



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**HONORIO NOGUEIRA DIÓGENES NETO**

**CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE TRÊS VARIEDADES BOTÂNICAS DE  
MELOEIRO**

**FORTALEZA**

**2019**

HONORIO NOGUEIRA DIÓGENES NETO

CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE TRÊS VARIEDADES BOTÂNICAS DE  
MELOEIRO

Monografia apresentada ao curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini.

Coorientadora: Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D622c Diógenes Neto, Honorio Nogueira.  
Cultivo in vitro de anteras de três variedades botânicas de meloeiro / Honorio Nogueira Diógenes Neto. –  
2019.  
53 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências  
Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini.  
Coorientação: Profa. Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.

1. Cucumis melo L. 2. Androgênese. 3. Dihaploidização. I. Título.

CDD 630

---

HONORIO NOGUEIRA DIÓGENES NETO

CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE TRÊS VARIEDADES BOTÂNICAS DE  
MELOEIRO

Monografia apresentada ao curso de  
Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel em  
Agronomia.

Aprovada em: 19/06/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho (Coorientadora)  
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA -CNPAT)

---

Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão  
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA -CNPAT)

---

Dr. Frederico Inácio Costa de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Telma e Antônio.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Senhor e Salvador, pela dádiva da vida.

À Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, por ser muito mais que uma orientadora, pelo exemplo de profissional e de ser humano. Muitíssimo obrigado por todos os ensinamentos, pelas conversas. Obrigado por ser paciente, compreensiva e compassiva. Ter lhe conhecido me proporcionou aprendizados pra vida.

À professora Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini, por toda sua paciência e compreensão durante toda a condução deste trabalho, por sempre ter me recebido tão bem e por todas as valiosas contribuições.

Ao Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão, pelas valiosas orientações e pela gentileza de realizar as análises estatísticas.

Ao Dr. Frederico Inácio Costa de Oliveira, que em muitos momentos me ajudou, me aconselhou e foi peça fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigado pela paciência, prestatividade e companheirismo.

À minha mãe, Francisca Telma Carneiro Diógenes, pelas orações, pela compreensão e incentivo, pelas noites mal dormidas, pelas xícaras de café durante as madrugadas, pelas palavras de conforto, por me dar força e por todo seu amor. Minha eterna admiração por essa mulher que mata um dragão por dia e ainda conseguir ser a melhor mãe do mundo.

Ao meu pai, Antônio Aquino Diógenes, por me incentivar e me impulsionar a ser melhor do que o que sou, por sempre ter priorizado minha educação, por demonstrar seu amor de forma peculiar e por ter me ensinado valores para a vida.

Ao meu irmão, João Victor Carneiro Diógenes, que apesar da pouca idade, muito me ensina, me incentiva e me proporciona todos os dias a oportunidade de ver uma versão minha melhorada.

Ao meu amor, Larissa dos Santos Lopes, a quem sou muito grato. A realização desse trabalho não seria possível sem você. Muitíssimo obrigado por todo seu apoio, pela força que você me deu durante todos os anos da graduação, por estar sempre presente, por ser minha melhor amiga, por ser você. Você foi meu combustível esses anos todos.

À minha vizinha, Ana Maria Aquino Diógenes, que sempre me cercou de amor e me incentivou a ser alguém melhor. Vó, seu Netinho agora é agrônomo.

Ao meu avô, Honório Nogueira Diógenes, agricultor e inspiração na minha busca em ser um bom profissional. Ele não teve a oportunidade de me ver concluindo essa etapa,

mas estive em diversos momentos dela.

À minha tia, Francisca Mônica Carneiro, por ter aberto as portas de sua casa diversas vezes pra que eu tivesse um lugar mais silencioso pra estudar, por me ouvir, me aconselhar e se preocupar comigo.

À minha tia, Francisca Tânia Carneiro, por todo o seu cuidado com a minha rotina e com a minha saúde, pelas hortaliças com efeitos medicinais que a senhora sempre me receitou e pelas massagens nos dias de trabalho exaustivo.

Ao meu tio, Francisco Walber Carneiro, que apesar da trajetória curta na terra, me ensinou tanto e sempre será um referencial para mim.

À minha tia, Camila e Castro Diógenes, por me acalmar nos momentos mais estressantes, pela amizade e por todo o incentivo.

Ao grande amigo, Davi Rodrigues Oliveira, minha dupla dinâmica, “Chris e Greg”, que estive presente nos momentos bons e ruins, durante toda a graduação. Obrigado pelo apoio e incentivo durante a condução deste trabalho. Saio da graduação com um irmão.

À minha amiga, Adriana Cruz de Oliveira, que sempre se fez presente e dividiu tantos momentos importantes comigo. Minha amiga, você é parte da minha história!

À amiga Úrsula Prado Barroso, por todas as palavras de incentivo.

À amiga, Alexya Vitoria Félix Carvalho, que foi fundamental para a realização desse trabalho. Muito obrigado por toda a sua prestatividade, pela paciência, profissionalismo e pelo seu bom humor e doçura durante as horas mais pesadas.

Aos colegas dos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais (Embrapa) e de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais (Embrapa), pela ajuda valiosa durante a condução dos experimentos necessários para a realização desse trabalho.

Aos amigos do grupo “Espalha...” e aos amigos do grupo “Agrônomos”, por tornarem os momentos difíceis da graduação muito mais suportáveis. Cada um faz parte da minha história. Sou muito grato à todos os amigos que oraram por mim e estiveram comigo.

À Cru Campus, uma comunidade acolhedora que mudou minha visão sobre a universidade e sobre a vida. Foi extremamente importante ter um ambiente onde eu pude conversar sobre Deus na universidade e viver em comunhão com meus irmãos. Grato pelos amigos que ganhei.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por fornecer as instalações necessárias para a realização e conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, por me proporcionar a oportunidade de cursar Agronomia, e aos excelentes professores que fizeram parte da minha jornada acadêmica.

“Um único sonho é mais poderoso do que mil realidades.”

J. R. R. Tolkien

## RESUMO

No meloeiro (*Cucumis melo* L.), hortaliça de grande importância econômica, a técnica de dihaploidização é uma ferramenta eficaz para obtenção de linhagem 100% homozigotas em apenas uma geração. Portanto, objetivou-se obter plantas haploides de meloeiro por meio de cultivo *in vitro* de anteras das variedades: *cantalupensis*, *reticulatus* e *inodorus*. Os explantes foram anteras excisadas de flores masculinas em pré-antese. O ensaio foi dividido em dois experimentos. No experimento 1, etapa de calogênese: utilizou-se quatro meios de cultivo: (1) MS sem reguladores de crescimento; (2) MS + 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; (3) MS + 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP + 3,22  $\mu\text{M}$  de ANA; e (4) MS + 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4, três variedades e quatro meios de cultivo, com 25 repetições(anteras)/tratamento/variedade. Etapa de regeneração de parte aérea: calos foram transferidos para meio MS + 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA + 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4, três variedades e calos provenientes de quatro meios de cultivo, com 25 repetições(anteras)/tratamento/variedade. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para dados que não atenderam a normalidade, utilizou-se teste de Kruskal-Wallis. Já no experimento 2, na etapa de calogênese, utilizou-se meio MS + 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D com duas concentrações de sacarose (30 e 120  $\text{g.L}^{-1}$ ). As culturas permaneceram a 4°C, no escuro, durante dois dias. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2x2, sendo três variedades, duas quantidades de sacarose e dois tempos de permanência no meio de cultivo (14 e 28 dias), com 50 repetições(anteras)/tratamento/variedade. Etapa de regeneração de parte aérea: os calos foram transferidos para meio MS + 2,22 $\mu\text{M}$  de BAP com 30 e 120  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. Os dados foram submetidos à análise univariada de Scott-Knott e as médias comparadas a nível de 5% de significância. As culturas permaneceram a  $25 \pm 1$  °C, 16 horas de luz, durante os dois experimentos. No experimento 1, não houve diferença para formação de calos entre as variedades e contaminação dos explantes de apenas 2%. Os meios 2 e 4 foram mais eficazes, produzindo calos em 100 e 97,73% das anteras, respectivamente. Não houve regeneração de parte aérea em nenhuma das variedades utilizando MS + 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA + 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP. No experimento 2, houve formação de calos em todas as anteras inoculadas no meio de cultivo de indução. A variedade *cantalupensis* foi mais eficiente na maioria dos fatores avaliados. Não houve regeneração de parte aérea no meio MS + 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP. O

protocolo utilizado não foi eficiente para obtenção de plantas haploides das três variedades botânicas de meloeiro estudadas.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo* L. Androgênese. Dihaploidização.

## ABSTRACT

In melon (*Cucumis melo* L.), a vegetable of great economic importance, the dihaploidization technique is an effective tool to obtain 100% homozygous line in only one generation. Therefore, the objective of this work was to obtain melon haploid plants by *in vitro* anthers culture of the varieties: *cantalupensis*, *reticulatus* and *inodorus*. The explants were anthers excised of pre-anthesis male flowers. The assay was divided into two experiments. In experiment 1, step of calogenesis: four culture media were used: (1) MS without growth regulators; (2) MS + 1.0  $\mu\text{M}$  BAP + 2.0  $\mu\text{M}$  2,4-D; (3) MS + 0.88  $\mu\text{M}$  BAP + 3.22  $\mu\text{M}$  NAA; and (4) MS + 4.44  $\mu\text{M}$  BAP + 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4.64  $\mu\text{M}$  KIN. The experimental design was completely randomized, in a 3x4 factorial scheme, with three botanical varieties and four culture media, with 25 replicates (anther)/ treatment / variety. Step of shoot regeneration: callus was transferred to MS medium + 0.5  $\mu\text{M}$  NAA + 13.32  $\mu\text{M}$  BAP. The experimental design was completely randomized, in a 3x4 factorial scheme, with three botanical varieties and calli from four culture media, with 25 replicates (anther)/treatment /variety. The data were submitted to analysis of variance and means, compared by the Tukey test at 5% probability. For data that did not meet normality, Kruskal-Wallis test was used. In experiment 2, step of calogenesis: MS + 1.0  $\mu\text{M}$  BAP + 2.0  $\mu\text{M}$  2,4-D medium was used with two sucrose concentrations (30 and 120  $\text{g.L}^{-1}$ ). The cultures remained at 4 ° C in the dark for two days. The experimental design was completely randomized, in a 3x2x2 factorial scheme, with three botanical varieties, two sucrose concentrations and two residence times in the culture medium (14 and 28 days), with 50 replicates (anthers)/treatment /variety. Step of shoot regeneration: callus was transferred to MS medium + 2.22 $\mu\text{M}$  BAP with 30 and 120  $\text{g.L}^{-1}$  sucrose. The data were submitted to univariate analysis by Scott-Knott and the means compared at the 5% level of significance. The cultures remained at  $25 \pm 1$  °C, 16 hours light, during the two experiments. In experiment 1, there was no difference for callus formation between the varieties and explant contamination of only 2%. Media 2 and 4 were more effective, producing calli in 100 and 97.73% of the anthers, respectively. There was no shoot regeneration in any of the varieties using MS + 0.5  $\mu\text{M}$  NAA + 13.32  $\mu\text{M}$  BAP. In experiment 2, calli formation occurred in all anthers inoculated in the induction culture medium. *Cantalupensis* was more efficient in most of the evaluated factors. There was no shoot regeneration in MS medium + 2.22  $\mu\text{M}$  of BAP. The protocol used was not efficient for obtaining haploid plants of the three varieties of melon studied.

