

## Resgate *in vitro* de embriões em genótipos diplóides de bananeira<sup>(1)</sup>

Tárcia dos Santos Neves<sup>(2)</sup>, Sebastião de Oliveira e Silva<sup>(2)</sup> e Roberto Pedroso de Oliveira<sup>(2)</sup>

Resumo – Este trabalho teve por objetivo avaliar a técnica de resgate de embriões de sementes de bananeira em genótipos diplóides e a influência de defeitos do embrião e do endosperma na germinação *in vitro*. Foram utilizados os genótipos Calcutta, Malaccensis, Butuhan, França, 0304-02, 1304-06, 4252-04 e 9379-09. De cada genótipo, 100 sementes recém-coletadas foram embebidas em água destilada, por 24 horas, e desinfestadas em solução à base de nitrato de prata e cloreto de sódio. Os embriões extraídos foram introduzidos em meio MS com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, e cultivados em câmara de crescimento, no escuro e em temperatura de 26 ± 2°C. A germinação concentrou-se do quinto ao vigésimo dia de cultivo e apresentou uma média de 53,25% após 45 dias, independentemente do genótipo. As espécies selvagens apresentaram porcentagem média de germinação maior do que a dos genótipos híbridos. A presença de embrião e endosperma normais não foi essencial para a germinação *in vitro*.

Termos para indexação: *Musa*, banana, cultura *in vitro*, germinação, híbridos.

### *In vitro* recovery of diploid embryos in banana

Abstract – This study aimed to evaluate the recovery technique applied to zygotic embryos of banana diploid genotypes and to examine the effect of defective embryo and endosperm on *in vitro* germination. Genotypes Calcutta, Butuhan, Malaccensis, França, 0304-02, 1304-06, 4252-04 and 9379-09 were used. One hundred seeds of each genotype were collected and soaked in distilled water for 24 hours. They were then disinfected by solutions of 0.5% silver nitrate followed by 5% sodium chloride. Excised embryos were put in MS medium with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 7 g L<sup>-1</sup> agar and cultured in growth chambers under dark and 26 ± 2°C. Germination occurred between the 5<sup>th</sup> and the 20<sup>th</sup> day of growth, being 53.25% in average after 45 days independently of the genotype. Wild species showed a higher germination frequency as compared to that of the hybrid genotypes, and normal embryos and endosperm were not essential for the *in vitro* germination.

Index terms: *Musa*, banana, *in vitro* culture, germination, hybrids.

## Introdução

A técnica de hibridação controlada tem sido utilizada no melhoramento da bananeira, e foram obtidas sementes dos cruzamentos entre diplóides (AA), e destes com cultivares comerciais dos tipos Prata e Maçã (AAB), gerando, respectivamente, híbridos diplóides (AA) e tetraplóides (AAAB). No entanto,

a baixa porcentagem e desuniformidade de germinação, principalmente nos cruzamentos em que são produzidas sementes em pequeno número, constituem um dos fatores limitantes à obtenção de materiais híbridos (Shepherd, 1960; Stotzky et al., 1962; Shepherd et al., 1986; Shepherd et al., 1994; Silva et al., 1997).

Segundo McGahan (1961), a impermeabilidade à água e ao oxigênio provocada pela espessa cutícula das sementes em vários genótipos e a idade e qualidade das sementes são as principais causas da baixa porcentagem de germinação. No entanto, com o uso da cultura de embriões, muitas barreiras botânicas e genéticas à germinação podem ser superadas. Esta técnica pode ser utilizada para a recuperação de híbridos de cruzamentos com certo grau de incompa-

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 27 de abril de 2000.

Extraído da dissertação de mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal da Bahia (UFBA), Cruz das Almas, BA.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. E-mail: [ssilva@cpnmpf.embrapa.br](mailto:ssilva@cpnmpf.embrapa.br)

tibilidade, micropropagação clonal, superação de dormência e estudos de fisiologia das sementes (Hu & Ferreira, 1990).

