas após a polinização no genótipo Calcutta 4, onde não foram detectadas barreiras físicas que inviabilizassem esse evento. Em Prata Anã, não foi observada a fertilização. Na Grande Naine ocorreram anormalidades no crescimento do tubo polínico na região do nectário, como tubos retorcidos, curtos ou crescendo em direções opostas e sem orientação, deposição irregular de calose e crescimento tardio e insuficiente. Houve diferença significativa no diâmetro dos óvulos, sendo que a Calcutta 4 apresentou crescimento contínuo, com a semente atingindo 6,50 mm de diâmetro aos 60 dias após a polinização. Nos genótipos Prata Anã e Grande Naine ocorreu um declínio do diâmetro dos óvulos, em virtude da não fertilização e conseqüente aborto dos óvulos. A produção de sementes nos genótipos Prata Anã e Grande Naine foi significativamente afetada pelas anormalidades do crescimento do tubo polínico.

Palavras chave: *Musa* spp. L., barreiras reprodutivas, estigma, fertilidade, grãos de pólen.

POLLEN TUBE GROWTH DYNAMICS IN DIPLOID AND TRIPLOID BANANA

ABSTRACT: This work aimed to study the dynamics of pollen tube growth in banana genotypes and evaluate the physical barriers that cause non-fertilization and consequently the seeds production in triploid cultivars. The female flowers of Calcutta 4, Prata and Grande Naine were pollinated and collected 8, 24, 32, 48, 56 and 72 hours after pollination and submitted to fluorocromatic reaction. In samples of flowers collected from 0 to 60 days after pollination the number and diameter of the eggs were recorded as well as the number of seeds generated after the fruits ripening. Regression analysis and mathematical models were used and have been adjusted according to the equations and coefficient of determination. All genotypes showed high percentage of germination of pollen grains on the stigma and pollen tube growth 8 hours after pollination. Fertilization was observed 32 hours after pollination to Calcutta 4 genotype, where physical barriers have not been detected. In Prata Anã cultivar, there was no fertilization. In Grande Naine occurred abnormalities in pollen tube growth at nectary region, such twisted and short tubes, growing in different directions without guidance, irregular deposition of callose and delayed and insufficient growth. There was a significant difference in the diameter of the eggs, and the Calcutta 4 showed continuous growth in the seed reaching 6.50 mm diameter at 60 days after pollination. In Prata Ana and Grand Naine a decline in the diameter of the eggs was observed due to the non-fertilization and subsequent abortion of eggs. Seed production in Prata Ana and Grande Naine was significantly affected by the abnormal growth of the pollen tube.

Key words: *Musa* spp. L., reproductive barriers, stigma, fertility, pollen grains.

INTRODUÇÃO

A bananeira é uma das fruteiras de grande importância econômica e social com uma produção mundial de 144,56 milhões de toneladas em 2013, destacando-se como os principais produtores a Índia, China, Filipinas, Equador e Brasil (FAO, 2015). O processo evolutivo das cultivares de banana engloba os grupos gênicos A (*Musa acuminata* Colla) e B (*M. balbisiana* Colla) agrupados em três níveis cromossômicos, os diploides (AA, BB e AB), triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB e ABBB) (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

Os programas de melhoramento genético de bananeira têm dedicado atenção principalmente na obtenção de variedades que sejam produtivas e resistentes a pragas e doenças (OLIVEIRA et. al., 1999). Os frutos das bananeiras diploides geralmente apresentam sementes, enquanto que, as bananas de interesse comercial são triploides ($2n=33$) não possuem sementes, e a sua propagação é exclusivamente vegetativa (SHEPHERD et al., 1984).

As variedades triploides do subgrupo Cavendish, são as cultivares com características apreciadas no mercado internacional, representando aproximadamente 45 % da produção mundial (BAKRY et al., 2009). Essas cultivares apresentam alto grau de esterilidade, além da suscetibilidade às principais pragas e doenças, como sigatoka amarela e negra, mal-do-panamá, fatores estes, que, justificam estudos mais detalhados que viabilizem o melhoramento genético e garantam o futuro da bananicultura (SHEPHERD et al., 1986; SILVA, 2006).

A hibridação artificial permite a obtenção de variabilidade genética, visando reunir em um mesmo genótipo, características desejáveis, entretanto, barreiras reprodutivas resultam na incapacidade total ou parcial de espécies ou cultivares de se cruzarem ou autofertilizarem, que derivam de mecanismos de incompatibilidade ou incongruência (SILVEIRA, et al., 2010).

A não obtenção de híbridos pode está relacionada à existência de barreiras pré-zigóticas, as quais ocorrem pela incapacidade de germinação do grão de pólen no estigma, ou inibição do crescimento do tubo polínico no estilete, ou por barreiras pós-zigóticas, que resultam da ausência de fertilização

ou aborto do embrião em diferentes fases de desenvolvimento (VERVAEKE et al. 2001; 2002).

Na literatura existem poucas informações que revelam quais as barreiras reprodutivas que inviabilizam a fertilidade nas cultivares triploides de bananeira. Um dos fatores responsáveis pela ausência ou baixa produção de sementes em cultivares triploides de bananeira podem ser em virtude da desintegração das células do epitélio do nectário antes mesmo da maturação, influenciando na orientação dos tubos polínicos (FAHN; BENOUAICHE, 1978).

Essa ausência de sementes também pode estar relacionada à intensa seleção agrônômica, um reflexo do processo de obtenção dessas cultivares sem semente, ou devido a causas ainda não investigadas (SHEPHERD et al., 1986). Fortescue e Turner (2005a) relataram que a contribuição para uma maior esterilidade em bananeiras triploides ocorre devido a falhas no saco embrionário causadas pelo desbalanceamento na distribuição dos cromossomos.

Além das anormalidades meióticas, a esterilidade em variedades de bananeiras pode desencadear-se por outros fatores que não necessariamente sejam de origem genética, como o crescimento insuficiente do tubo polínico e fatores de genético (SHEPHERD et al., 1987; FORTESCUE; TURNER, 2005b).

Estudos baseados em microscopia de fluorescência utilizando a anilina azul permitem analisar características relacionadas à germinação dos tubos polínicos e suas taxas de crescimento, contribuindo, do mesmo modo, para analisar hibridações efetivas em programas de melhoramento genético e conseqüentemente, elucidar algumas formas da infertilidade (KEARS & INOUE, 1993; BANDEIRA et. al., 2011). É de fundamental importância se conhecer as causas e o local exato das barreiras reprodutivas, para posterior utilização de técnicas a fim de superá-las.