**Keywords:** *Cucumis melo* L. Androgenesis. Dihaploidization.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Tipos comerciais de melão (*Cucumis melo* L.). Fonte: ARAGÃO (2011). ... 22
- Figura 2 – Flor masculina de meloeiro (*Cucumis melo* L.) da variedade botânica *cantalupensis*, em estágio de pré-antese (A); detalhe das tecas ainda fechadas, na flor masculina em pré-antese (B). Barra: 10 mm (A), 5 mm (B). ..... 27
- Figura 3 – Calos formados a partir de anteras de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 65 dias de cultivo *in vitro* em meios de indução. Tratamento 1) MS sem adição de reguladores de crescimento; Tratamento 2) MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; Tratamento 3) MS adicionado de 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 3,22  $\mu\text{M}$  de ANA; Tratamento 4) MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Barra: 10 mm. .... 33
- Figura 4 – Calos das três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP para a indução da regeneração de parte aérea. Tratamento 1) Calos oriundos do meio 1 de indução de calos (MS sem adição de reguladores de crescimento); Tratamento 2) Calos oriundos do meio 2 de indução de calos (MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D); Tratamento 3) Calos oriundos do meio 3 de indução de calos (MS adicionado de 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 3,22  $\mu\text{M}$  de ANA); Tratamento 4) calos oriundos do meio 4 de indução de calos (MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D). Barra: 10 mm. .... 35
- Figura 5 – Calos formados a partir de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D suplementado com duas quantidades de sacarose (30 e 120  $\text{g.L}^{-1}$ ) e dois tempos de permanência no meio de cultivo (com uma renovação do meio de cultivo aos 14 dias e sem renovação do meio) para a indução de calos. Barra: 10mm. .... 38
- Figura 6 – Classificação da coloração predominante dos calos obtidos a partir de

antras de três variedades botânicas de meloeiro (*C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *reticulatus* e *C. melo* var. *inodorus*) aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0 µM de BAP e 2,0 µM de 2,4-D. A) Coloração bege; B) Coloração verde claro; C) Coloração verde escuro; D) Coloração marrom. Barra: 10 mm. .... 39

Figura 7 – Classificação do tamanho dos calos (tc) obtidos a partir de antras de três variedades botânicas de meloeiro (*C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *reticulatus* e *C. melo* var. *inodorus*) aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0 µM de BAP e 2,0 µM de 2,4-D. A) Calo pequeno ( $\leq$  duas vezes o tamanho da antera); B) Calo médio duas vezes o tamanho da antera  $< tc \leq$  seis vezes o tamanho da antera); C) Calo grande ( $tc >$  seis vezes o tamanho da antera). Barra: 10 mm. .... 41

Figura 8 – Calos formados a partir de antras de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 42 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado 2,22 µM de BAP suplementado com duas quantidades de sacarose (30 e 120 g.L<sup>-1</sup>) para regeneração de parte aérea. Barra: 10 mm. .... 45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Porcentagem média de formação de calos em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), e em quatro meios de cultivo, aos 60 dias de cultivo *in vitro* de anteras. .... 31
- Tabela 2 – Peso médio dos explantes em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.) e em quatro meios de cultivo, aos 60 dias de cultivo *in vitro* de anteras. .... 32
- Tabela 3 – Influência de diferentes concentrações de sacarose e renovação do meio de cultivo MS adicionado de 1,0  $\mu$ M de BAP e 2,0  $\mu$ M de 2,4-D, na cor e no tamanho dos calos formados em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro* das anteras. .... 39
- Tabela 4 – Influência de diferentes concentrações de sacarose e renovação do meio de cultivo no peso dos calos formados a partir de anteras de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0  $\mu$ M de BAP e 2,0  $\mu$ M de 2,4-D. .... 43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
°C	Graus Celsius
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
a.C.	Antes de Cristo
AIA	Ácido indolilacético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
cv.	Cultivar
etc	et cetera; e outro(a)s
FAO	Faostat - Statistics Database
g	Gramma
h	Hora
ha	Hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KIN	6-furfurilaminopurina
L	Litro
m	Metro
min	Minuto
mL	Milímetro
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)
s	Segundo
TDZ	1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazole-5-il) uréia
tc	Tamanho do calo
US\$	Dólar dos Estados Unidos da América
var.	Variedade botânica

## LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- ® Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	19
<b>2.1.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	19
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
<b>3.1</b>	<b>O meloeiro</b> .....	20
<b>3.1.1</b>	<i>Aspectos Botânicos</i> .....	20
<b>3.1.2</b>	<i>Aspectos Econômicos</i> .....	22
<b>3.2</b>	<b>Melhoramento Genético</b> .....	23
<b>3.3</b>	<b>Dihaploidização</b> .....	24
<b>3.4</b>	<b>Cultura de Tecidos Vegetais</b> .....	25
<b>4.4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
<b>4.1</b>	<b>Material vegetal e condições de cultivo</b> .....	27
<b>4.2</b>	<b>Experimento 1</b> .....	28
<b>4.3</b>	<b>Experimento 2</b> .....	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>5.1</b>	<b>Experimento 1</b> .....	31
<b>5.1.1</b>	<i>Fase de indução de calos</i> .....	31
<b>5.1.2</b>	<i>Fase de regeneração de parte aérea</i> .....	35
<b>5.2</b>	<b>Experimento 2</b> .....	37
<b>5.1.1</b>	<i>Fase de indução de calos</i> .....	37
<b>5.1.2</b>	<i>Fase de regeneração de parte aérea</i> .....	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça, pertencente à família Cucurbitaceae, de grande significância a nível mundial. Sua produção total em 2017 superou 31 milhões de toneladas, em mais de 1,22 milhões de hectares colhidos ao redor do mundo. Nesse mesmo ano, o Brasil ocupou a 14ª posição, contribuindo com aproximadamente 1,7% da produção mundial (FAO, 2019). Ainda em 2017, a produção brasileira superou 540 mil toneladas do fruto, em uma área de 23,4 mil ha colhidos. A região Nordeste respondeu por mais de 95% da produção nacional, onde se destacaram os estados do Ceará e Rio Grande do Norte como os principais produtores nacionais de melão, responsáveis por mais de 76% do percentual regional da produção (IBGE, 2019). Existem três variedades botânicas em que está atribuída grande parte dos genótipos produzidos comercialmente no país: *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin; *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin e *Cucumis melo* var. *reticulatus* Seringe (OLIVEIRA, 2018).

Cultivares comerciais de meloeiro são, em sua maioria, híbridos F<sub>1</sub>. Para que ocorra uma produção bem sucedida de genótipos, os parentais devem possuir alto grau de homozigose (linhagens puras) (YASHIRO *et al.*, 2002). A obtenção de linhagens puras em diferentes culturas, especialmente plantas de polinização aberta, como o meloeiro, exige tempo e instalações adequadas. No meloeiro, através de métodos convencionais são necessárias várias gerações de autofecundação e seleção para desenvolver linhagens que não atingem 100% da homozigosidade. Por meio de métodos como a auto polinização ou retrocruzamentos, essa etapa pode durar 7 anos ou mais. Em regiões onde conduz-se apenas um ciclo por ano dessa cultura, esse processo pode durar de 10 a 12 anos (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013; GERMANÀ, 2011; NASERTORABI *et al.*, 2012; YASHIRO *et al.*, 2002).

A técnica da dihaploidização se mostra como uma ferramenta eficaz para obtenção de linhagens 100% homozigotas em apenas uma geração, eliminando numerosos ciclos de endogamia que seriam necessários para atingir níveis elevados de homozigosidade (DUNWELL, 2010; GERMANA, 2011). Para a obtenção de um dihaploide, duas etapas principais devem ser consideradas: (1) a indução de indivíduos haploides e (2) a duplicação cromossômica desses haploides. Em Cucurbitáceas, a duplicação de cromossomos ocorre por meio do uso de colchicina (DONG *et al.*, 2016).

A escolha do método para a produção de plantas haploides irá depender, em grande parte, da resposta específica da espécie a cada método. Mas naquelas que respondem

bem a diferentes métodos, a mais utilizada é a androgênese, devido à sua maior simplicidade e eficiência (SEGUÍ SIMARRO; NUEZ, 2008). O desenvolvimento de técnicas *in vitro*, para a produção de haploides em cucurbitáceas, representa um avanço recente nos campos de biotecnologia e melhoramento de plantas (DONG *et al.*, 2016). Entretanto, ainda existem poucos estudos realizados na cultura do meloeiro com relação à produção de calos por meio de androgênese *in vitro* (DRYANOVSKA; ILIEVA 1983; DRYANOVSKA, 1985).

Desse modo, a cultura *in vitro* de anteras é uma das alternativas para a obtenção de plantas haploides. Entretanto, fazem-se necessários maiores estudos quanto à eficácia e viabilidade dessa técnica na cultura do meloeiro. Diante disso, objetivou-se com esse trabalho obter plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de anteras em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* var. *inodorus*, *Cucumis melo* var. *cantalupensis* e *Cucumis melo* var. *reticulatus*).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Obter plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de anteras em três variedades (*Cucumis melo* var. *inodorus*, *Cucumis melo* var. *cantalupensis* e *Cucumis melo* var. *reticulatus*).

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Testar diferentes meios de cultivo na indução de calos em anteras de três variedades botânicas de meloeiro.
2. Testar a influência de diferentes doses de sacarose e tempos de permanência em meio de cultivo no desenvolvimento de calos em anteras de três variedades botânicas de meloeiro
3. Avaliar o desenvolvimento dos calos a partir do cultivo *in vitro* de anteras de meloeiro, por meio de avaliações de peso, cor e tamanho.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 O meloeiro

##### 3.1.1 Aspectos Botânicos

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça pertencente à família Cucurbitaceae. Esta família inclui diversas culturas de importância econômica como pepino (*Cucumis sativus* var. *Sativus* L.), abóbora (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), moranga (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) entre outras amplamente cultivadas em todo o mundo (DONG *et al.*, 2016). O melão é uma das culturas de maior importância econômica para o Brasil, destacando-se a região Nordeste como principal produtora (BRAGA SOBRINHO *et al.*, 2008).

O meloeiro é uma espécie altamente polimórfica, diploide com  $2n = 2x = 24$  cromossomos, com meiose regular e fertilidade de pólen superior a 90%. Possivelmente cultivado há mais de 2000 a.C., seu centro de origem ainda não foi precisamente elucidado, mas sabe-se que é uma planta originária do velho mundo. Há relatos que apontam para o continente africano, onde comumente são encontrados melões silvestres nas regiões da África Oriental e Ocidental. No entanto, também existem formas selvagens de melões presentes da Ásia Central até a Índia (DECKER-WALTERS, 1999; LOPES; CARVALHO; PESSOA, 1993; PITRAT 2008, 2013).

Considerando a origem dos melões com base na teoria da deriva continental, o sudeste da África e a península da Índia faziam parte do centro de massa da terra, existente antes do início da separação dos continentes. Antes da separação, a Índia peninsular poderia estar originalmente posicionada em algum lugar no que hoje correspondem as regiões do mar Arábico e oceano Índico. Visto sob essa ótica o continente Africano, Índia, Arábia e Irã poderiam ter sido vizinhos. A partir dessas perspectivas e da atual distribuição de melões silvestres, em diferentes partes do mundo, supõe-se que esta espécie tenha se originado no sudeste da África e Índia peninsular (ANDREWS, 1956; MALLIK; MASSUI, 1986).