A cultura *in vitro* de embriões tem sido utilizada com sucesso em inúmeros gêneros de plantas. Em bananeira, por exemplo, este tipo de cultura permite a obtenção de taxas de germinação superiores a 50%, enquanto a porcentagem média de germinação em viveiro tem sido de 1% (Cox et al., 1960; Vuylsteke & Swennen, 1991). Shepherd et al. (1986) acrescentam, ainda, que a cultura *in vitro* permite avaliar a qualidade do embrião e do endosperma, e possibilita analisar a viabilidade das sementes, de forma a esclarecer as causas do baixo poder germinativo da sementeira direta em viveiros.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a técnica de resgate de embriões de sementes de bananeira em diferentes genótipos diplóides, e estudar a influência de defeitos do embrião e do endosperma na germinação *in vitro*, de modo a melhorar a eficiência na obtenção de híbridos.

### Material e Métodos

Foram utilizadas sementes de oito genótipos diplóides de bananeira, coletadas no Banco de Germoplasma da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, sendo duas espécies selvagens de *Musa acuminata*-AA (Calcutta e Malaccensis), duas selvagens de *M. balbisiana*-BB (Butuhan e França) e quatro híbridos de *M. acuminata*-AA 0304-02 (Calcutta x Madang), 1304-06 (Malaccensis x Madang), 4252-04 [M53 (híbrido da Jamaica) x Kumburgh] e 9379-09 [1741-01 (Jari Buaya x 0304-02) x 2803-01 (Tuu Gia x Calcutta)].

As sementes resultantes de polinização aberta foram retiradas de frutos maduros, de pelo menos 12 plantas, lavadas em água corrente, despulpadas e embebidas em água destilada por 24 horas.

As sementes foram desinfetadas por meio de assepsia em câmara de fluxo laminar, utilizando nitrato de prata a 0,5%, por 10 minutos e, em seguida, cloreto de sódio a 5%, por 5 minutos. Após esse tratamento, foram realizadas três lavagens em água destilada esterilizada.

A extração dos embriões foi realizada em câmara de fluxo laminar, sob estereoscópio, sobre papel de filtro estéril, usando-se pinça e bisturi. As sementes foram classificadas quanto ao endosperma em normal (semente cheia), e reduzido; e quanto ao embrião, em normal (ápice e base desenvolvidos), pequeno (presença de ápices e bases, mas

medindo menos de 70% do normal) e anormal (deformações no ápice e/ou base e aspecto amolecido). Foram extraídos embriões de 100 sementes de cada genótipo; cinco embriões foram colocados com o ápice voltado para cima, em placa de Petri (25 mm x 100 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar para avaliar a germinação *in vitro*.

Os embriões foram mantidos em câmara de crescimento sob condições de escuro e à temperatura de 26 ± 2°C, sendo avaliada a germinação a cada cinco dias, durante 45 dias. As porcentagens médias de germinação de cada genótipo aos 45 dias foram comparadas estatisticamente pelo teste de Scott & Knott (1974). Os embriões que não germinaram foram avaliados quanto à presença de contaminação microbiana no meio de cultura, necrose, intumescimento e ausência de desenvolvimento.

### Resultados e Discussão

A velocidade e a porcentagem de germinação foram variáveis em razão do genótipo utilizado (Figura 1). A germinação dos embriões de bananeira concentrou-se do quinto ao vigésimo dia de cultivo *in vitro*. A germinação *in vitro* ocorre mais rapidamente do que em viveiro, graças às condições ambientais e nutricionais mais propícias. Agarwal