Tendo em vista a carência de informações sobre as barreiras reprodutivas em bananeiras, o presente trabalho teve como objetivo investigar as possíveis causas da infertilidade em genótipos triploides por meio da técnica de microscopia de fluorescência com anilina azul.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados como parentais femininos os genótipos Calcutta 4 (diploide, AA), Prata Anã (triploide, AAB) e Grande Naine (triploide, AAA), e como masculinos os genótipos Calcutta 4 e SH3263 (diploide, AA). Nas plantas receptoras de grãos de pólen as flores femininas foram ensacadas na pré-antese, evitando-se a autopolinização e a contaminação por grãos de pólen trazidos por insetos. Grãos de pólen dos parentais masculinos foram depositados no estigma das flores femininas no período da antese, quando ocorre maior viabilidade de pólen e receptividade do estigma. Após este processo, as flores femininas foram etiquetadas e novamente protegidas com sacos de tecido.

Coletou-se dez pistilos de cada cruzamento em diferentes intervalos de tempo após a polinização (8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas). Os pistilos foram fixados em solução Carnoy (3 partes de etanol:1 parte de ácido acético glacial), por 24 horas, lavados em solução de etanol 70 % e clarificados em solução de sulfito de sódio (10 %) onde o mesmo foi autoclavado por 2 horas, a 120 °C, com o intuito de clarificar e amolecer os tecidos.

A coloração foi feita com solução de azul de anilina (0,01 %) em tampão de fosfato tribásico, overnight. Depositou-se os tecidos sobre lâminas de vidro onde foram submetidas ao processo de esmagamento. Para se verificar a germinação dos grãos de pólen no estigma e o desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do pistilo utilizou-se microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta (MARTIN, 1959). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio OLYMPUS U-RFL-T (Olympus, Tokyo, Japão).

Para avaliar o crescimento do tubo polínico no pistilo nos genótipos diploides e triploides, foram utilizadas dez flores para cada cruzamento, considerando-se sete regiões pré-determinadas conforme o trabalho de Bandeira et al. (2011): 1) tubo polínico no estigma, sem crescimento no estilete; 2) tubo polínico no primeiro terço do estilete; 3) tubo polínico no segundo terço do estilete; 4) tubo polínico no terceiro terço do estilete; 5) tubo polínico no interior do ovário; 6) tubo polínico próximo ao óvulo; e 7) tubo polínico penetrando na micrópila. Foram utilizadas dez repetições (lâminas) para cada

cruzamento. A frequência desses eventos nos cruzamentos foi estimada em cada genótipo conferindo graus, que incluíram: (-) Ausente; (+) Pouco frequente; (++) Frequente; (+++) Muito Frequente.

Em paralelo, foram contabilizados o número e o diâmetro dos óvulos nos diferentes cruzamentos em três frutos da região mediana da penca de plantas diferentes antes da polinização e 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30 e 60 dias após a polinização. Foram medidos 30 óvulos por fruto, observados em um estereomicroscópio Leica EZ4 D (Leica, Wetzlar, Alemanha) utilizando o programa ImageJ 1.46 (RASBAND, 2012). Utilizou-se a análise de regressão e os modelos matemáticos foram ajustados de acordo com as equações e os maiores valores do coeficiente de determinação (R^2). As análises foram realizadas por meio do programa computacional SAS (SAS Institute Inc., 2010).

Foi também contabilizado o número de sementes geradas em cruzamentos aleatórios utilizando o genótipo Calcutta 4, Prata Anã e Grande Naine, em três frutos após o amadurecimento, totalizando três repetições para cada genótipo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os genótipos apresentaram alta porcentagem de germinação dos grãos de pólen sobre o estigma e crescimento do tubo polínico no terço superior e mediano do estilete 8 horas após a polinização, nos três genótipos estudados (Tabela 1; Figuras 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b). Soares et al. (2014), observaram que os grãos de pólen germinaram sobre o estigma de genótipos diploides e triploides, porém a germinação em diploides é mais rápida e em maior quantidade. Essa diferença entre os genótipos também foi registrada nesse trabalho. Cerca de 24 horas após a polinização já foi possível detectar o crescimento de inúmeros feixes de tubos polínicos contínuos na entrada do ovário no genótipo Calcutta 4, sendo que esse evento só foi observado nos genótipos triploides, 32 horas após polinização e em menor quantidade (Tabela 2; Figuras 1b, 1c, 2e, 3f, 3g).

Schifino-Wittmann e Dall’Agnol (2002) e McClure et al. (2011) relataram que quando há uma compatibilidade entre os grãos de pólen e estigma, ocorre uma deposição reticulada de calose no interior do tubo polínico, que tem a função de proteger e permitir o seu transporte até ovário e conseqüentemente a fertilização. Porém, se houver incompatibilidade a deposição de calose ocorre de forma irregular com o rompimento e inibição do crescimento do tubo polínico.

Outras funções são atribuídas à calose como a manutenção da pressão de turgescência e manutenção do equilíbrio osmótico em seu interior (UNAL et al., 2013), bem como à sua deposição em intervalos periódicos, formam tampões que mantêm a expansão dos tubos polínicos na região apical ativa (GEITMANN; STEER, 2006).

Tabela 1. Frequência e horário de observação dos eventos da dinâmica do crescimento do tubo polínico em bananeiras diploides e triploides após a polinização utilizando pólen de Calcutta 4.

| Eventos | Parentais femininos | | |
|--|---------------------|------------------|---------------------|
| | Calcutta 4 AA | Prata Anã AAB | Grande Naine AAA |
| Germinação dos grãos de pólen sobre o estigma | +++ (8h) | +++ (8h) | +++ (8h) |
| Penetração dos tubos polínicos no terço superior do estilete | +++ (8h) | +++ (8h) | +++ (8h) |
| Penetração dos tubos polínicos no terço mediano do estilete | +++ (24h) | +++ (24h) | +++ (24h) |
| Penetração dos tubos polínicos no terço inferior do estilete | +++ (24h) | +++ (24h) | ++ (24h) |
| Penetração dos tubos polínicos na região do nectário | +++ (24h) | + (32h) | + (32h) |
| Penetração dos tubos polínicos na entrada do ovário | +++ (32h) | + (32h) | - (32h) |
| Tubos polínicos fertilizando os óvulos | +++ (32h) | - (48h) | - (48h) |

(-) Ausente; (+) Pouco frequente; (++) Frequente; (+++) Muito Frequente. (8, 24, 32, 48 horas após a polinização).