Poucos são os registros arqueológicos já documentados em virtude da abundância de água presente nessa hortaliça. O alto valor nutricional de lipídios e proteínas presentes em suas sementes pode ter colaborado com a sua domesticação. O melão silvestre possui mesocarpo muito fino e sabor amargo devido à presença de cucurbitacinas. A domesticação resultou no maior desenvolvimento do mesocarpo e na ausência de cucurbitacinas em frutos

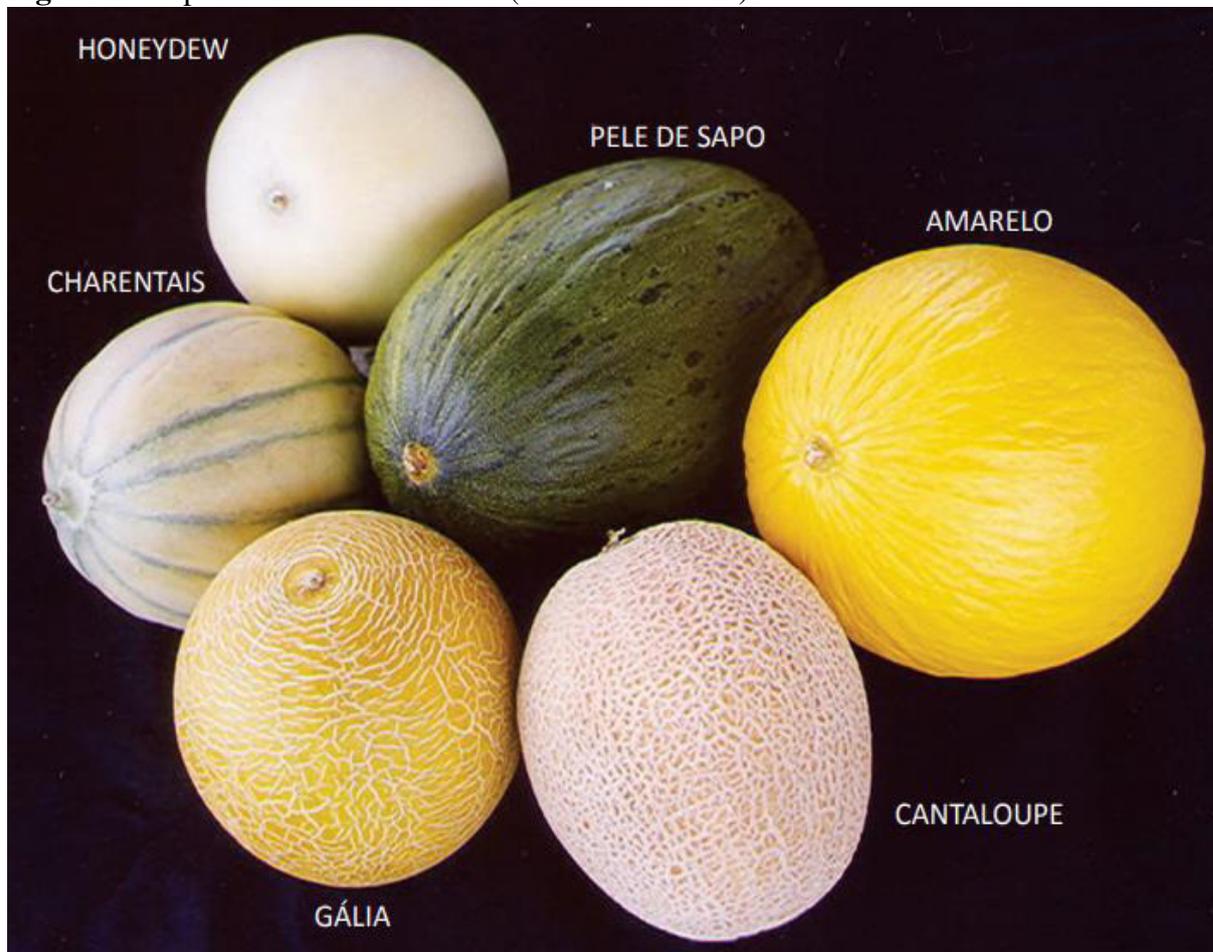
maduros. No novo mundo, a cultura foi introduzida por Colombo em sua primeira viagem e foi imediatamente adotada e cultivada pelos ameríndios (MALLIK; MASSUI, 1986; PITRAT 2008, 2013).

De acordo com a classificação taxonômica, a espécie *Cucumis melo* é subdividida em 16 variedades botânicas, onde seis pertencem à subespécie *agrestis* (*conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *momordica*, *acidulus* e *tibish*) e 10 à subespécie *melo* (*cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chate*, *dudaim* e *chito*) (PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; PITRAT, 2013). Existem três variedades botânicas em que está atribuída grande parte dos genótipos produzidos comercialmente no país: (1) *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin – plantas andromonóicas com frutos de formatos que variam de redondo a elíptico, frequentemente pontudo na região do pedúnculo, com amadurecimento tardio e indeiscente. A coloração da casca pode ser branca, amarela ou verde escura, uniforme ou com manchas, muitas vezes sendo enrugada, com ou sem costelas. A polpa é de coloração branca e doce, contendo sementes grandes. O fruto não possui aroma (fato pelo qual foi denominado *inodorus*), sendo climatérico, com longa vida útil (vários meses) e resistente às condições de transporte (MENEZES *et al.*, 2000; MUNGER; ROBINSON, 1991; PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000); (2) *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin – a maioria são andromonóicas, mas também ocorrem plantas monóicas. Os frutos são aromáticos, climatéricos, deiscentes na maturidade, com polpa doce de coloração laranja (às vezes verde), casca lisa, fortemente a moderadamente nervurada (suturas ou gomos) e sementes amarelas de tamanho médio. São de baixa conservação pós-colheita. (MENEZES *et al.*, 2000; MUNGER; ROBINSON, 1991; PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; PITRAT 2008); e, (3) *Cucumis melo* var. *reticulatus* Séringe – plantas andromonóicas com frutos de formato redondo ou ligeiramente oval, climatéricos, polpa de coloração laranja (às vezes verde), aromática e doce. Possui casca reticulada com ou sem costelas e cor variando de amarela à verde escura, sementes amarelas de tamanho médio (PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; PITRAT, 2008; PITRAT, 2013).

A classificação comercial do melão é feita dividindo grupos em tipos (Figura 1). Deve ser entendido por tipo um grupo de cultivares ou de híbridos que apresentam uma ou mais características semelhantes e que podem ser facilmente identificadas e diferenciadas dos demais, como por exemplo, o aspecto da casca – cor quando maduro, presença ou ausência de suturas, cicatrizes, reticulação ou rendilhamento, cor da polpa, formato do fruto, etc. (MENEZES *et al.*, 2000). Os tipos mais comercializados no mercado brasileiro são: Amarelo, Pele de Sapo e Honey Dew (pertencentes à variedade *inodorus*) e Cantaloupe, Gália

(pertencentes à variedade *reticulatus*) e Charentais (pertencentes à variedade *cantaloupensis*) (OLIVEIRA, 2018).

**Figura 1** – Tipos comerciais de melão (*Cucumis melo* L.)



Fonte: ARAGÃO (2011).

### 3.1.2 Aspectos Econômicos

O melão é uma hortaliça de grande importância a nível mundial. Sua produção total, em 2017, foi superior a 31 milhões de toneladas, em mais de 1,22 milhões de hectares colhidos ao redor do mundo (FAO, 2019). China, Turquia, Irã, Egito e Índia, os maiores produtores, responderam por mais de 70% do total produzido em 2017. Nesse mesmo ano, o Brasil ocupou a 14ª posição, contribuindo com aproximadamente 1,7% da produção mundial (FAO, 2019). Ainda em 2017, a produção brasileira superou 540 mil toneladas do fruto, em uma área de 23,4 mil ha colhidos. A região Nordeste respondeu por mais de 95% da produção nacional, onde se destacaram os estados do Ceará e Rio Grande do Norte como os principais produtores nacionais de melão, responsáveis por mais de 76% do percentual regional da

produção (IBGE, 2019).

No que concerne às exportações brasileiras, em 2018, mais de 36% (197,6 mil toneladas) do total produzido foi destinado ao mercado externo, movimentando valores superiores a US\$ 130 milhões. Os principais destinos do fruto foram Holanda (73,1 mil toneladas/US\$ 49,37 milhões), Espanha (55,1 mil toneladas/US\$ 37,10 milhões) e Reino Unido (48,24 mil toneladas/US\$ 35,33 milhões). Somente no primeiro trimestre de 2019, as exportações tiveram aumento de mais de 40% (23,8 mil toneladas), gerando um incremento de US\$ 11,82 milhões em relação ao mesmo período de 2018 (MDIC, 2019).

### 3.2 Melhoramento Genético

O melhoramento genético de plantas tem como escopo o aumento da produção agrícola para suprir as necessidades de uma população mundial que está em constante crescimento. A busca de pesquisadores por novas combinações genéticas, visando selecionar plantas com características superiores para atender as demandas dos agricultores e consumidores, é constante (GERMANÀ, 2011). Programas de hibridização, baseados em consanguinidade ou linhagens parentais puras, visam o desenvolvimento de híbridos de interesse. Por meio da obtenção de híbridos, a produtividade das culturas pode ser significativamente aumentada. Tendo em vista que a utilização de linhagens puras é necessária para tal fim, essas são inestimáveis para os programas de melhoramento de plantas. Entretanto, os métodos convencionais de melhoramento precisam de várias gerações de autofecundação e seleção para desenvolver linhagens que não atingem 100% da homoziguidade (DUNWELL, 2010; GERMANÀ, 2011; FORSTER *et al.*, 2007).

A obtenção de linhagens puras em diferentes culturas, especialmente plantas de polinização aberta, como o meloeiro, exige tempo, mão de obra especializada e instalações adequadas. No meloeiro, por meio de métodos como a auto polinização ou retrocruzamentos, essa etapa pode durar 7 anos ou mais. Em regiões onde a cultura estabelece apenas um ciclo por ano, esse processo pode durar de 10 a 12 anos (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013; NASERTORABI *et al.*, 2012; YASHIRO *et al.*, 2002). Sendo assim, as técnicas biotecnológicas se mostram como uma alternativa eficiente em relação aos métodos convencionais para obtenção de linhagens puras, reduzindo o tempo, os custos e alcançando a homoziguidade completa (DONG *et al.*, 2016).

### 3.3 Dihaploidização

A técnica biotecnológica da dihaploidização é uma ferramenta eficaz para a seleção e o desenvolvimento de plantas superiores. Por meio da produção de dihaploides é possível obter linhagens 100% homozigotas em apenas uma geração, eliminando numerosos ciclos de endogamia que seriam necessários para atingir níveis elevados de homozigosidade (DUNWELL, 2010; GERMANÀ, 2011). Para a obtenção de um dihaploide, duas etapas principais devem ser consideradas: (1) a indução de indivíduos haploides e (2) a duplicação cromossômica desses haploides (SEGUÍ SIMARRO; NUEZ, 2008). Plantas haploides de qualquer espécie possuem metade do número normal de cromossomos ( $n$ ). Em espécies de cucurbitáceas, a duplicação cromossômica raramente acontece de forma natural. Para obtenção de dihaploides em espécies dessa família é necessário o uso de colchicina para haver a duplicação dos cromossomos (DONG *et al.*, 2016; DRYANOVSKA, 1985).

As técnicas mais utilizadas para obtenção de haploides em cucurbitáceas são: polinização com pólen irradiado (BAKTEMUR *et al.*, 2014; GALAZKA; SLOMNICKA, 2015; KOŠMRLJ; KASTELEC; BOHANEK, 2014; SAUTON; DUMAS VAULX, 1987); cultura *in vitro* de óvulo e ovário (GODBOLE; MURTHY, 2012; KOLI; MURTHY, 2013; LI *et al.*, 2013; MALIK *et al.*, 2011; PLAPUNG *et al.*, 2014) e cultura *in vitro* de grão de pólen e de antera (ABDOLLAHI *et al.*, 2016; HAMIDVAND *et al.*, 2013; KUMAR; MURTHY; PAEK, 2003; KURTAR; BALKAYA; KANDEMIR, 2016; USMAN *et al.*, 2015).

A escolha do método para a produção de plantas haploides irá depender, em grande parte, da resposta específica da espécie a cada método. Mas naquelas que respondem bem a diferentes métodos, a mais utilizada é a androgênese, devido à sua maior simplicidade e eficiência (SEGUÍ SIMARRO; NUEZ, 2008). Muitos fatores influenciam a androgênese no cultivo *in vitro*, como: genótipo da planta doadora, condições de crescimento da planta doadora, estágio de desenvolvimento do micrósporo, pré-tratamento do botão floral, uso de choque térmico na cultura *in vitro* da antera/micrósporo, meios de cultivo de indução e diferenciação dos embriões, tempo de permanência dos explantes no meio de cultivo, tipo e concentração dos reguladores de crescimento e, quantidade de sacarose adicionada ao meio de cultivo (DONG *et al.*, 2016).

O método mais comum para obtenção de plantas haploides em cucurbitáceas é através da polinização com pólen irradiado, induzindo o desenvolvimento partenogenético de embriões haploides (GAŁAZKA; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, 2013). Em meloeiro, a sua utilização ocorreu com sucesso pela primeira vez em 1987, consistindo na germinação do

pólen irradiado no estigma, no seu crescimento dentro do estilo e na chegada ao saco embrionário, mas esse não se tornou viável para fertilizar o óvulo e os núcleos polares (KURTAR, 2009; KURTAR; BALKAYA, 2010; SAUTON; DUMAS DE VAULX, 1987).