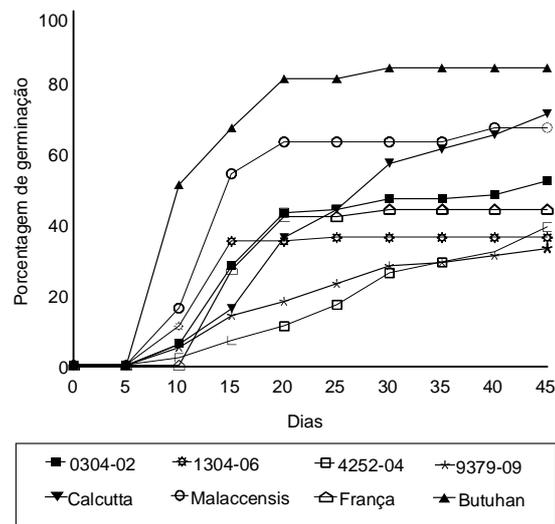


Figura 1. Porcentagem de germinação de embriões de oito genótipos de bananeira, cultivados *in vitro* durante 45 dias. Cruz das Almas, BA, 1998.

(1984) obteve germinação somente a partir do décimo terceiro dia após a semeadura em uma mistura de terra esterilizada, mais areia lavada (1:1), e Stotzky et al. (1962) relataram serem necessárias de três a seis semanas para o início da germinação em solo.

A porcentagem média de germinação dos genótipos estudados após 45 dias de cultivo *in vitro* foi de 53,25% (Tabelas 1 e 2). Este resultado se assemelha aos reportados por Rowe & Richardson (1975) e por Stotzky et al. (1962), que obtiveram 50% e 52% de germinação, respectivamente. No entanto, Vuylsteke & Swennen (1991) obtiveram de 9% a 34% de germinação trabalhando com diferentes genótipos e condições de cultivo *in vitro*; em viveiro, a porcentagem de germinação foi de 1%.

Os diplóides Butuhan (BB) e 9379-09 (AA) apresentaram, respectivamente, a maior (84%) e a menor (33%) porcentagem de germinação (Tabela 1). A porcentagem elevada de germinação do genótipo Butuhan já havia sido relatada por Simmonds (1959), que obteve valores que variaram de 49% a 80%, enquanto em Calcutta e Malaccensis esse autor verificou de 63% a 71% e de 3% a 43%, respectivamente. As sementes de banana variam em tamanho e forma de acordo com a espécie e variedade. Os genótipos BB apresentaram sementes maiores que os AA, e, segundo Chin (1996), requerem diferentes condições para a germinação. As espécies selvagens de *Musa acuminata* (Calcutta e Malaccensis) e *M. balbisiana* (Butuhan e França) apresentaram maior porcentagem média de germinação (66,50%) do que os híbridos

(40,00%), provavelmente por serem materiais resultantes de um processo de seleção natural, que originou as bananas comestíveis, o que pode ter mantido alta a sua capacidade de germinação das sementes (Dantas et al., 1999).

A média dos embriões não germinados foi de 46,75%; na maioria dos casos (29,25%), isto ocorreu por ausência de desenvolvimento dos embriões no meio de cultura, podendo sugerir algum tipo de dormência, o que pode ocorrer mesmo em sementes maduras recém-extraídas (Chin, 1996). Parte dos embriões que não germinou apresentou intumescimento. A necrose e a contaminação microbiana ocorreram em 6,13% dos embriões (Tabela 1). Este comportamento sugere adequação do método para melhorar os processos de desinfestação das sementes, de extração dos embriões, e da composição do meio de cultura (Simmonds, 1959; Stotzky et al., 1962; Johri & Rao, 1984; Darjo & Bakry, 1990).

A maior parte das sementes apresentou endosperma normal (63 a 100%), independentemente de apresentarem o genoma AA ou BB e de serem materiais silvestres ou híbridos (Tabela 2). Estes resultados indicam alta compatibilidade entre os genótipos parentais dos materiais híbridos estudados, pois, segundo Wardlaw (1965), o primeiro sinal de desenvolvimento anormal em sementes provenientes de cruzamentos "incompatíveis" ocorre no endosperma.

Os genótipos Butuhan e 4252-04 apresentaram 100% de sementes com endosperma normal (Tabela 2).

**Tabela 1.** Comportamento *in vitro* de embriões provenientes de sementes com endosperma normal e reduzido de genótipos diplóides de bananeira. Cruz das Almas, BA, 1998.