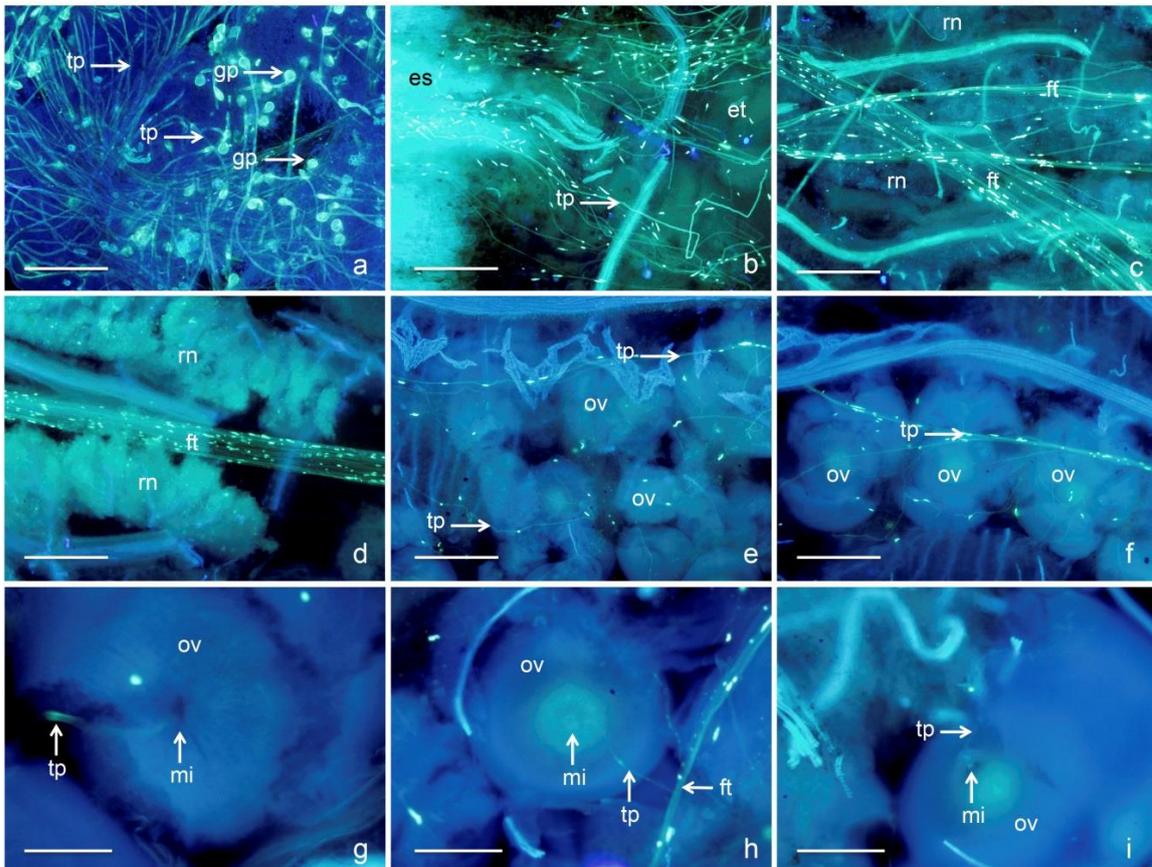


Figura 1. Dinâmica do crescimento do tubo polínico em bananeira diploide. Híbridações entre Calcutta 4 (AA) (♀) e SH3263 (AA) (♂). a) Germinação dos grãos de pólen sobre o estigma 8 horas após a polinização; b) Tubos polínicos crescendo no primeiro terço do estilete, 24 horas após a polinização; c-d) Feixes de tubos polínicos passando pelo nectário, 32 horas após a polinização, evidenciando a deposição de calose regular nos tubos polínicos; e-f) Tubos polínicos no interior do ovário 32 horas após a polinização, evidenciando a grande quantidade de tubos polínicos nesta região e circundando os óvulos; g-i) Tubos polínicos penetrando na micrópila 32, 56 e 72 horas após a polinização, respectivamente. es) estigma; et) estilete; ft) feixes de tubos polínicos; fv) feixe vascular; gp) grão de pólen; ov) óvulo; mi) micrópila; pc) placas de calose; pl) placenta; rn = região do nectário; tp) tubo polínico. Barras = a-f) 1 mm; g-i) 200 μ m.

As diferenças observadas entre os cruzamentos foram a partir do terço inferior do estilete, sendo que em Grande Naine os tubos polínicos foram visualizados em menor quantidade quando comparados com a Calcutta 4 e Prata Anã. Essa redução do número de tubos polínicos é mais acentuada na

região do nectário (entrada do ovário) em Grande Naine e Prata Anã (Tabela 1; Figuras 1c-d, 2c-d, 3d)