O uso desta técnica em programas de melhoramento tem sido limitado pela pequena porcentagem de obtenção de embriões haploides (LOTFI *et al.*, 2003). Apesar dos números baixos, o melão é a espécie de maior sucesso na utilização desse método na família Cucurbitaceae (GONZALO *et al.*, 2011). A fonte e dose de radiação e o protocolo de polinização podem influenciar diretamente na eficiência desse método. O mesmo não é amplamente utilizado devido à dificuldade de acesso a fontes de cobalto-60 e a necessidade de equipamentos específicos de radiação que envolvem riscos no manuseio (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013; DAL; SARI; SOLMAZ, 2016). Em face disso, a realização do cultivo *in vitro* de anteras apresenta-se como uma alternativa viável.

### **3.4 Cultura de Tecidos Vegetais**

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com vasta aplicação na agricultura. No melhoramento genético, se mostra como uma ferramenta de otimização de tempo e melhoria na qualidade das cultivares a serem lançadas. Sua introdução se deu no início do século vinte e desde então tem sido amplamente empregada. Nessa técnica são utilizados pequenos fragmentos chamados explantes, podendo ser um segmento de folha, raiz, caule, gemas axilares ou apicais ou qualquer tecido capaz de responder às condições de indução do meio de cultivo com o objetivo principal de regenerar uma nova planta *in vitro*. Esses explantes são isolados da planta matriz, desinfestados e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em meio de cultivo apropriado (ANDRADE, 2002; HABERLANDT, 1902; TORRES *et al.*, 2000).

A produção de plantas haploides por meio de técnicas de cultivo *in vitro* permite aos melhoristas lançar de forma mais rápida e eficiente novas linhagens homozigotas, bem como rastrear com maior precisão genótipos superiores com características de interesse. O objetivo principal da pesquisa com haploides é a obtenção de plantas dihaploides universalmente adequadas para os programas de melhoramento. O desenvolvimento de técnicas *in vitro*, para a produção de haploides em cucurbitáceas, representa um notável e relativamente recente avanço nos campos da biotecnologia e melhoramento de plantas (DONG *et al.*, 2016).

Estudos iniciais, em pequena escala e restrito a dois trabalhos, foram realizados na

cultura do meloeiro utilizando cultivo *in vitro* de anteras. Os resultados obtidos foram limitados à produção de calos. No entanto, em nenhum dos trabalhos existentes é relatada a metodologia para o estabelecimento *in vitro* do explante (DRYANOVSKA; ILIEVA 1983; DRYANOVSKA, 1985). Sendo assim, fazem-se necessários maiores estudos quanto à eficácia e viabilidade dessa técnica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

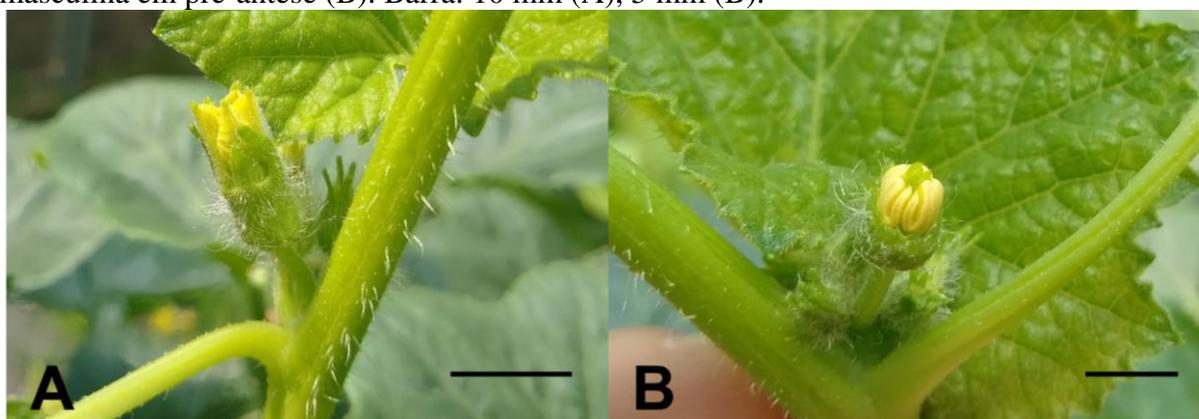
O ensaio foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza, Ceará, e dividido em dois experimentos, sendo o Experimento 1 desenvolvido de agosto a novembro de 2018 e o Experimento 2 de fevereiro a junho de 2019.

### 4.1 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes das três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* var. *inodorus*; *Cucumis melo* var. *cantalupensis* e *Cucumis melo* var. *reticulatus*) foram semeadas em bandejas de 200 células contendo uma mistura de pó de coco lavado e substrato comercial - Hortaliça CA<sup>®</sup>, na proporção de 1:1, sob condições de casa de vegetação. As plântulas permaneceram neste recipiente até o décimo dia, quando foram transplantadas para vasos de 5 litros contendo areia, oriunda do Campo Experimental de Pacajus - Embrapa Agroindústria Tropical. O espaçamento utilizado na casa de vegetação foi de 0,4m entre vasos e 0,8m entre linhas. As plantas foram tutoradas verticalmente através do uso de fitilho. Os suprimentos hídrico e nutricional seguiram as recomendações da cultura (PINTO; SOUSA, 2002).

A coleta das flores masculinas foi iniciada duas semanas após o início do florescimento das plantas, sendo realizada entre 07h30min e 10h30min. Foram utilizados como explantes, anteras excisadas de flores masculinas das três variedades botânicas em estágio de pré-antese (pétalas visíveis entre as sépalas, com coloração amarelada) (Figura 2).

**Figura 2** – Flor masculina de meloeiro (*Cucumis melo* L.) da variedade botânica *cantalupensis*, em estágio de pré-antese (A); detalhe das tecas ainda fechadas, na flor masculina em pré-antese (B). Barra: 10 mm (A), 5 mm (B).



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 Experimento 1

As flores masculinas, das três variedades, coletadas em estágio de pré-antese, foram desinfestadas, sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar em solução de álcool 70% durante 1 minuto, em seguida em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,2%) contendo duas gotas de Tween 20 por 100 mL de solução, por 15 minutos, e posteriormente lavadas três vezes em água destilada autoclavada, por 1 minuto cada. Terminado o processo de desinfestação, com auxílio de pinças e bisturis, as flores foram abertas e as anteras excisadas, partidas ao meio e inoculadas em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultivo, sendo uma antera por tubo.

Foi utilizado como meio de cultivo básico para a indução de calos o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com ágar (Gelzan<sup>®</sup>) a 1,8 g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem realizada a 121 °C, por 15 minutos. Foram utilizados como tratamentos, quatro meios de cultivo: (1) MS sem a adição de reguladores de crescimento (controle); (2) MS adicionado de 1,0 µM de BAP e 2,0 µM de 2,4-D de acordo com o protocolo de Kumar, Murthy e Paek (2003); (3) MS adicionado de 0,88 µM de BAP e 3,22 µM de ANA de acordo com Usman *et al.* (2015); e (4) MS adicionado de 4,44 µM de BAP, 2,26 µM de 2,4-D e 4,64 µM de KIN de acordo com o protocolo de Abdollahi *et al.* (2016).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, sendo três variedades botânicas e quatro meios de cultivo, com 25 repetições/tratamento/variedade, onde cada repetição era constituída por um tubo de ensaio contendo uma antera. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 µmolar.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Os explantes foram avaliados aos 65 dias após a inoculação quanto à contaminação e formação de calos e aos 90 dias, quanto ao peso dos calos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, efetuando-se quando necessárias, as devidas transformações (Box-Cox). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, dentro de cada tratamento, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os dados que não atenderam a normalidade mesmo após as devidas transformações, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Decorridas doze semanas do início do ensaio, os calos formados foram transferidos para um meio de cultivo contendo MS adicionado de 0,5 µM de ANA e 13,32 µM de BAP para a indução da regeneração de parte aérea, de acordo com o protocolo sugerido por

Hamidvand *et al.* (2013). As culturas foram mantidas por 90 dias em sala de crescimento, a  $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{molar.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

O delineamento experimental utilizado nessa fase foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, sendo três variedades botânicas e explantes provenientes de quatro meios diferentes de indução de calos, com 25 repetições/tratamento/variedade, onde cada repetição era constituída por um tubo de ensaio contendo um explante cada. Ao final dos 90 dias, as culturas foram avaliadas quanto a regeneração de parte aérea.

### 4.3 Experimento 2

O processo de desinfestação para o segundo experimento ocorreu de forma mais intensiva devido à coleta das flores masculinas ter ocorrido em período chuvoso, onde há uma maior probabilidade de haver contaminação dos explantes. A diferença, em relação ao procedimento de desinfestação efetuado no Experimento 1, se deu na concentração do cloro ativo (0,5%) da solução de hipoclorito de sódio. Terminado o processo de desinfestação, as flores masculinas em estágio de pré-antese foram abertas e as anteras excisadas, partidas ao meio e inoculadas em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultura, sendo uma antera por tubo. Foi utilizado como meio de cultivo para a indução de calos o meio MS adicionado de  $1,0 \mu\text{M}$  de BAP e  $2,0 \mu\text{M}$  de 2,4-D de acordo com o protocolo de Kumar, Murthy e Paek (2003), selecionado com base nos resultados obtidos no Experimento 1. A este meio foram adicionadas duas doses diferentes de sacarose, sendo  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de acordo com o protocolo de Kumar, Murthy e Paek (2003) e  $120 \text{ g.L}^{-1}$  de acordo com o protocolo de Kurtar, Balkaya e Kandemir (2016). A solidificação se deu por meio de ágar (Gelzan<sup>®</sup>) a  $1,8 \text{ g L}^{-1}$ . O pH dos meios de cultivo foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a  $121$  °C, por 15 minutos.

Após a inoculação *in vitro* das anteras, as culturas foram submetidas a um pré-tratamento com choque térmico a frio ( $4$  °C), em condições de escuro, durante dois dias, sob condições de geladeira de acordo com o protocolo de Kumar, Murthy e Paek (2003). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 2, sendo três variedades botânicas, duas concentrações de sacarose e dois tempos de permanência no meio de cultivo (isto é, com uma renovação do meio de cultivo aos 14 dias e sem renovação do meio, ambos permanecendo no meio de indução durante 28 dias), totalizando 12 tratamentos, com 50 repetições (anteras)/tratamento/variedade.

Aos 28 dias de cultivo *in vitro*, todas as culturas foram transferidas para o meio de cultivo contendo MS adicionado  $2,22\mu\text{M}$  de BAP de acordo com o protocolo de Song *et al.*

(2007) para a indução de regeneração de parte aérea, permanecendo neste meio de cultura por 42 dias. A este meio, assim como na fase de indução de calos, foram adicionadas duas doses diferentes de sacarose, sendo 30 g.L<sup>-1</sup> de acordo com o protocolo de Kumar, Murthy e Paek (2003) e 120 g.L<sup>-1</sup> de acordo com o protocolo de Kurtar, Balkaya e Kandemir (2016). As culturas que foram inoculadas na fase de indução em meio suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foram transferidas para meio de regeneração da parte aérea suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, bem como as inoculadas em meio de indução de calos suplementado com 120 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, foram transferidas para meio de regeneração de parte aérea suplementado com 120 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 μmolar.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, durante todo o experimento, isto é, durante 70 dias.

Os explantes foram avaliados aos 28 dias após inoculação quanto à formação, coloração, tamanho e peso dos calos e aos 70 dias quanto a regeneração de parte aérea. Com relação à cor predominante, os calos foram classificados em bege, verde claro, verde escuro e marrom. Quanto ao tamanho do calo (tc), estes foram classificados em pequeno (tc ≤ duas vezes o tamanho da antera), médio (duas vezes o tamanho da antera < tc ≤ seis vezes o tamanho da antera) e grande (tc > seis vezes o tamanho da antera). A classificação de tamanho foi feita dessa maneira para que não houvesse necessidade de retirar os calos de dentro dos tubos de ensaio, inviabilizando-os. Dessa forma, os calos não foram contaminados e continuaram viáveis para a condução do experimento. Os dados obtidos foram submetidos à análise univariada de Scott-Knott e as médias, dentro de cada tratamento, comparadas entre si a um nível de 5% de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento 1

#### 5.1.1 Fase de indução de calos

Não houve diferença significativa para formação de calos entre as três variedades botânicas de meloeiro estudadas (Tabela 1), evidenciando que, quanto ao potencial de formação de calos, os três genótipos apresentaram-se responsivos e com a mesma eficiência. A contaminação geral do experimento foi de apenas 2%.