Genótipo	Germinados <sup>(1)</sup>	Contaminados	Necrosados	Intumescidos	Sem desenvolvimento
------(%)-----					
Butuhan	84a	0	1	1	14
Calcutta	71b	5	1	17	6
Malaccensis	67b	5	0	4	24
0304-02	52c	1	4	11	30
França	44c	6	0	0	50
4252-04	39c	3	10	14	34
1304-06	36c	3	4	7	50
9379-09	33c	1	5	35	26
Média	53,25	3,00	3,13	11,13	29,50

<sup>(1)</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade.

Embora a porcentagem de germinação tenha sido a maior no diplóide Butuhan, não foi verificada a mesma correlação (endosperma normal/elevada porcentagem de germinação) nos demais genótipos, o que indica que a presença de endosperma normal não é um fator essencial para o desenvolvimento *in vitro* de embriões de bananeira.

A maior parte das sementes apresentou embrião normal (61,38%), havendo 9,63% de embriões pequenos e 29% de materiais genéticos com outras anormalidades. As porcentagens médias de germinação foram de 51,73%, 51,92% e 56,90% nos embriões normais, pequenos e anormais, respectivamente (Tabela 2). Esses valores, bastante próximos, sugere-

**Tabela 2.** Comportamento *in vitro* de embriões provenientes de 100 sementes com endosperma normal (EN) e endosperma reduzido (ER) de genótipos diplóides de bananeira. Cruz das Almas, BA, 1998.

Embrião	Genótipo	Número de sementes		Germinação (%)		Contaminação e necrosamento (%)		Intumescimento (%)	
		EN	ER	EN	ER	EN	ER	EN	ER
Normal	0304-02	64	2	34	0	3	0	9	0
	1304-06	70	3	25	1	4	1	5	0
	4252-04	76	0	28	0	10	0	12	0
	9379-09	58	0	13	0	3	0	29	0
	Calcutta	85	0	61	0	4	0	15	0
	Malaccensis	19	5	11	3	2	1	1	0
	França	50	0	27	0	3	0	0	0
	Butuhan	59	0	51	0	0	0	1	0
Média		60,13	1,25	31,25	0,5	3,63	0,25	9,00	0
Pequeno	0304-02	2	0	1	0	0	0	0	0
	1304-06	3	0	1	0	0	0	0	0
	4252-04	3	0	1	0	0	0	1	0
	9379-09	0	0	0	0	0	0	0	0
	Calcutta	5	1	3	0	0	1	1	0
	Malaccensis	18	23	10	16	1	1	3	0
	França	18	1	6	0	1	0	0	0
	Butuhan	3	0	2	0	0	0	0	0
Média		6,50	3,13	3,00	2,00	0,25	0,25	0,63	0
Anormal	0304-02	31	1	16	1	2	0	2	0
	1304-06	23	1	9	0	2	0	2	0
	4252-04	21	0	10	0	3	0	1	0
	9379-09	23	19	9	11	0	3	4	2
	Calcutta	9	0	7	0	1	0	1	0
	Malaccensis	26	9	21	6	0	0	0	0
	França	31	0	11	0	2	0	0	0
	Butuhan	38	0	31	0	1	0	0	0
Média		25,25	3,75	14,25	2,25	1,38	0,38	1,25	0,25
Total	0304-02	97	3	51	1	5	0	11	0
	1304-06	96	4	35	1	6	1	7	0
	4252-04	100	0	39	0	13	0	14	0
	9379-09	81	19	22	11	3	3	33	2
	Calcutta	99	1	71	0	5	1	17	0
	Malaccensis	63	37	42	25	3	2	4	0
	França	99	1	44	0	6	0	0	0
	Butuhan	100	0	84	0	1	0	1	0
Média		91,88	8,13	48,50	4,75	5,25	0,88	10,88	0,25

rem que a eficiência da germinação *in vitro* ocorre mesmo em embriões pequenos ou com algumas anormalidades.