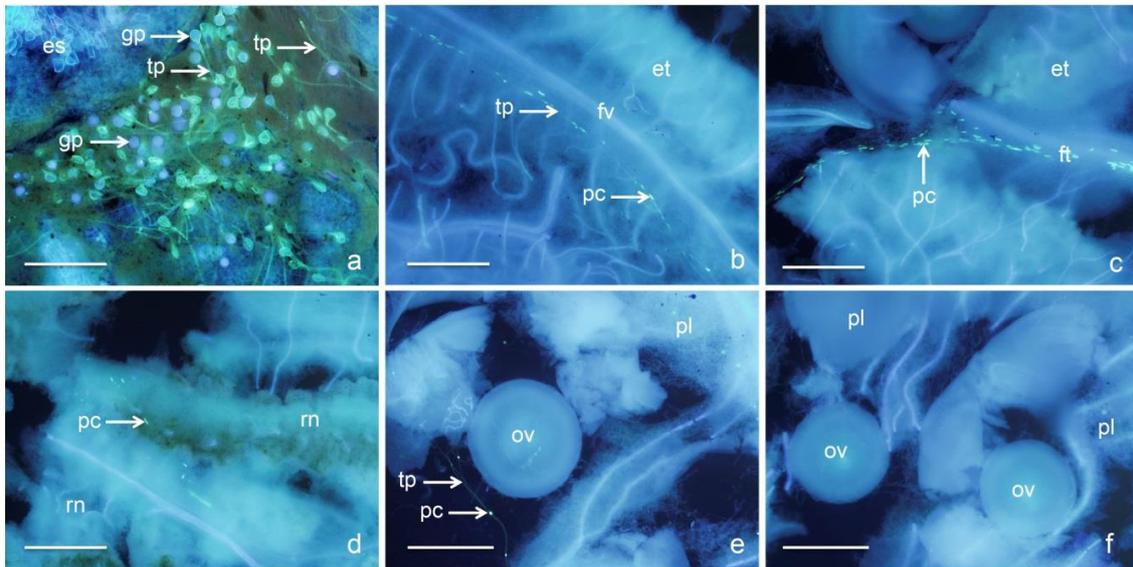


Figura 2. Dinâmica do crescimento do tubo polínico em bananeira triploide Prata Anã (AAB) (♀) em hibridações com Calcutta 4 (AA) (♂). a) Germinação dos grãos de pólen sobre o estigma 8 horas após polinização; b) Tubos polínicos crescendo no primeiro terço do estilete às 24 horas após a polinização, evidenciando poucos tubos nessa região; c-d) Tubos polínicos passando pela região necrosada do nectário 32 horas após a polinização, evidenciando a desorientação de alguns tubos polínicos e a deposição de calose irregular; e) Poucos tubos polínicos circundando os óvulos no interior do ovário 32 horas após a polinização; f) Ovário evidenciando óvulos não fertilizados 56 horas após a polinização. es) estigma; et) estilete; ft) feixes de tubos polínicos; fv) feixe vascular; gp) grão de pólen; ov) óvulo; pc) placas de calose; pl) placenta; rn = região do nectário; tp) tubo polínico. Barras = 1 mm.

Em relação à penetração dos tubos polínicos no ovário, o genótipo Calcutta 4 apresentou uma elevada quantidade de tubos polínicos, demonstrando que não existem barreiras físicas que inviabilizem a fertilização no genótipo diploide analisado. Em contraste, em ambas as cultivares triploides (Prata Anã e Grande Naine) não houve penetração dos tubos polínicos, confirmando a existência de algum nível de barreira reprodutiva que compromete a fertilização (Tabela 1).

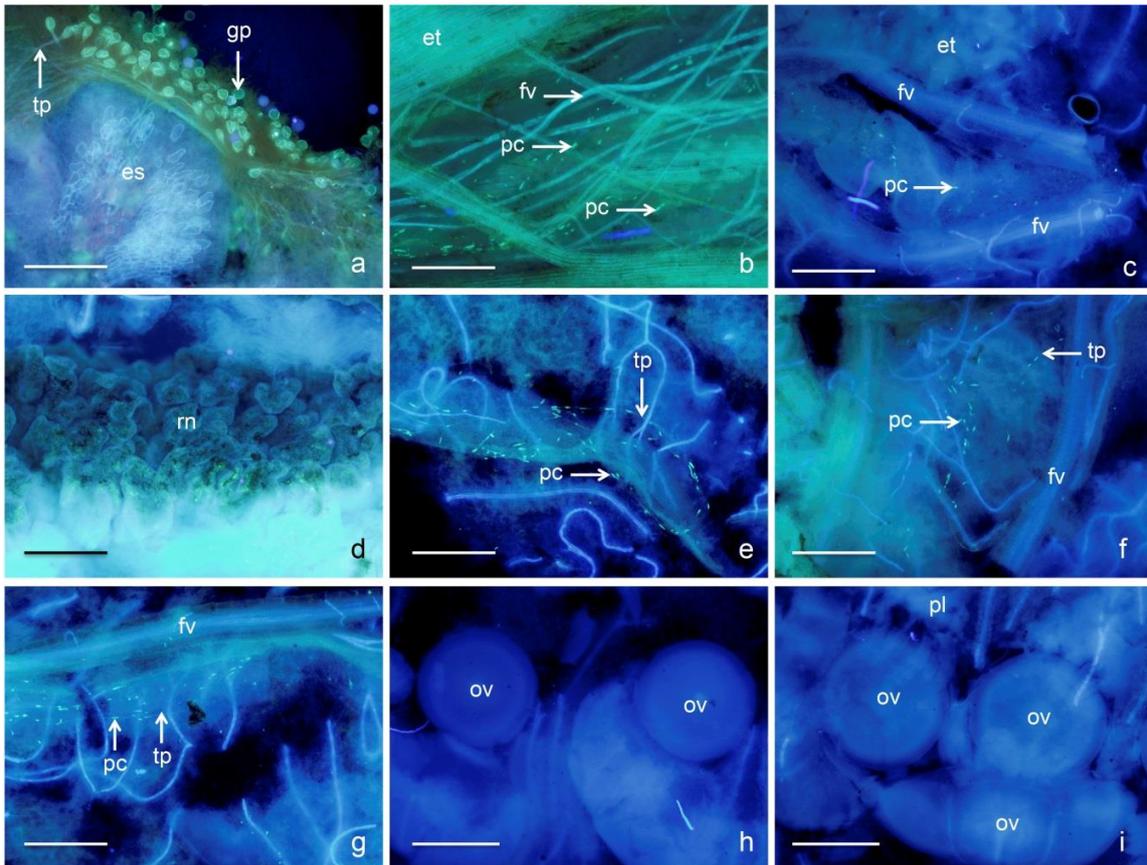


Figura 3. Dinâmica do crescimento do tubo polínico em bananeira triploide Grande Naine (AAA) (♀) em hibridizações com Calcutta 4 (AA) (♂). a) Germinação dos grãos de pólen sobre o estigma 8 horas após polinização; b) Tubos polínicos crescendo no primeiro terço do estilete 24 horas após a polinização; c-d) Poucos tubos polínicos passando no terceiro terço do estilete 32 horas após a polinização; d) Região do nectário evidenciando a ausência de tubos polínicos 32 horas após a polinização; e-g) Tubos polínicos enovelados, desorientados e sessando o crescimento na região necrosada do nectário 48, 56 e 72 horas após polinização, respectivamente; h-i) Ovário evidenciando ausência de tubos polínicos e óvulos não fertilizados, 56 e 72 horas após a polinização, respectivamente. es) estigma; et) estilete; fv) feixe vascular; gp) grão de pólen; ov) óvulo; pc) placas de calose; pl) placenta; rn = região do nectário; tp) tubo polínico. Barras = 1 mm.