No que concerne aos meios de cultivo, houve diferença significativa para a formação de calos (Tabela 1). Os meios 2 (MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) e 4 (MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) foram os mais eficazes e não diferiram estatisticamente entre si, produzindo calos em 100 e 97,73% das anteras avaliadas, respectivamente. Esses meios apresentaram diferenças significativas com relação ao meio 3 (MS adicionado de 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 3,22  $\mu\text{M}$  de ANA), que produziu calos em 88,73% das anteras avaliadas, e ao meio 1 (MS sem adição de reguladores de crescimento), que não produziu calos em nenhuma das anteras avaliadas.

**Tabela 1** – Porcentagem média de formação de calos em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), e em quatro meios de cultivo, aos 60 dias de cultivo *in vitro* de anteras.

Fatores	% Formação de calos
Variedade botânica	
<i>C. melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	74,15 a <sup>1</sup>
<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>	70,80 a
<i>C. melo</i> var. <i>inodorus</i>	69,90 a
Meio de cultivo <sup>2</sup>	
MS sem adição de reguladores de crescimento	0,00 c
MS + BAP (1,0 $\mu\text{M}$ ) + 2,4-D (2,0 $\mu\text{M}$ )	100,00 a
MS + BAP (0,88 $\mu\text{M}$ ) + ANA (3,22 $\mu\text{M}$ )	88,73 b
MS + 2,4-D (2,26 $\mu\text{M}$ ) + BAP (4,44 $\mu\text{M}$ ) + KIN (4,64 $\mu\text{M}$ )	97,73 a
CV (%)	42,31

<sup>1/</sup> Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância. <sup>2/</sup> MS – Murashige and Skoog (1962).

O 2,4-D é a auxina sintética mais comumente utilizada para a indução de calos e também a mais ativa, sendo mais eficiente que ANA para essa finalidade (FLORES; NICOLOSO; VASCONCELLOS, 2006; REIS; LAMEIRA; CORDEIRO, 2007). Os dados

obtidos no presente estudo corroboram com a superioridade do 2,4-D em relação ao ANA, uma vez que os meios que se apresentaram como mais eficazes (2 e 4) foram suplementados com 2,4-D.

Com relação ao peso médio dos explantes, houve diferenças significativas entre as três variedades (Tabela 2), sendo possível observar que os genótipos responderam diferencialmente ao desenvolvimento em anteras inoculadas em meios de cultivo distintos. A variedade botânica *reticulatus* não diferiu estatisticamente das variedades *cantalupensis* e *inodorus*, todavia, essas duas diferiram estatisticamente entre si.

Também foi possível notar que houve diferença significativa com relação ao peso médio dos explantes inoculados nos diferentes meios de cultivo. Os resultados obtidos (Tabela 2) reiteram a eficiência dos meios 2 e 4 sobre os demais. Esses meios não apresentaram diferenças significativas entre si, evidenciando explantes com pesos médios de 208,38 mg e 296,50 mg, respectivamente. Entretanto diferiram drasticamente dos meios 1 (6,46 mg) e 3 (92,16 mg) que também apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 3).

**Tabela 2** – Peso médio dos explantes em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.) e em quatro meios de cultivo, aos 60 dias de cultivo *in vitro* de anteras.

Fatores	Peso dos explantes (mg)
Variedade botânica	
<i>C. melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	236,82 <sup>1</sup> a <sup>2</sup>
<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>	138,85 ab
<i>C. melo</i> var. <i>inodorus</i>	76,96 b
Meio de cultivo <sup>3</sup>	
MS sem adição de reguladores de crescimento	6,46 c
MS + BAP (1,0 µM) + 2,4-D (2,0 µM)	208,38 a
MS + BAP (0,88µM) + ANA (3,22µM)	92,16 b
MS + 2,4-D (2,26 µM) + BAP (4,44µM)+ KIN (4,64µM)	296,50 a
CV (%)	11,75

<sup>1</sup>/Para ANOVA, os dados foram transformadas pelo método de Box-Cox. <sup>2</sup>Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. <sup>3</sup>MS – Murashige and Skoog (1962).

**Figura 3** – Calos formados a partir de anteras de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 65 dias de cultivo *in vitro* em meios de indução. Tratamento 1) MS sem adição de reguladores de crescimento; Tratamento 2) MS adicionado de 1,0  $\mu$ M de BAP e 2,0  $\mu$ M de 2,4-D; Tratamento 3) MS adicionado de 0,88  $\mu$ M de BAP e 3,22  $\mu$ M de ANA; Tratamento 4) MS adicionado de 4,44  $\mu$ M de BAP, 4,64  $\mu$ M de KIN e 2,26  $\mu$ M de 2,4-D. Barra: 10 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para que ocorra uma maximização da produção de calos regenerativos é necessário considerar vários fatores, como a composição do meio de cultivo, a escolha do tipo de explante e as condições de ambiente de cultivo (KIELSE; FRANCO; FRASSETTO, 2007). Um dos fatores determinantes para o crescimento e padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* é a composição e concentração dos fitorreguladores presentes no meio (COSTA, 2006). As substâncias mais utilizadas na cultura de tecidos em Cucurbitáceas são as auxinas (ANA, AIA, 2,4-D) e citocininas (BAP, KIN, TDZ) (DONG *et al.*, 2016).

As auxinas atuam na divisão e expansão celular, no desenvolvimento de tecidos vasculares e de raízes, crescimento de calos, indução de embriões somáticos, bem como no desenvolvimento de meristemas e brotos. As citocininas, por sua vez, desempenham um papel importante na regulação, divisão celular, na formação de gemas adventícias, de brotações adventícias e axilares. A interação e disponibilidade desses reguladores de crescimento no meio de cultivo levam ao crescimento e desenvolvimento *in vitro*, influenciando na formação

de calos, parte aérea e raízes em cultura de tecidos (POZO *et al.*, 2005).

Em cultivo de anteras de outras espécies da família Cucurbitaceae, como *Cucumis sativus* L. (HAMIDVAND *et al.*, 2015; KUMAR; MURTHY; PAEK, 2003) e *Momordica charantia* L. (USMAN *et al.*, 2015), também não houve formação de calos nos explantes inoculados em meio MS sem adição de reguladores de crescimento. Com base nos dados obtidos no presente estudo é possível observar que só houve formação de calos nos meios adicionados de reguladores de crescimento, ratificando a necessidade de adição dessas substâncias no meio de cultivo para a indução de calos nas variedades de meloeiro estudadas.

Em *Momordica charantia* L. cv. Faisalabad Long, Usman *et al.* (2015) observaram que o meio MS adicionado de 3,22  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP apresentou-se como o meio de indução mais indicado, produzindo calos em 61-63% das anteras avaliadas, resultado inferior ao observado no presente estudo ao ser utilizado o mesmo meio (88,73%).

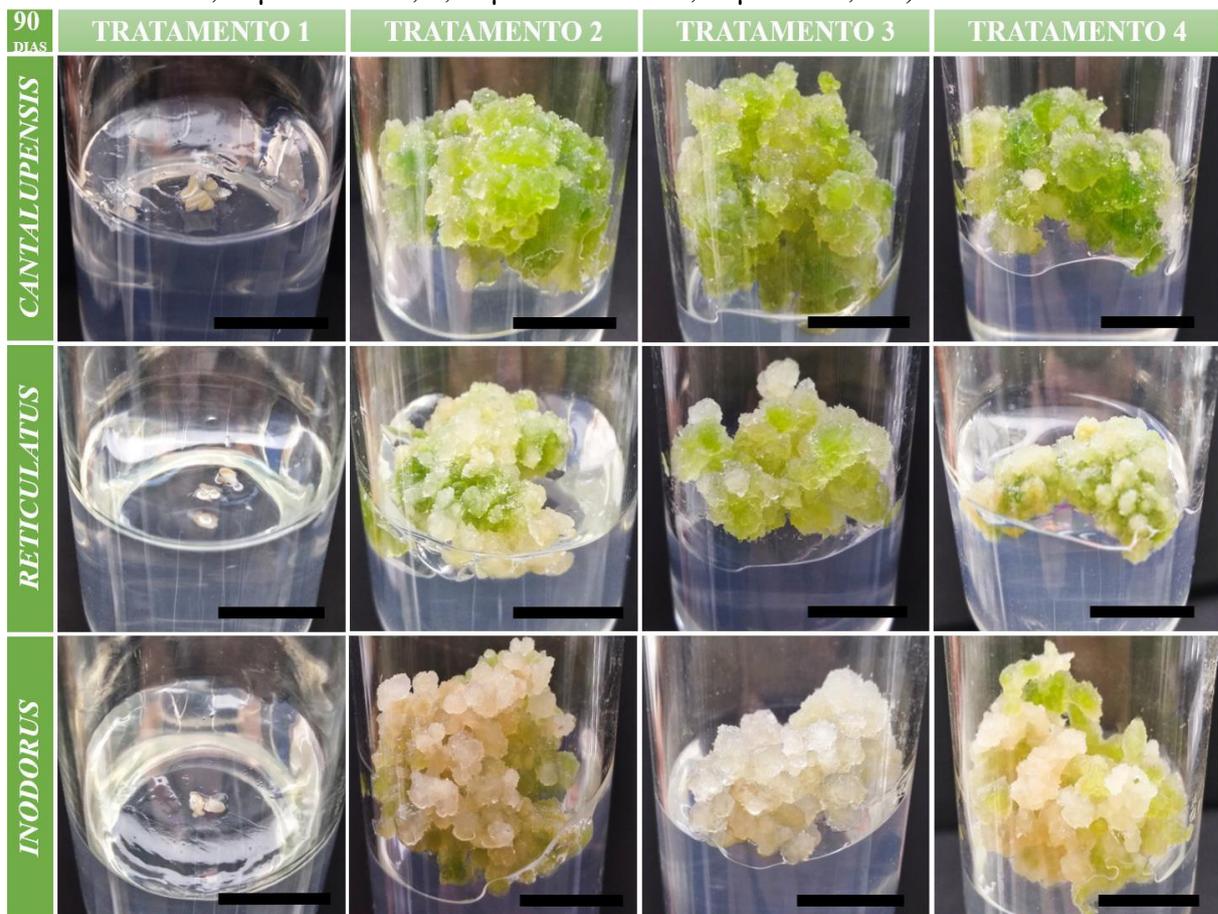
Abdollahi *et al.* (2016), em estudo com diferentes genótipos de *Cucumis sativus* L., observaram que cada genótipo respondeu diferencialmente à eficiência de formação de calos em anteras inoculadas em meio de cultura contendo MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, diferindo dos resultados obtidos nas variedades botânicas de meloeiro *cantalupensis*, *reticulatus* e *inodorus*, que não apresentaram uma resposta específica para cada genótipo com relação ao potencial de formação de calos (Tabela 1). O genótipo é um fator chave que influencia a indução de calos/embriões e a subsequente regeneração de plantas em androgênese *in vitro*. Para algumas espécies, a regeneração do embrião ocorre facilmente, enquanto para outras a obtenção dessa resposta é muito difícil, podendo haver também diferenças entre cultivares de uma mesma espécie (DONG *et al.*, 2016).

Kumar, Murthy e Paek (2003) observaram em anteras de Calypso e Green Long, cultivares de *Cucumis sativos* L., resposta máxima (41 e 47%, respectivamente) para produção de calos embriogênicos de anteras inoculadas em meio de indução de embriões contendo 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Entretanto, diferindo dos resultados obtidos nesse estudo, em anteras da cultivar Calypso foi observada embriogênese direta após seis semanas de inoculação, onde os embriões emergiram diretamente na superfície dos explantes. Em Green Long, a embriogênese ocorreu de forma indireta. Esses autores constataram que após quatro semanas de inoculação, as anteras induziram calos embriogênicos de coloração amarelada e esses, após duas semanas, induziram a formação de embriões. Entretanto, no presente estudo não foi observada a formação de embriões em nenhum dos calos formados nos meios de indução para as três variedades estudadas.

