

Análise Histoquímica dos Grãos de Pólen de Híbridos Diploides de *Musa acuminata*

Laecio Fernandes Souza Sampaio¹; Taliane Leila Soares²; Janay Almeida dos Santos-Serejo³

Resumo

A viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas, pois evidencia a potencialidade reprodutora masculina da espécie, além de contribuir em estudos ecológicos e palinológicos, fornecendo informações para aplicação prática na conservação genética e técnicas de melhoramento ou cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade polínica de diploides melhorados de bananeira (AA) coletados na época chuvosa em diferentes períodos após a abertura da flor masculina (antese), por meio de análise histoquímica. Foram avaliados cinco horários de coleta de pólen: 8h, 10h, 12h, 14h e 16 h. A viabilidade do pólen foi avaliada pela coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Os maiores valores de viabilidade polínica (VP) foram obtidos às 8h da manhã e os mais baixos às 16h. Dentre os genótipos analisados 089087-01 e 050012-01 foi o que apresentou os mais altos e mais baixos valores de VP com 86,0% e 34,13%, respectivamente quando as flores foram coletadas às 8h. O percentual médio de viabilidade do pólen em bananeiras diploides foi negativamente influenciado pelo número de horas após a antese. O melhor horário de coleta do pólen, com relação à germinação e viabilidade, é às 8h da manhã.

Introdução

Estudos dirigidos à fertilidade dos grãos de pólen de bananeira *Musa acuminata* sp. são de grande importância para dimensionar a potencial dessas espécies para utilização em cruzamentos dirigidos visando à criação de novas cultivares.

A análise da viabilidade do pólen fornece um indicativo da fertilidade masculina, permitindo maior direcionamento e segurança nos cruzamentos realizados, e aumentando a eficiência na obtenção de híbridos. Existem quatro métodos para estimar a viabilidade do pólen: 1) teste de germinação *in vitro*; 2) teste colorimétrico; 3) teste de germinação *in vivo*, avaliando o crescimento do tubo polínico no estigma e ou pistilo e 4) formação de sementes após a polinização de um gameta feminino selecionado (Dafni 1992, Kearns e Inouye 1993). Em qualquer método de polinização, a viabilidade de pólen é considerada satisfatória quando está entre 50% a 70 (Scorza e Sherman 1995).

No campo, o pólen é viável somente por algumas horas e apresenta um curto tempo de vida, pois está sujeito às variáveis do tempo (temperatura, intensidade luminosa e alta umidade). À medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. Portanto, é conhecer o melhor momento de coleta do pólen para a obtenção de maior porcentagem de grãos de pólen viáveis é fundamental na produção de sementes híbridas, particularmente em espécies onde há a possibilidade de hibridação artificial (Nascimento et al. 2003).

Baseado nessas informações, o objetivo do trabalho foi determinar o melhor horário de coleta do pólen e a viabilidade polínica dos híbridos diplóides de bananeira, mediante a análise histoquímica com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura situada no município de Cruz das Almas, Bahia, a 12° 39' 13" de latitude sul e 39° 07' 21" de longitude oeste, durante o mês de abril de 2011, com temperatura variando de 21,7 °C a 28,0 °C e umidade relativa de 93,3%. Os dados meteorológicos foram fornecidos pela Estação de Meteorologia da Embrapa.

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

¹ Estudante de Graduação do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP: 44380-000, E-mail: laecio.agro@gmail.com.

² Pós-Doutoranda Embrapa Mandioca e Fruticultura/UFRB, Cruz das Almas, BA, E-mail: talialeila@gmail.com.

³ Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, E-mail: janay@cpmpf.embrapa.br.

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

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

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

Os grãos de pólen foram coletados de flores na antese (momento em que a flor está completamente aberta, permitindo a liberação do pólen), retirados da mesma bráctea, em cinco horários distintos (8, 10, 12, 14 e 16 h). Em seguida, amostras oriundas de cada horário de coleta foram utilizadas para coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% diluído em tampão tris HCl 0,15M, pH 7,8, visando analisar a viabilidade do pólen.

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

A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados foi utilizado o método de varredura da lamina em um microscópio ótico com lente objetiva de 10x, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 5 (genótipo x hora de coleta) com três repetições cada. Os dados de porcentagem foram transformados para $\arcsin(\sqrt{x/100})$ antes da análise estatística. Para avaliar a relação da viabilidade com o horário de coleta das flores masculinas foi realizada a análise de variância, com a comparação de médias efetuada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em complementação à análise estatística para o teste de viabilidade, utilizou-se a análise de regressão e os modelos matemáticos foram escolhidos segundo equações com melhores ajustes, confirmado pelos maiores valores de coeficiente de determinação (R^2) e o teste F da regressão, ambos a 5% de probabilidade. O programa utilizado para análise dos dados foi o SISVAR (Ferreira 2008).