Foi possível observar tubos polínicos circundando os óvulos e inúmeros óvulos fertilizados 32 horas após a polinização em Calcutta 4 (Tabela 2; Figuras 1e-i). Já em Prata Anã poucos tubos foram observados circundando os óvulos mais próximos do estigma. No nectário de Grande Naine foram observadas anormalidades do tubo polínico, como tubos retorcidos, tubos polínicos curtos ou crescendo em direção oposta e sem orientação, deposição

irregular de calose e crescimento tardio e insuficiente (Tabela 2; Figuras 2d, 3e-g). Essas anormalidades inviabilizam o processo de fertilização nesse genótipo.

Simmonds (1962) observou que a fertilização em bananeira ocorre a partir das doze horas após a polinização. No entanto, este tempo pode variar em relação à distância percorrida pelo tubo polínico, sendo que a fertilização pode acontecer tardiamente em regiões do ovário que são mais distantes do estigma.

O mecanismo genético que controla o crescimento dos tubos polínicos em bananeira ainda é desconhecido, porém, em outras espécies existem diversos trabalhos relacionados à sinalização, modulação e orientação do crescimento do tubo polínico, expressão de genes na elongação do tubo polínico e mecanismos regulatórios da dupla fertilização (TONG, 1999; HIGASHIYAMA; KUROIWA, 2003; WILSEN; HEPLER, 2007; RENAULT et al., 2011; BLECKMANN et al., 2014).

O crescimento direcional do tubo polínico está ligado ao fluxo de íons de cálcio na região apical do tubo polínico e algumas proteínas podem também estar envolvidas nessa regulamentação (ZHENG et al., 2004; TIAN et al. 2006; BLECKMANN et al., 2014).

Enovelamento, dilatação, espiralamento e variações no diâmetro dos tubos polínicos são anormalidades descritas por Williams et al. (1982) em espécies de Ericaceae. Já Sangduen et al. (1983) e Ojangu et al. (2012) observaram outras anormalidades no gênero *Arabidopsis*, a exemplo, dois tubos polínicos penetrando o mesmo óvulo, tubos polínicos curtos ou crescendo em direções opostas aos ovários e deposições irregulares de calose na extremidade.

O parental feminino pode ser também responsável pelo crescimento direcional do tubo polínico dentro dos tecidos do estigma (DAI et al., 2014). A ocorrência de interações positivas e negativas do parental feminino que influenciam na fertilização já foram observadas em diferentes espécies. Pechan (1988) observou em *Brassica napus* (Família Brassicaceae), que os estímulos químicos oriundos da região do ovário, influenciam no crescimento do tubo polínico.

Diversos autores relatam que o tecido transmissor feminino tem a função de nutrir o tubo polínico e é composto por polissacarídeos, proteínas, dentre

outras substâncias, responsáveis pelo crescimento e orientação (CHEUNG, 1996; TAYLOR; HEPLER, 1997; SOUZA et al., 2002; LERSTEN, 2004).

Em um estudo anatômico do pistilo de *Cyclamen persicum* (Família Primulaceae), observou-se que na pós-antese, ocorreu um mecanismo de fechamento na região terminal do estilete e conseqüentemente uma redução no número de sementes (REINHARDT, et al., 2006).

Anormalidades na meiose feminina também podem impedir a fertilização. Fortescue e Turner (2005c) detectaram anomalias no saco embrionário, oriundas de uma meiose irregular, as quais podem influenciar na esterilidade das bananeiras triploides.

Outro fator que pode estar reduzindo ou inviabilizando a produção de sementes nos genótipos triploides é a presença de uma região necrosada no nectário, que impede a passagem dos tubos polínicos, conforme sugerido por Shepherd et al. (1986). Em estudos anteriores, Santos-Serejo et al. (2011) e Rocha et al. (2013a) utilizaram extratos forais de bananeira (do estigma e do nectário) no meio para cultivo in vitro de grãos de pólen e observaram que concentrações acima de 5-10% inibiam o crescimento do tubo polínico.

Com base nestas observações, Rocha et al. (2013b) analisaram o tipo de substâncias que compõem o extrato aquoso destas regiões florais e encontraram altas concentrações de compostos fenólicos nos genótipos triploides e baixa concentração nos diploides.

Outro fator que influencia na produção de sementes é o número de óvulos presentes no fruto para serem fertilizados. Os genótipos Calcutta 4, Prata Anã e Grand Naine apresentaram uma média de 246, 348 e 258 óvulos por fruto, respectivamente (Figura 5). Esses valores corroboram com Bakry et al. (2009) que observaram de 300 a 600 óvulos por fruto em cultivares triploides de bananeira.

A análise de regressão apontou diferenças significativas no diâmetro dos óvulos nos genótipos, ao longo dos dias após a polinização. O genótipo Calcutta 4 apresentou crescimento nos óvulos fertilizados ao longo dos sessenta dias após a polinização (Figuras 4, 5a, 5d, 5g, 5j, 5m, 5p) com elevada produção de sementes. As sementes geradas nesse genótipo chegam a medir 6,50 mm. No genótipo Prata Anã observou-se um crescimento contínuo dos óvulos até o 14º dia e após esse período houve uma redução de tamanho,

em virtude do abortamento da maioria dos óvulos (Figuras 4, 5b, 5e, 5h, 5k, 5n, 5q).

Em Grande Naine não houve crescimento dos óvulos até o 5º dia, e após esse período, ocorreu um declínio no diâmetro dos óvulos em virtude da não fertilização e consequentemente abortamento dos mesmos (Figuras 4, 5c, 5f, 5i, 5l, 5o, 5r).