### 5.1.2 Fase de regeneração de parte aérea

Não foi observada formação de parte aérea nos calos inoculados no meio MS adicionado de 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP para nenhum dos tratamentos (Tratamento 1: Calos oriundos do meio sem adição de reguladores de crescimento; Tratamento 2: Calos oriundos de MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; Tratamento 3: Calos oriundos de meio MS adicionado de 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 3,22  $\mu\text{M}$  de ANA; Tratamento 4: calos oriundos de meio MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) testados nas variedades botânicas de meloeiro *cantalupensis*, *reticulatus* e *inodorus* (Figura 4).

**Figura 4** – Calos das três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP para a indução da regeneração de parte aérea. Tratamento 1) Calos oriundos do meio 1 de indução de calos (MS sem adição de reguladores de crescimento); Tratamento 2) Calos oriundos do meio 2 de indução de calos (MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D); Tratamento 3) Calos oriundos do meio 3 de indução de calos (MS adicionado de 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 3,22  $\mu\text{M}$  de ANA); Tratamento 4) calos oriundos do meio 4 de indução de calos (MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D). Barra: 10 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Contrastando com os resultados obtidos no presente estudo, Hamidvand *et al.* (2013), observaram que ao transferir os calos embriogênicos, oriundos de meios MS suplementados com diferentes concentrações de 2-4-D e BAP, para meio MS suplementado com 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP objetivando regeneração de parte aérea, os embriões sofreram diferenciação passando do estágio de torpedo para cotiledonar.

Abdollahi *et al.* (2016), ao utilizar o meio MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D em estudo com diferentes genótipos de *Cucumis sativus* L., constataram número médio máximo de 1,26 embriões por antera na variedade Isfahani, diferindo do presente estudo, onde o uso do mesmo meio de cultivo teve efeito apenas na indução de calos. Entretanto, esses mesmos autores, combinaram o meio MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D com diferentes concentrações de macronutrientes e ágar, constatando que alguns genótipos apresentaram maior calogênese e indução de embriões nos meios de cultura contendo maiores concentrações de macronutrientes ou ágar, enquanto outros responderam muito bem aos meios de com menores concentrações de macronutrientes ou ágar. Nesse contexto, é possível supor que a indução de embriões em anteras de diferentes variedades de meloeiro seja influenciada também pela concentração de macronutrientes e/ou ágar presentes no meio de cultivo.

Em anteras de *Momordica charantia* L. cv. Faisalabad Long, Usman *et al.* (2015) verificaram que os calos obtidos apresentaram estruturas semelhantes a pseudo-embriões, todavia esses não se desenvolveram e não foi observado nenhum outro desenvolvimento embrionário após dez semanas de subcultivo. É possível que estruturas semelhantes a pseudo-embriões sejam induzidas no meio de cultivo, mas não apresentem crescimento e nem regenerem parte aérea.

Uma série de fatores pode ter influenciado para o insucesso da regeneração da parte aérea no cultivo *in vitro* de anteras de meloeiro. Dentre os fatores, destacam-se: o genótipo da planta doadora, estágio de desenvolvimento do micrósporo, o pré-tratamento do botão floral masculino, a não utilização de choque térmico na cultura *in vitro* da antera/micrósporo, os meios de cultivo de indução e diferenciação dos embriões, tipo e concentração dos reguladores de crescimento, tempo de permanência dos explantes no meio de cultivo, quantidade de sacarose adicionada ao meio de cultivo e as condições de cultivo tanto das plantas doadoras quanto das culturas *in vitro* (DONG *et al.*, 2016).

## 5.2 Experimento 2

### 5.1.1 Fase de indução de calos

Houve formação de calos em todas as anteras inoculadas no meio de cultivo de indução (Figura 5), ratificando os resultados obtidos no experimento 1. Foi possível observar no experimento 1 que os meios 2 (MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) e 4 (MS adicionado de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,64  $\mu\text{M}$  de KIN e 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) se mostraram como os mais indicados para a indução de calos nas três variedades de meloeiro estudadas no presente ensaio. O meio 2, por apresentar resultados que não diferiram estatisticamente do meio 4 e ter na composição uma quantidade menor tanto de auxina como de citocinina, foi escolhido como meio de indução de calos para o experimento 2.

Kumar, Murthy e Paek (2003) e Hamidvand *et al.* (2013) afirmaram que para *Cucumis sativus* L. a combinação de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D aumentou a formação de calos embriogênicos e o número médio de embriões por antera em culturas de anteras em comparação ao controle e a outros tratamentos contendo diferentes reguladores de crescimento. Resultado semelhante com relação a formação de calos foi observado no presente estudo em *C. melo* var. *cantalupensis*, *reticulatus* e *inodorus*. Contudo, não houve formação de embriões.

A porcentagem de formação de calos não foi influenciada pelos tratamentos. Todavia, as diferentes doses de sacarose e a renovação do meio de cultivo causaram diferenças significativas quanto à cor, ao tamanho e peso dos calos. Como a interação entre os fatores foi significativa, os efeitos dos tratamentos tornam-se evidentes ao se analisar a interação eles.

**Figura 5** – Calos formados a partir de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D suplementado com duas quantidades de sacarose (30 e 120  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e dois tempos de permanência no meio de cultivo (com uma renovação do meio de cultivo aos 14 dias e sem renovação do meio) para a indução de calos. Barra: 10mm.

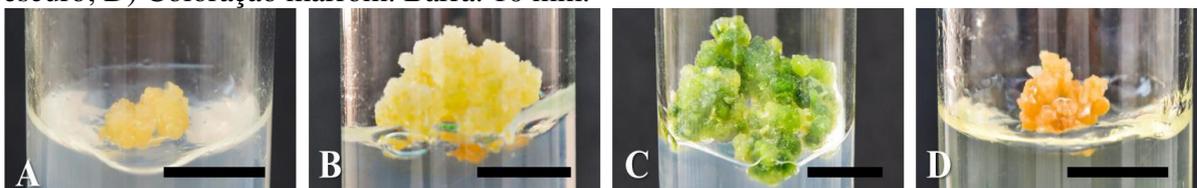


Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação à cor predominante, os calos foram classificados em bege, verde claro, verde escuro e marrom (Figura 6). No tratamento com 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarose e renovação do meio de cultivo, a variedade *cantalupensis* diferiu estatisticamente das demais apresentando, em sua maioria, calos de coloração verde escura. E, as variedades *inodorus* e *reticulatus*, que não diferiram estatisticamente entre si, apresentaram majoritariamente calos de coloração verde clara. Comportamento semelhante foi observado no meio suplementado

com a mesma quantidade de sacarose e sem renovação, onde a variedade *cantalupensis* diferiu estatisticamente das demais e apresentou somente calos de coloração verde escura. Nas mesmas condições, as variedades *inodorus* e *reticulatus*, que não diferiram estatisticamente entre si, apresentaram predominantemente calos de coloração bege (Tabela 3).

**Figura 6** – Classificação da coloração predominante dos calos obtidos a partir de anteras de três variedades botânicas de meloeiro (*C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *reticulatus* e *C. melo* var. *inodorus*) aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0  $\mu$ M de BAP e 2,0  $\mu$ M de 2,4-D. A) Coloração bege; B) Coloração verde claro; C) Coloração verde escuro; D) Coloração marrom. Barra: 10 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 3** – Influência de diferentes concentrações de sacarose e renovação do meio de cultivo MS adicionado de 1,0  $\mu$ M de BAP e 2,0  $\mu$ M de 2,4-D, na cor e no tamanho dos calos formados em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro* das anteras.

Concentração de sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	Variedade botânica	Renovação do meio de cultivo aos 14 dias	
		Sim	Não
<b>Cor dos calos<sup>1</sup></b>			
30	<i>C. melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	3,10 a <sup>3</sup>	3,00 a
	<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>	2,07 b	1,38 b
	<i>C. melo</i> var. <i>inodorus</i>	2,21 b	1,50 b
120	<i>C. melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	1,89 a	1,62 a
	<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>	2,16 a	1,29 b
	<i>C. melo</i> var. <i>inodorus</i>	1,00 b	1,08 b
<b>Tamanho dos calos<sup>2</sup></b>			
30	<i>C. melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	2,90 a	2,95 a
	<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>	2,67 a	1,98 b
	<i>C. melo</i> var. <i>inodorus</i>	2,83 a	2,00 b
120	<i>C. melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	1,16 a	1,08 b
	<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>	1,11 a	1,35 a
	<i>C. melo</i> var. <i>inodorus</i>	1,00 a	1,10 b

<sup>1</sup>/Cor dos calos: 1- bege; 2- verde claro; 3- verde escuro; e, 4- marrom. <sup>2</sup>/Tamanho dos calos (tc): 1- pequeno (tc  $\leq$  duas vezes o tamanho da antera), médio (duas vezes o tamanho da antera < tc  $\leq$  seis vezes o tamanho da antera) e grande (tc > seis vezes o tamanho da antera). <sup>3</sup>/Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Foi observado no tratamento utilizando  $120 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose com renovação do meio de cultivo, que as variedades *cantalupensis* e *reticulatus* não diferiram estatisticamente entre si, apresentando principalmente calos de coloração verde clara. Porém, elas diferiram estatisticamente da variedade *inodorus*, que apresentou calos de coloração bege. Quando inoculados em meio de cultivo sem renovação e suplementado com  $120 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, os calos da variedade *cantalupensis* apresentaram majoritariamente coloração verde clara, diferindo estatisticamente das demais variedades. Nessas condições, foi possível observar que a maioria dos calos formados nas anteras das variedades *reticulatus* e *inodorus*, que não diferiram estatisticamente entre si, apresentaram coloração bege.

Sumariamente, a variedade *cantalupensis* apresentou a maior quantidade de calos verdes. A maioria dos calos verdes escuros estavam concentrados nos tratamento com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Kurtar, Balkaya e Kandemir (2016), em estudo com o cultivo *in vitro* de anteras de abóbora (*Cucurbita maxima* Duch.) e moranga (*Cucurbita moschata* Duch.), obtiveram calos de coloração esverdeada e amarelada, sendo a frequência de calos embriogênicos maior nos calos de coloração esverdeada. No estudo desses autores, os meios de cultivo foram renovados por três vezes em intervalos de sete dias, objetivando manter a coloração esverdeada dos calos e estimular a regeneração de partes aéreas em meio de diferenciação.

Em anteras de pepino (*Cucumis sativus* L.) Kumar, Murthy e Paek (2003) observaram a formação de calos de coloração branco amarelada após duas semanas de inoculação em meio contendo  $2,0 \mu\text{M}$  de 2,4-D e  $1,0 \mu\text{M}$  de BAP. Resultados semelhantes foram obtidos por Hamidvand *et al.* (2013), que ao inocularem anteras de pepino em meio MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas e citocininas, relataram a formação de calos de coloração branca amarelada em duas semanas de cultivo *in vitro*. Song *et al.* (2007) relataram que, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, anteras de pepino se tornaram verdes escuras após dez dias de inoculação e, nas três semanas seguintes, foi possível observar a formação de calos translúcidos amarelados. Esses resultados diferem dos observados no presente estudo, onde nenhum calo obtido apresentou coloração amarelada, branco amarelada ou translúcidos amarelados.

Yamada e Sato (1978) relataram que à medida que se aumenta o incremento de sacarose no meio de cultivo, o teor de clorofila diminui e, por consequência, a coloração verde das células. Comportamento semelhante pode ser observado no presente estudo, onde a maioria dos calos de coloração bege estão presentes no tratamento com  $120 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, evidenciando que, para as três variedades de meloeiro estudadas, altas doses de sacarose podem diminuir a capacidade fotossintética dos tecidos.

Ao se excisar parte da planta e cultivá-la *in vitro*, as células não são fotossinteticamente ativas e necessitam de carboidratos para crescimento e desenvolvimento. A sacarose é um dos carboidratos mais utilizados como fonte de carbono e energia. A presença da sacarose no crescimento *in vitro* das culturas é essencial, mas sua concentração em excesso pode ser prejudicial, pelo efeito inibitório na síntese de clorofila, que reduz a capacidade fotossintética dos tecidos (PAIVA, R.; PAIVA, P., 2001; YAMADA; SATO, 1978).

Foi possível observar presença de calos de coloração predominante marrom em quase todos os tratamentos (exceto em: calos da variedade *cantalupensis* em meio suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e sem renovação; calos da variedade *reticulatus* em meio suplementado com 120 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e com renovação do meio), entretanto, em um percentual muito baixo. A cor marrom pode estar associada à oxidação do calo, uma vez que também foi observada, no meio, a liberação de possíveis exsudatos de coloração amarronzada.