Resultados e Discussão

De acordo com os dados compilados na Tabela 2, observou-se diferenças significativas para a viabilidade polínica (VP) de amostras de grãos de pólen de bananeiras diploides coletadas em diferentes horários no período chuvoso.

Em todos os genótipos testados a maior media de VP foi apresentada nas coletas realizadas às 8 horas. Dentre os genótipos avaliados destacou-se o diplóide 089087-01 que apresentou maior valor de viabilidade de pólen, com 86,0%, quando as flores foram coletadas às 8 horas, sendo superior aos demais genótipos em todos os horários de coleta. Em contrapartida o genótipo 050012-01 apresentou os valores mais baixos para VP em todos os horários de coleta, com 34,13% e 11,79% nas coletas de 8 e 16 horas, respectivamente, conforme mostra a tabela 1.

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

Genótipos	Viabilidade polínica (%)				
	8h	10h	12h	14h	16h
8987-01	86,00 aA	72,43 aB	62,97 aC	51,30 aD	46,03 aD
04252-04	74,97 bA	63,13 bB	56,10 abB	46,43 abC	42,73 aC
9187-01	65,87 cA	55,77 bcB	48,70 bcBC	41,73 bcC	41,90 abC
1318-01	57,83 dA	55,20 bcA	42,73 cB	37,30 cdB	38,27 abB
88 A79-01	46,57 eA	51,43 cB	41,43 cBC	33,03 dcD	34,70 cD
5012-01	34,13 fA	24,43 dB	17,87 dC	17,77 eC	11,70 dD
C.V (%)	4,26				

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

Os maiores valores de VP foram obtidos às 8h e os mais baixos às 16h, ou seja, existe a tendência de queda percentual à medida que aumenta o tempo após a abertura da flor. Segundo Soares (2011), que analisou a viabilidade de pólen de bananeira durante o período mais seco do ano e com temperatura mais elevada, os valores mais altos de VP, obtidos às 8h, são explicados pelo fato de que nesse horário de coleta o pólen encontra-se em adequado estágio de desenvolvimento fisiológico (imediatamente após a antese), observando-se, portanto, uma redução nos valores dessas variáveis ao longo do dia. Vale ressaltar que a porcentagem de grãos pólen viáveis dos genótipos analisados é menor no período chuvoso comparado ao observado no período mais seco (Soares et al., 2010).

Na análise de regressão, observou-se que o percentual de viabilidade polínica foi influenciado negativamente pelo número de horas após a antese (figura 1). Houve relação linear entre a VP (y) e os horários de coleta (x), com maiores médias de viabilidade obtidas às 8h, e a mais baixa às 16h. Portanto, o conhecimento do momento adequado de coleta dos grãos de pólen é altamente relevante para o programa de melhoramento genético da bananeira, principalmente quando se quer obter maior eficiência nos cruzamentos.