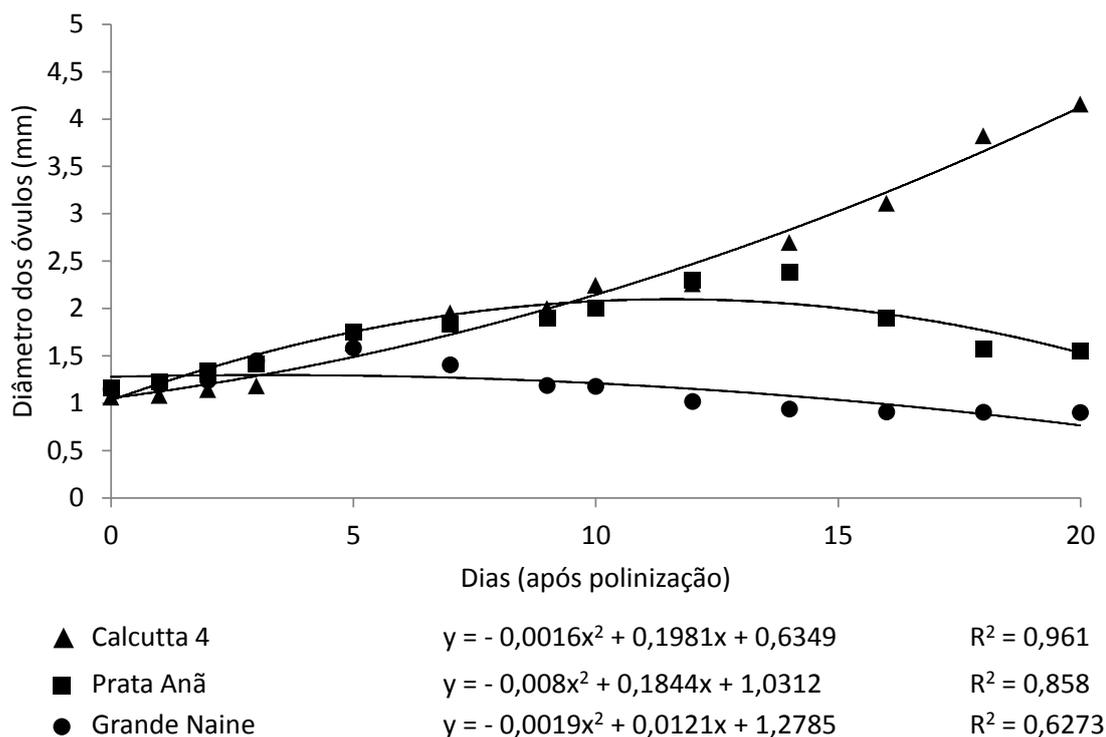


Figura 4. Diâmetro dos óvulos de bananeiras diploides (AA) e triploides (AAA, AAB), de 0 a 60 dias após a polinização manual.

Foram encontradas uma média de 98 sementes por fruto para o genótipo Calcutta 4 (AA), em contrapartida nenhuma semente foi registrada para o genótipo Prata Anã (AAB) e Grande Naine (AAA). Os óvulos que foram fertilizados no diploide foram aumentando de tamanho e preenchendo toda a placenta, ao passo que nos genótipos triploides os óvulos foram se degenerando a partir de 15 e 20 dias após a polinização, respectivamente na Grande Naine e Prata Anã, adquirindo uma coloração amarronzada, aumentando assim a quantidade de polpa no fruto. Fortescue e Turner (2005a) também relataram a ocorrência de degeneração dos óvulos em bananeiras do

subgrupo Cavendish (AAA) e em triploides AAB, que quando comparado com os diploides (AA) que apresentaram desenvolvimento completo da semente.

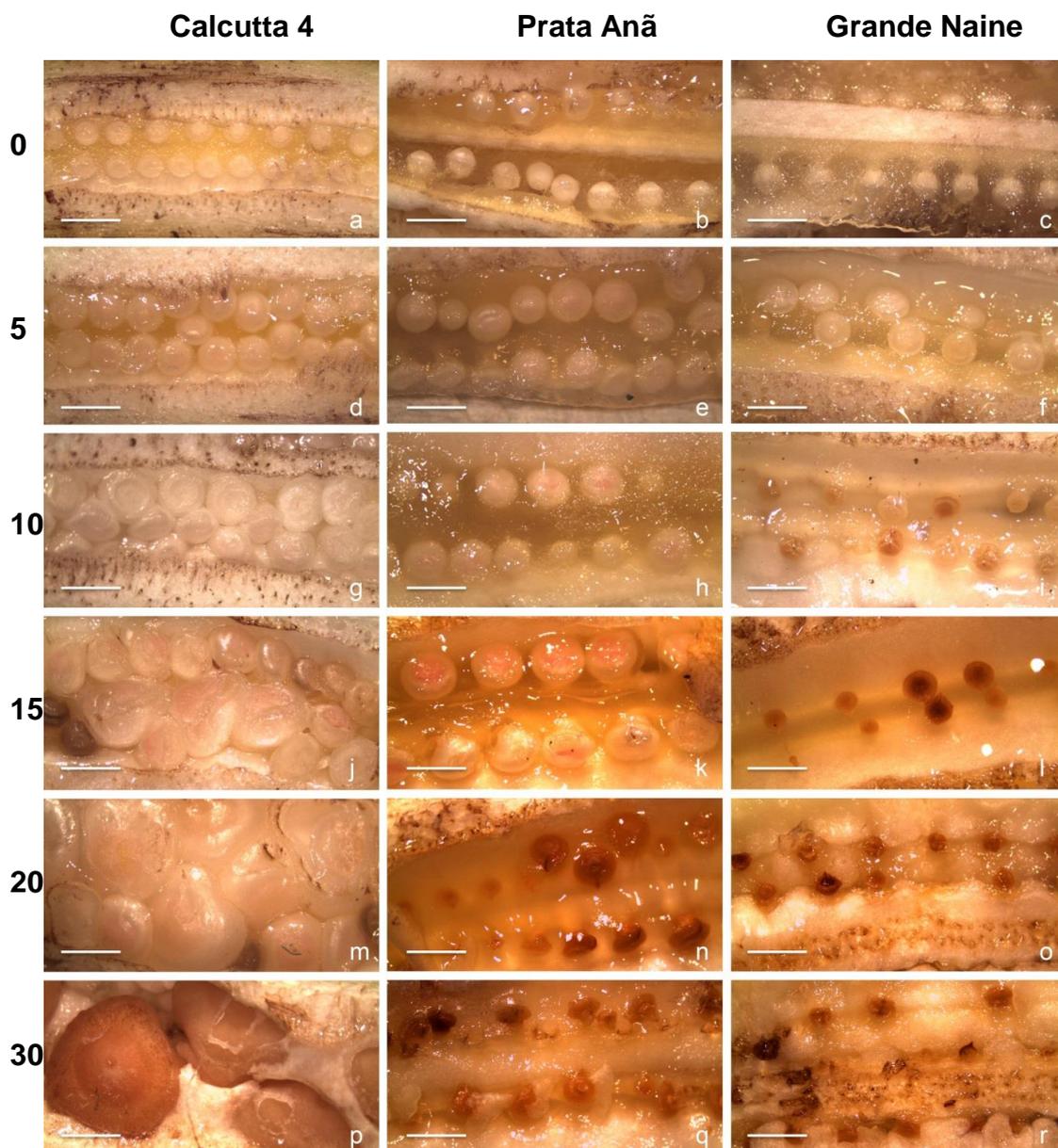


Figura 5. Desenvolvimento dos óvulos em bananeiras diploides e triploides. a,d,g,j,m,p) Calcutta 4; b,e,h,k,n,q) Prata Anã; c,f,i,l,o,r) Grande Naine; a-c) controle - sem polinização; d-f) 5 dias após polinização; g-i) 10 dias após polinização; j-l) 15 dias após polinização; m-o) 20 dias após polinização; p-r) 30 dias após polinização.