Alguns micronutrientes presentes no meio de cultivo, tais como o manganês e o cobre, podem estimular a oxidação de fenóis, sendo recomendado usar estas formulações de sais em baixas concentrações. Os explantes, ao serem inoculados no meio de cultivo podem apresentar escurecimento e liberar exsudatos que tornam o meio de cultivo escuro (PAIVA, R.; PAIVA P., 2001). Segundo Cid e Teixeira (2010) o corte do explante com bisturi pode desencadear a oxidação fenólica, responsável pela cor marrom.

Quanto ao tamanho (tc), os calos foram classificados em pequeno (tc ≤ duas vezes o tamanho da antera), médio (duas vezes o tamanho da antera < tc ≤ seis vezes o tamanho da antera) e grande (tc > seis vezes o tamanho da antera). (Figura 7).

**Figura 7** – Classificação do tamanho dos calos (tc) obtidos a partir de anteras de três variedades botânicas de meloeiro (*C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *reticulatus* e *C. melo* var. *inodorus*) aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0 µM de BAP e 2,0 µM de 2,4-D. A). Calo pequeno (≤ duas vezes o tamanho da antera); B) Calo médio duas vezes o tamanho da antera < tc ≤ seis vezes o tamanho da antera); C). Calo grande (tc > seis vezes o tamanho da antera). Barra: 10 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os maiores calos foram observados no tratamento utilizando 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose com renovação do meio de cultivo aos 14 dias, onde não houve diferença estatística entre as

variedades, predominando calos de tamanho grande. O tratamento utilizando 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e sem renovação do meio de cultivo aos 14 dias apresentou predominância de calos grandes apenas para a variedade *cantalupensis*, diferindo estatisticamente das variedades *inodorus* e *reticulatus*, que apresentaram predominância de calos de tamanho médio e não diferiram estatisticamente entre si. No tratamento utilizando meio suplementado com 120 g.L<sup>-1</sup>, os calos de todas as variedades apresentaram tamanho pequeno tanto com a renovação do meio de cultivo aos 14 dias quanto sem a renovação do meio (Tabela 3).

Werner *et al.*, (2009) afirmaram que a renovação do meio de cultura pode evitar a oxidação e depleção excessiva de nutrientes no meio de cultivo. Segundo George, Hall e De Klerk (2008), a renovação do meio permite a remoção de metabólitos tóxicos, o fornecimento de nutrientes e a hidratação, fatores que são prejudicados quando o crescimento do material vegetal é conduzido em recipientes fechados. Por consequência da renovação desses fatores, há um crescimento do material inoculado, sendo mais indicado renovar o meio de cultivo após 3-4 semanas de inoculação. Todavia, no presente estudo, o meio foi renovado após duas semanas.

Pode-se observar que, de maneira geral, no tratamento com meio suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, os calos que tiveram o meio de cultivo renovado aos 14 dias apresentaram majoritariamente tamanho grande para as três variedades, valores maiores que os obtidos no tratamento sem renovação do meio (exceto para a variedade *cantalupensis*, que apresentou maioria de calos grandes, independente da renovação ou não renovação do meio). Embora a resposta do genótipo influencie de maneira específica na formação do calo, tal comportamento é esperado, uma vez que a renovação da disponibilidade de nutrientes do meio está diretamente relacionada com o estímulo no crescimento dos calos.

No tratamento utilizando meio suplementado com 120 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, o tamanho dos calos apresentou comportamento semelhante para as três variedades. Independente da troca, os calos apresentaram, em sua maioria, tamanho pequeno. Uma vez que altas doses de sacarose no meio de cultivo causa uma redução na capacidade fotossintética, o desenvolvimento do explante é afetado, o que pode ser observado no tamanho dos calos, que diminuiriam com um aumento no incremento de sacarose.

Para a variável peso dos calos, de uma forma geral, a variedade *cantalupensis* apresentou os melhores resultados (Tabela 4). No tratamento com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose os calos da variedade *cantalupensis* apresentaram maior peso médio (352,07 mg), diferindo estatisticamente das variedades *reticulatus* (191,75 mg) e *inodorus* (158,76 mg), que não diferiram estatisticamente entre si.

Todas as variedades apresentaram um decréscimo significativo no peso dos calos com o aumento da dose de sacarose, resultado esperado, visto que os calos de menor tamanho foram observados nos tratamentos contendo 120 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 3). Os calos das variedades *cantalupensis* e *inodorus* não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram os maiores pesos médios, dentre os inoculados em meio suplementado com 120g.L<sup>-1</sup> de sacarose (47,88 e 48,03mg, respectivamente), ambas diferindo estatisticamente da variedade *reticulatus* (39,54 mg).

**Tabela 4** - Influência de diferentes concentrações de sacarose e renovação do meio de cultivo no peso dos calos formados a partir de anteras de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0 µM de BAP e 2,0 µM de 2,4-D.

Tratamentos	Peso dos calos (mg)		
	Variedades botânicas		
	<i>cantalupensis</i>	<i>inodorus</i>	<i>reticulatus</i>
Concentração de sacarose (g.L <sup>-1</sup> )			
30	352,07 aA	158,76 bA	191,75 bA
120	47,88 aB	48,03 aB	39,54 bB
Mudança de meio de cultivo aos 14 dias			
Sim	115,66 aB	95,72 bA	117,00 aA
Não	244,88 aA	111,07 bA	111,80 bA

<sup>1</sup>/Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância.

A renovação do meio de cultivo não causou diferenças significativas no peso dos calos das variedades *reticulatus* e *inodorus*. Entretanto, a variedade *cantalupensis* foi a única que apresentou diferenças significativas entre os tratamentos com e sem renovação do meio de cultivo, apresentando calos de maior peso médio no tratamento sem renovação do meio de cultivo. Ainda no tratamento sem renovação de meio, houve diferença significativa no peso médio dos calos entre as variedades. A variedade *cantalupensis* (244,88 mg), diferiu estatisticamente das variedades *reticulatus* (111,80 mg) e *inodorus* (111,07 mg), que não diferiram estatisticamente entre si. No tratamento com mudança de meio, *cantalupensis* e *reticulatus* não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram as maiores médias de pesos (115,66 e 117,00 mg, respectivamente), diferindo estatisticamente da variedade *inodorus* (95,72 mg).

É importante salientar que houve um maior índice de contaminação por bactéria nos tratamentos com renovação de meio de cultivo suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. É possível que as altas doses de sacarose tenham suprimido o desenvolvimento de microrganismos no meio de cultivo, entretanto é necessário que sejam feitos mais testes para realizar tal afirmação.

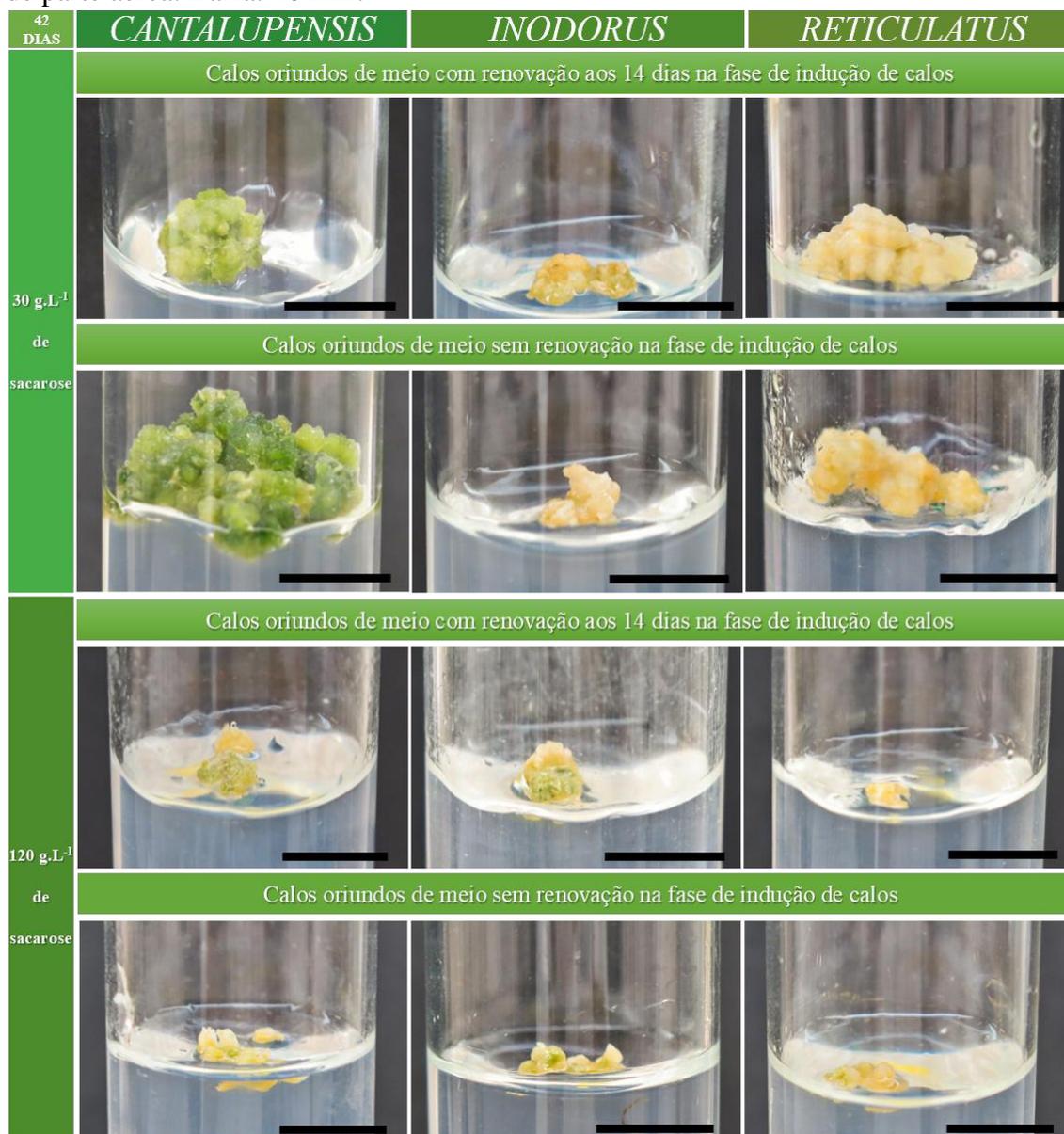
### **5.1.2 Fase de regeneração de parte aérea**

Não foi observada formação de parte aérea em nenhum dos tratamentos testados nas variedades botânicas de meloeiro *cantalupensis*, *reticulatus* e *inodorus* (Figura 8), após 48 dias da inoculação *in vitro* dos calos em meio para regeneração de parte aérea.

Em pepino (*Cucumis sativus* L.), Song *et al.* (2007) relataram que a adição de menores concentrações de citocinina (2,22 µM de BAP) ao meio de indução promoveu androgênese, formando calos translúcidos amarelados e, posteriormente, resultando na formação de embriões. Kumar, Murthy e Paek (2003) observaram a formação de embriões em calos de coloração branco amarelados oriundos de anteras de pepino após quatro semanas de inoculação em meio contendo 2,0 µM de 2,4-D e 1,0 µM de BAP.

Semelhantemente, Hamidvand *et al.* (2013), obtiveram calos embriogênicos após quatro semanas de inoculação em meio MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas e citocininas. No presente estudo, não houve formação de calos amarelados, branco amarelados ou translúcidos amarelados, bem como não foi observada a formação de embriões em calos inoculados em meios MS suplementado com 2,22 µM de BAP e MS suplementado com 2,0 µM de 2,4-D e 1,0 µM de BAP.