Os genótipos Malaccensis e 9379-09 foram os que apresentaram maior ocorrência de sementes com endosperma reduzido (Tabela 2). No entanto, a utilização da técnica de recuperação de embrião proporcionou redução dos efeitos dessas más formações, possibilitando a germinação em níveis comparáveis aos das sementes normais.

### Conclusões

1. A germinação de embriões dos genótipos diplóides de bananeira estudados é rápida e ocorre em elevada porcentagem sob condições *in vitro*.

2. Os embriões das espécies selvagens apresentam maior porcentagem de germinação do que os dos genótipos híbridos.

3. A presença de embrião e endosperma normais não é fator essencial para o desenvolvimento *in vitro* dos embriões.

### Referências

- AGARWAL, P. K. Note on effect of ethyl methane sulphate on *Musa balbisiana* seeds. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 41, n. 1/2, p. 93-94, 1984.
- CHIN, H. F. Germination and storage of banana seeds. In: NEW FRONTIERS IN RESISTANCE BREEDING FOR NEMATODE, FUSARIUM AND SIGATOKA WORKSHOP, 1995. Kuala Lumpur. **Proceedings...** Montpellier : International Network for the Improvement of Banana and Plantain, 1996. p. 218-227.
- COX, E. A.; STOTZKY, G.; GOOS, R. D. *In vitro* culture of *Musa balbisiana* Cola embryos. **Nature**, London, v. 185, p. 403-404, 1960.
- DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. de O. e; SOUZA, A. da S.; ALVES, E. J.; SOARES FILHO, W.; CORDEIRO, Z. J. M. Citologia e melhoramento genético da bananeira. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília : Embrapa-SPI, 1999. p. 107-150.
- DARJO, P.; BAKRY, F. Conservation et germination des graines de bananiers (*Musa* sp.). **Fruits**, Paris, v. 45, n. 2, p. 103-113, 1990.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : Associação Brasileira de Cultura de Tecidos e Plantas/Embrapa-CNPq, 1990. p. 71-85.
- JOHRI, B. M.; RAO, P. S. Experimental embryology. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin : Springer, 1984. p. 744-802.
- McGAHAN, M. W. Studies on the seed of banana. I. Anatomy of the seed and embryo of *Musa balbisiana*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 48, n. 3, p. 230-238, 1961.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- ROWE, P.; RICHARDSON, L. **Breeding banana for disease resistance, fruit quality and yield**. La Lima : Tropical Agriculture Research Service Information, 1975. 41 p. (Bulletin, 2).
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SHEPHERD, K. Seed fertility of 'Gros Michel' bananas. **Tropical Agriculture**, St. Augustine, v. 37, p. 211-221, 1960.
- 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.; DANTAS, J. L. L.; SILVA, S. O. Breeding of Prata and Maça cultivars for Brazil. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR THE IMPROVEMENT OF BANANA AND PLANTAIN (Montpellier, França). **The improvement and testing of Musa: a global partnership**. Montpellier, 1994. p. 157-168.
- SILVA, S. de O. e; MATOS, A. P.; ALVES, E. J.; SHEPHERD, K. Breeding 'Prata' (Pomme) and 'Maça' (Silk) banana types current achievements and opportunities. **Infomusa**, Montpellier, v. 6, n. 2, p. 7-10, 1997.

- SIMMONDS, N. W. Experiments on the germination of banana seeds. **Tropical Agriculture**, St. Augustine, v. 36, n. 4, p. 259-273, 1959.
- STOTZKY, G.; COX, E. A.; GOOS, R. D. Seed germination studies in *Musa*. I. Scarification and aseptic germination of *Musa balbisiana*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 49, n. 5, p. 512-520, 1962.
- VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R. Biotechnological approaches to plantain and banana improvement at IITA. In:—— **Cell and tissue culture**. Ibadan : International Institute of Tropical Agriculture, 1991. p. 143-149.
- WARDLAW, C. N. Physiology of embryonic development in chromophytes. In: RUHLAND, N. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin : Springer, 1965. v. 15, p. 844-965.