Crouch et. al. (1998) observaram uma baixa produção de sementes em alguns genótipos triploides de bananeira em função da esterilidade dos

gametas, desenvolvimento tardio e irregular dos tubos polínicos e outras causas desconhecidas.

As causas da ausência de sementes e, conseqüentemente, da esterilidade em bananeira também podem ser resultado da intensa seleção agrônômica e um reflexo do processo de domesticação da espécie (SHEPHERD et al., 1986). Yoshiaki et al. (2001) relataram que uma das causas da rápida evolução das barreiras reprodutivas em híbridos de arroz, pode ter sido em decorrência do processo de domesticação da espécie.

Bakry et al. (2009) observaram que cruzamentos envolvendo diploides de bananeira (AA), exibem uma ampla fertilidade e pode-se obter até 5.000 sementes por cacho, entretanto, em cultivares triploides, o número de sementes por cacho é bastante reduzido quando comparado aos diploides. Oloumi e Rezanejhadi (2009) verificaram uma diminuição significativa no número de sementes de genótipos do gênero *Petunia* que apresentaram algum tipo de anomalia no crescimento tubo polínico.

O número de sementes reduzido pode ser também devido a anormalidades genéticas resultantes da meiose, por exemplo, o emparelhamento irregular, nos estágios de desenvolvimentos dos grãos de pólen, gerando gametas desbalanceados (RAMSEY; SCHEMSKE, 2002; NGHIEM, 2013).

A fertilização e, conseqüentemente, a produção de sementes foi comprometida no genótipo Prata Anã e Grande Naine, em virtude de problemas no crescimento do tubo polínico na região do nectário da flor feminina, que provavelmente, configura-se como uma barreira reprodutiva que causa diferentes níveis de esterilidade nos genótipos triploides de bananeira.

CONCLUSÕES

A fertilização em bananeiras diploides ocorreu 32 horas após a polinização, onde houve um crescimento contínuo dos óvulos ao longo dos dias após a polinização, evidenciando que não existem barreiras reprodutivas que comprometem a formação de sementes. Entretanto, em bananeiras triploides, a ausência de fertilização e o resultante aborto dos óvulos podem estar

relacionados à ocorrência de anormalidades no crescimento do tubo polínico na região do nectário, configurando-se como uma barreira reprodutiva que causa a esterilidade em bananeiras triploides.

REFERÊNCIAS

BAKRY, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; HORRY, J.-P. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. (Ed.). **Breeding plantation tree crops: Tropical Species**. New York: Springer, p. 3-46, 2009.

BANDEIRA, J. M.; THUROW, L. B.; PETERS, J. A.; RASEIRA, M. C. B.; BIANCHI, V. J. Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 860-867, 2011.

BLECKMANN, A.; ALTER, S.; DRESSELHAHUS, T. The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization. **Frontiers in Plant Science**. Lausanne, v. 5, n. 142, p. 452, 2014.

CHEUNG, A. Y. Pollen-pistil interactions during pollen tube growth. **Trends Plant Science**. San Diego, v. 1, n. 2, p. 45-55, 1996.

CROUCH, J. H.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa spp.*). **Electronic Journal of Biotechnology**, Dordrecht, v. 1, p. 1-12, 1998.

DAI, X. R.; CHEN, G. H.; TANG, L. L.; Wang, H.; ZHANG, X. S. Abnormal pollen tube guidance, an endoplasmic reticulum-localized mannosyltransferase homolog of glycosylphosphatidylinositol in yeast and phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis in human, is required for arabidopsis pollen tube micropylar guidance and embryo development. **Journal of Plant Physiology**. Jena, v. 165, n. 4, p. 1544-1556, 2014.

FAN, B. Y., GAO, S. P. Preliminary study on the form time of pollen tube pathway of Peony (*Paeonig suffruticosa* Andr). **Journal of Henan Agricultural Sciences**. West Sussex, v. 5, p. 51-52, 2004.

FAO, FOOD AND AGRICULTUR ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Faostat. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 17 Apr. 2015.

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

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

GEITMANN, A.; STEER, M. The Architecture and properties of the pollen tube cell wall. In: MALHO, R. **The Pollen Tube: A Cellular and Molecular Perspective**. Ed. Springer. Berlin, Germany., v. 3, p. 177–200. , 2006.

HIGASHIYAMA, T; KUROIWA, H.; KUROIWA, T. Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. **Current Biology**. London. v. 6, p. 36-41, 2003.

HOGENBOOM, N. G. A model for incongruity in intimate partner relationships. **Euphytica**. Wageningen. v. 22, n. 2, p. 219-233, 1973.

KEARS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993.

LERSTEN, N. R. **Flowering Plant Embryology**. Blackwell Publishing Professional. State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 2004.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, Baltimore, v. 37, n. 3, p. 125-128, 1959.

McCLURE, B.; GARCI, C. F.; ROMERO, C. Compatibility and incompatibility in SRNase-based systems. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, p. 647–658, 2011.

NGHIEM, Q. C., HARBARD, J. L., HARWOOD, C. E., GRIFFIN A. R., HA, T. H. & KOUTOULIS, A. Pollen-pistil interactions between autotetraploid and diploid *Acacia mangium* and diploid *A. auriculiformis*. **Journal of tropical forest science**. Malaysia, v. 25. n. 1, p. 96-110, 2013.

OJANGU, E. L.; TANNER, K.; PATA, P.; JARVE, K.; HOLWEG, C. L.; TRUVE, E.; PAVES, H. Myosins XI-K, XI-1, and XI-2 are required for development of pavement cells, trichomes, and stigmatic papillae in *Arabidopsis*. **Plant Biology**. Oxford, v. 12, n. 81, p. 1471-2229, 2012.

OLIVEIRA, S. O. de; ALVES, E. J.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L. Cultivares. In: ALVES, E. J. (Org.) **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2.ed., Brasília: Embrapa- SPI / Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, p. 85-105, 1999.