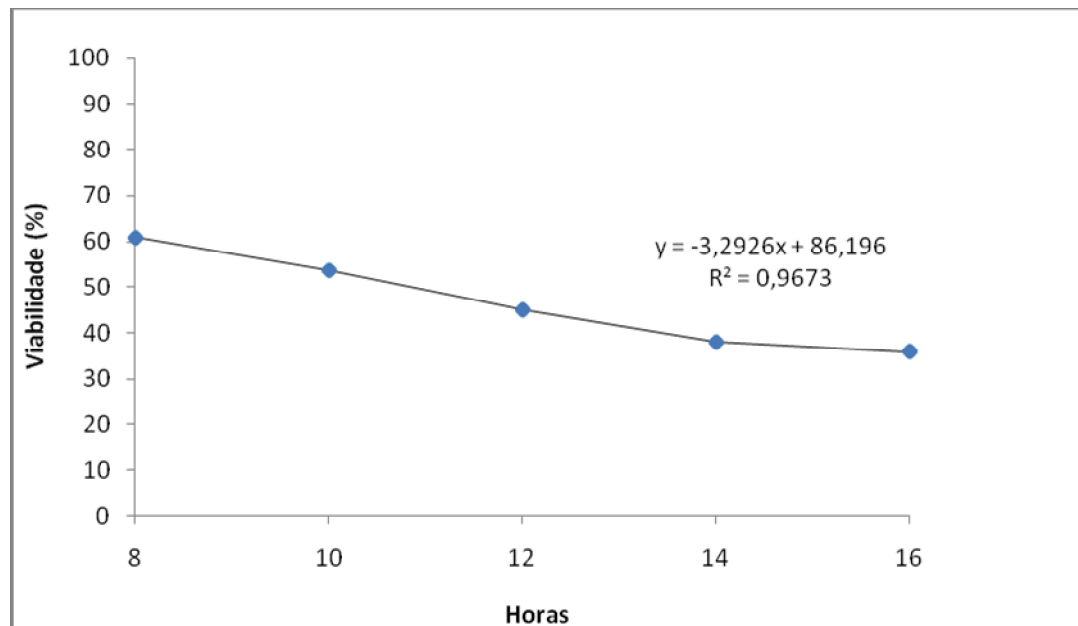


Figura 1. Viabilidade de grãos de pólen em diplóides melhorados de *Musa acuminata* coletados em diferentes horários.

Outros autores também observaram a perda de viabilidade polínica em função do tempo. Trabalhos conduzidos por Nunes (2004), com grãos de pólen de flores de atemoeira coletados em diferentes horários, entre 7 horas e 10 horas, e inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose, indicaram que os grãos de pólen coletados às 7 h e inoculados em meio de cultura com concentração de sacarose de 10%, apresentaram maior porcentagem de viabilidade com média de 12,25%. Resultados semelhantes foram obtidos em *Solanum sessiliflorum* Dunal (Luz et al. 2008) e *Passiflora suberosa* (Cruz et al. 2008). Já Nietshe et al.

(2009) avaliando a viabilidade de grãos de pólen de pinheira (*Annona squamosa*) coletados de flores em diferentes horários entre 0 às 7 horas, em intervalos de 1 h, apresentaram a mesma porcentagem de germinação, indicando que a coleta das flores de pinheira, para a polinização artificial, pode ser realizada às 7 horas, sem redução da viabilidade dos grãos de pólen. Os resultados aqui apresentados permitiram verificar que a hora de coleta do pólen interfere no percentual de viabilidade polínica.

Conclusões

O melhor horário para coleta dos grãos de pólen de bananeira, para todos os genótipos testados, é às 8 horas, em função da maior porcentagem de viabilidade polínica obtida. O percentual médio de viabilidade polínica é influenciado negativamente pelo horário de coleta.

Referências Bibliográficas

- Cruz TV, Souza MM, Roza FA, Viana AJC, Belo GO e Fonseca JWS (2008) Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura** **30**:875-879.
- Dafni A (1992) **Pollination ecology**: a practical approach (the practical approach series). New York: University Press, 250p.
- Ferreira DF (2008) SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, p.36-41.
- Kearns CA e Inouye D (1993) **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado, 579p.
- Luz CL, Schuelter AR, Luz CL, Dalmaso A, Vieira ESN e Barreto RR (2008) Germinação *in vitro* de grãos de pólen e efeito da proteção das plantas na frutificação de cabiu (*Solanum sessiflorum* Dunal). **Acta Scientiarum Agronomy** **30**: 539-545.
- Nascimento WM, Torres AC e Lima LB (2003) Pollen viability in hibrid seed production off eggplant under tropical conditions. **Acta Horticulture** p. 37-39.
- Nietshe S, Pereira MCT, Oliveira C, Dias MM e Reis ST (2009) Viabilidade dos grãos de pólen de flores de pinheira (*Annona squamosa*) em diferentes horários. **Ciência e Agrotologia** **33**: p. 527-531.
- Nunes CF (2004) Polinização artificial e natural de atemóia cultivar "Gefner", viabilidade do grão de pólen e correlação entre comprimento de flor e número de carpelos. Monografia (Conclusão de Curso), Universidade Estadual de Montes Claros. Janaúba: UEMC, 55p.
- Scorza R e Sherman WB (1995) Peaches. In: Janik J e Moore JN (ed.) **Fruit breeding**. New York: John e Sons, p. 325-440.
- Soares TL, Santos-Serejo JA, Costa MAPC, Souza EH, Souza AS, Silva SO (2010) Influência do momento da coleta sobre a viabilidade de grãos de pólen de bananeira *Musa acuminata*. In: **XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2010**, Natal/RN. Frutas: Saúde, inovação e sustentabilidade (CD-ROM).
- Soares TL (2011) Eficiência do sistema reprodutivo de bananeira. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas: UFRB, 81 f.