OLOUMI, H.; REZANEJHAD, F. Response of pollen tube growth and seed set to controlled pollination and their relation to self-incompatibility in different cultivars of *Petunia hybrida*. **Grana**. Kerman, v. 48, n. 2, p. 102-108, 2009.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Interspecific and intergeneric fertilization barriers in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 552, p. 43-54, 2001.

PECHAN, P. M. Ovule fertilization and seed number per pod determination in oil seed rape (*Brassica napus*). **Annals of Botany**. Oxford, v. 61, n. 2, p. 201-207, 1988.

RAMSEY J., SCHEMSKE, D. W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 33, p. 589-639, 2002.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

REINHARDT, S.; EWALD, A.; HELLWIG, F. The anatomy of the stigma and style from *Cyclamen persicum* (Mill.) cv. "Pure White" and its relation to pollination success. **Plant Biology**. Oxford, v. 9, p. 158–162. 2006.

RENAULT, H.; AMRANI, A.; PALANIVELU, R.; UPDEGRAFF, E. P.; YU, A.; RENOU, J. P.; PREUSS, D.; BOUCHEREAU, A.; DELEU, C. GABA Accumulation causes cell elongation defects and decrease e expression of genes econding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**. Oxford. v. 52, n. 5, p. 894-908, 2011.

ROCHA, M. M.; SOARES, T. L.; SANTOS-SEREJO, J. A. Efeito de extratos florais de Grande Naine sobre a germinação in vitro de grãos de pólen. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT. Resumo. Instituto Frutal: Acorbat Internacional, 2013a.

ROCHA, M. M.; DIAS, F. S.; SANTOS- SEREJO, J. A. Extracción mediada por ultrasonido y determinación espectrofotometrica de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en muestras de ovario e estigma de banana. In: 7 Congresso de Química Analítica. Mendonza. VII Congresso Argentino de Química Analítica, 2013b.

SANTOS-SEREJO, J. A. ; SOARES, T. L.; SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. de C. Influence of floral tissue extracts on in vitro pollen germination ond pollen tube growth in banana. In: ISHS/Promusa Symposium Banana and Plantains. Salvador. 2011. p. 137.

SANGDUEN, N.; SORENSEN, E. L.; LIANG, G. H. Pollen germination and pollen tube growth following self-pollination and intra- and interspecific pollination of *Medicago* species. **Euphytica**, Wageningen. v. 32, n. 2, p. 527-534, 1983.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Self-Incompatibility in Plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.

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

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

SHERPHERD, K. Banana: taxonomia e morfologia. In: **Simpósio Brasileiro sobre Bananicultura**. Jaboticabal. v. 1. Anais. Jaboticabal, SP: FCAVJ/Unesp. p.50-74, 1984.

SILVA, S. O.; PIRES, E. T.; PESTANA, R. K. N.; ALVES, J. S. A.; SILVEIRA, D. C. Avaliação de clones de banana Cavendish. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 832-837, 2006.

SIMMONDS, N. W. **The evolution of bananas**. Tropical Agriculture Series. 1962.

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.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. *In vivo* fertilization of banana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 37-42, 2014.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

SSEBULIBA, R.; TALENGERA, D.; MAKUMBI, D.; NAMANYA, P.; TENKOUANO, A.; TUSHEMEREIRWE, W.; PILLAY, M. Reproductive efficiency

and breeding potential of East African highland (*Musa* AAA-EA) bananas. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 95, n. 2-3, p. 250–255, 2005.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.

TAYLOR, L. P.; HEPLER P. K. Pollen Germination and Tube Growth. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 48, p. 41-51, 1997.

TIAN, H. Q., YUAN, T. Calcium function in fertilization process in angiosperms. **Acta Physiologica Sinica**. China, v. 26, n. 5, p. 369-380, 2000.

TONG, V. E. F. Signaling and Modulation of Pollen Tube Growth. **The plant Cell**. Waterbury v. 11, p. 727-738, 1999.

ÜNAL, M.; VARDAR, F.; ARTÜRK, O. Callose in Plant Sexual Reproduction. In: SILVA-OPPS, M. (Ed.) **Current Progress in Biological Research**. Croatia: InTech, p. 319-343, 2013.

VERVAEKE, I., PARTON, E., DEROOSE, R. e DE PROFT M. P. Controlling prefertilization barriers by *in vitro* pollination and fertilization of Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague. v. 572, p. 21-28, 2002.

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT M. P. Prefertilization barriers between different Bromeliaceae. **Euphytica**, Wageningen, .v. 118, n. 1, p. 91-97, 2001.

WILLIAMS, E. G.; KNOX, R. B.; ROUSE, J. L. Pollination sub-systems distinguished by pollen tube arrest after incompatible interspecific crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). **Journal of Plant Cell Sciences**. v. 53, p. 255-277, 1982.

WILSEN, K. L.; HEPLER, P. K. Sperm Delivery in Flowering Plants: The Control of Pollen Tube Growth. **BioScience**. Oxford. v. 57, n. 10, p. 835-844, 2007.

YI, W.; LAW, E.; MCCOY, D.; WETZSTEIN, H. Y. Stigma development and receptivity in Almond (*Prunus dulcis*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 57-63, 2006.

YOSHIKI, H.; NAKAGAHRA, M.; YANO, M.; SASAKI, T.; KURATA, N. Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 160, n. 1, p. 313-322, 2001.

ZHENG, M. Z., YANG, Y. H., GUO, J., QIU, Y. L., XIE, C. T., TIAN, H. Q. The primary observation of calcium distribution during the anther development of tobacco. **Journal of Xiamen University. Natural Science**, v. 43, p. 126-132, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre parâmetros reprodutivos são fundamentais para garantir o sucesso na obtenção de híbridos com boas características agronômicas, que possam atender ao mercado consumidor, sendo que a concentração de um maior número de características favoráveis em um único genótipo são um dos objetivos do melhoramento genético de bananeira.

Esse trabalho buscou estudar os aspectos reprodutivos em bananeira, com o intuito de obter uma maior compreensão do processo de esterilidade na cultura. A utilização de metodologias como a morfologia e viabilidade polínica; a morfoanatomia e receptividade estigmática, bem como o uso de técnicas inovadoras como a microscopia de fluorescência para estudo da fertilidade, permitiram a obtenção de informações importantes a respeito das causas da esterilidade em bananeiras triploides.

Os conhecimentos adquiridos no presente estudo servirão de base para o desenvolvimento de estratégias para superar o problema da esterilidade em bananeira, contribuindo significativamente para o melhoramento genético da cultura.