**Figura 8** – Calos formados a partir de anteras de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 42 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado 2,22  $\mu$ M de BAP suplementado com duas quantidades de sacarose (30 e 120  $\text{g.L}^{-1}$ ) para regeneração de parte aérea. Barra: 10 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Diversas alternativas foram utilizadas no presente experimento como forma de contornar o insucesso na regeneração de plantas haploides. Em diversos trabalhos com cucurbitáceas é mencionado pré tratamento com temperatura associado a condições de escuro como forma de estimular a indução de calos e embriões (ASADI *et al.*, 2018; KUMAR; MURTHY; PAEK, 2003; KURTAR; BALKAYA; KANDEMIR, 2016; SONG *et al.*, 2007, USMAN *et al.*, 2015). Tendo em vista que os micrósporos precisam de um sinal para mudar da via gametofítica para a esporofítica, o estresse, particularmente os pré-tratamentos a frio e

a quente, têm sido usados para induzir a embriogênese de anteras isoladas, uma vez que rompe o citoesqueleto durante a fase inicial da cultura de micrósporos, enquanto que tanto a temperatura quanto o tempo de exposição ideais para o pré-tratamento é genótipo específica (DONG *et al.*, 2016; FERRIE; PALMER; KELLER, 1995; KUMAR; MURTHY; PAEK, 2003). Associado as condições de pré tratamento térmico e a frio, submeter os explantes a ausência de luz, na fase inicial, pode causar um aumento na produção de calos. Isso pode estar associado a degradação das auxinas, que em condições de escuro, ocorre mais lentamente (JARAMILLO; SUMMERS, 1991; PAIVA, R.; PAIVA, P., 2001).

Diferindo do presente estudo com relação ao pré tratamento, Song *et al.* (2007), utilizaram choque frio (4 °C durante 0 a 4 dias) e tratamento térmico (31 °C durante 1 hora) em 20 genótipos diferentes de pepino, onde obtiveram como resposta que o estresse de temperatura mais adequado pode depender do ecótipo, ou seja, pepinos cultivados em áreas de temperaturas baixas responderam melhor ao pré tratamento a frio, enquanto aqueles cultivados em áreas de temperaturas elevadas, apresentaram melhor desempenho ao pré tratamento térmico. Zhang *et al.* (2004), mencionam que as plantas de regiões temperadas eram capazes de tolerar o frio, enquanto as espécies de regiões tropicais eram sensíveis ao estresse pelo frio. Dunwell (2010) afirma que a temperatura sob a qual as plantas doadoras são cultivadas é um fator que afeta a resposta da cultura *in vitro*. No entanto, mais experimentos são necessários para comprovar essa hipótese nas variedades de meloeiro estudadas.

Kumar, Murthy e Paek (2003) estudando a formação de embriões em anteras de pepino, submetidas a tratamentos de choque frio (4 °C durante 1 a 10 dias) e choque térmico (32 °C durante 1 hora), constataram que choque a frio, durante 2 dias, apresentou resultados mais satisfatórios, aumentando significativamente a produção de embriões. Embora o mesmo período de exposição ao choque frio tenha sido utilizado como pré tratamento no presente estudo, não foi observada a formação de nenhum embrião.

Os resultados obtidos no presente estudo acentuam a importância do genótipo, do uso de pré tratamento e da composição do meio de cultivo na indução de calos e na frequência de formação de plantas haploides através do cultivo *in vitro* de anteras em meloeiro.

## 6 CONCLUSÃO

O protocolo utilizado não foi eficiente para obtenção de plantas haploides das três variedades botânicas de meloeiro estudadas. Os tratamentos com meio MS adicionado de 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA e 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP (experimento 1) e meio MS adicionado de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (experimento 2) não foram eficazes para induzir a regeneração de parte aérea, a partir dos calos formados em anteras cultivadas *in vitro* das três variedades botânicas de meloeiro. Quanto à formação de calos, o meio MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D se mostrou como o mais eficaz, formando calos em todas as anteras inoculadas, em três variedades de meloeiro.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se que o aumento da concentração de sacarose, adicionada ao meio de cultivo, influencia negativamente o desenvolvimento dos calos, tornando-os menores e menos clorofilados. A renovação do meio de cultivo, aos 14 dias, combinada a dose de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose estimula a produção de clorofila e aumenta o tamanho dos calos para as três variedades botânicas de meloeiro estudadas.

Verificou-se que a porcentagem de contaminação, por bactérias, dos explantes mantidos nos meios de cultivo contendo 120 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, foi menor quando comparada a de 30 g.L<sup>-1</sup>. É possível que as altas doses de sacarose suprimam o desenvolvimento de microrganismos em meio de cultivo, entretanto é necessário que sejam feitos mais testes para sustentar tal afirmação.

No presente estudo, as anteras foram submetidas apenas a um pré-tratamento, 4 °C durante dois dias. Uma vez que o pré-tratamento (principalmente estresse de temperatura) mais adequado pode depender do ecótipo da planta, melhores respostas poderiam ser obtidas ao se testar diferentes temperaturas e tempos de exposição ao estresse, resultando em uma faixa ideal para a regeneração de plantas haploides a partir de anteras.

Entre as três variedades botânicas estudadas, *cantalupensis* se mostrou mais eficiente que as demais quanto ao tamanho, peso e cor (verde) dos calos. Sugere-se que os próximos estudos sejam direcionados à variedade botânica mais responsiva, *cantalupensis*, de forma a elucidar um protocolo para regeneração de plantas haploides e posteriormente tentar aplica-lo para as demais variedades botânicas de meloeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. R. *et al.* Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, p. 571-579, 2016.
- ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 16p –Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 58. 2002.
- ANDREWS, A. C. Melons and watermelons in the classical era. **Osiris**, v. 12, p. 368-375, 1956.
- ASADI, A. *et al.* Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**, v. 214, n. 11, p. 216, 2018.
- BAKTEMUR, G. *et al.* Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash. **Turkish Journal of Biology**, 38, 318–327. <https://doi.org/10.3906/biy-1309-5>, 2014.
- BAKTEMUR, G.; TAŞKIN, H.; BÜYÜKALACA, S. Comparison of different methods for separation of haploid embryo induced through irradiated pollen and their economic analysis in melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*). **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- BRAGA SOBRINHO, R. *et al.* **A produção integrada de melão no Brasil**. Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E), 2008.
- CID, L.P.B; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 51-66.
- COSTA, A. S. **Sustentabilidade da produção de Alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando à conservação *in vitro***. 2006. 70 f. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)-Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.
- DAL, B.; SARI, N.; SOLMAZ, I. Effect of different irradiation sources and doses on haploid embryo induction in Altinbas (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) melons. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 40, n. 4, p. 552-559, 2016.
- DECKER-WALTERS, D. S. Cucurbits, sanskrit, and the Indo-Aryas. **Economic Botany**, v. 53, n. 1, p. 98-112, 1999.
- DONG, Y. Q. *et al.* Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. **Plant cell reports**, v. 35, n. 10, p. 1991-2019, 2016.
- DRYANOVSKA, O. A. Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from Cucurbitaceae family. **C R Academie Bulgare Des Sciences**, 38 (9): 1243, 1985.
- DRYANOVSKA, O. A.; ILEVA, I.N. *In vitro* anther and ovule cultures in muskmelon

(*Cucumis melo* L.). **C R Academie Bulgare Des Sciences**, 36(8): 1107-1110, 1983.

DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 4, p. 377-424, 2010.

FAO. **Faostat – Statistics Database**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#home> > Acesso em 14 de maio de 2019.

FERRIE, A. M. R.; PALMER, C. E.; KELLER, W. A. Haploid embryogenesis. In: ***In vitro embryogenesis in plants***. Springer, Dordrecht, 1995. p. 309-344.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.

FORSTER, B. P. *et al.* The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in plant science**, v. 12, n. 8, p. 368-375, 2007.

GAŁĄZKA, J.; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. **Folia Horticulturae**, v. 25, n. 1, p. 67-78, 2013.

GALAZKA, J.; SLOMNICKA, R. From Pollination To Dh Lines - Verification and Optimization of Protocol for Production of Doubled Haploids in Cucumber. **Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus**, 14(3), 81–92. 2015.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. The Background. **Springer**. Aberystwyth.UK, 2008.

GERMANÀ, M. A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. **Plant cell reports**, v. 30, n. 5, p. 839-857, 2011.

GODBOLE, M.; MURTHY, H. N. *In vitro* production of haploids via parthenogenesis in culinary melon (*Cucumis melo* var. *acidulus*). **Indian Journal of Biotechnology**, vol 11, pp 495-497, 2012.

GONZALO, M. J. *et al.* Parthenogenic haploids in melon: generation and molecular characterization of a doubled haploid line population. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 136, n. 2, p. 145-154, 2011.

HABERLANDT, G. **Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen**. Sitzungsber. Math. Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien., v.1, p. 69-92, 1902.

HAMIDVAND, Y.; ABDOLLAHI, M.R.; CHAICHI, M.; MOOSAVI, S.S. The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 5, n. 10, p. 1089-1095, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA**. Disponível em < <http://www.sidra.ibge.gov.br> > Acesso em 14 de maio de 2019.

JARAMILLO, J.; SUMMERS, W. L. Dark–light treatments influence induction of tomato anther callus. **HortScience**, v. 26, n. 7, p. 915-916, 1991.

KIELSE, P. V. N.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Indução de calogênese em explantes de *Parapiptadenia rígida*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 84-86, 2007.

KOLI, S.P.; MURTHY, H.N. Haploid plant regeneration from unpollinated ovules of *Cucumis melo* L. var. conomon cv. Mudicode. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. 605-613, 2013.

KOŠMRLJ, K.; KASTELEC, D.; BOHANEK, B. Styrian oil pumpkin pollen germinability at higher irradiation doses: Optimization of the *in vitro* germination protocol and irradiation procedure. **Turkish Journal of Biology**, 38(4), 516–522. <https://doi.org/10.3906/biy-1402-58>, 2014.

KOUAKOU, K. L.; DOUBI, T. S.; KOFFI, K. K.; KOUASSI, K. I.; KOUAKOU, T. H.; BAUDOIN, J.; BI, Z. Androgenic potential and anther *in vitro* culture of *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. an edible-seed cucurbit, **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, 9(August), 1779–1789, 2015.

KUMAR, H. G. A.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 3, p. 213-222, 2003.

KURTAR, E. S. Influence of gamma irradiation on pollen viability, germination ability, and fruit and seed-set of pumpkin and winter squash. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 24, 2009.

KURTAR, E. S.; BALKAYA, A. Production of *in vitro* haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 102, n. 3, p. 267-277, 2010.

KURTAR, E. S.; BALKAYA, A.; KANDEMIR, D. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, n. 2, p. 497-511, 2016.

LI, J. W. *et al.* Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. **Biologia Plantarum** 57 (1): 164-168, 2013.

LOPES, J. F.; CARVALHO, S. I. C.; PESSOAL, H. B. S. V. **Recursos genéticos de melão e pepino na Embrapa Hortaliças**. Brasília: Embrapa . 8p. (Comunicado técnico-científico, 10). 1993.

LOTFI, M. *et al.* Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. **Plant Cell Reports**. 21:1121–1128. 2003.

MALIK, A. A. *et al.* Efficiency of SSR makers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. **Horticultural Science**, v. 38, n. 1, p. 27–34, 2011.

MALLICK, M. F. R.; MASUI, M. Origin, distribution and taxonomy of melons. **Scientia Horticulturae**, v. 28, n. 3, p. 251-261, 1986.

MENEZES, J. B. *et al.* Características do melão para exportação. In: ALVES, R.E. (Org.). **Melão: pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 2000. p.13-22. (Frutas do Brasil, 10).

MINISTÉRIO DE DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO - MDIC. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior** Via Internet do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior- AliceWeb. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em 14 de maio de 2019.

MUNGER, H. M.; ROBINSON, R. W. Nomenclature of *Cucumis melo* L. **Cucurbit Genetic Cooperative Report**, v. 14, n.1, p 43-44, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASERTORABI, M. *et al.* **Production of haploid lines from parthenogenetic Iranian melon plants obtained of irradiated pollen (*Cucumis melo* L).** Int. Res. J. Appl. Bas. Sci, v. 3, n. 8, p. 1585-1589, 2012.

OLIVEIRA, F. I. C. **Estabelecimento *in vitro*, calogênese e cruzamentos interespecíficos visando obtenção de haploides em meloeiro**. Embrapa Agroindústria Tropical- Tese/dissertação (ALICE), 2018.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Textos acadêmicos: cultura de tecidos. **Lavras: FAEPE/UFLA**, 2001.

PINTO, J. M.; SOUSA, V. F. de. Melão. In: BORGES, A. L.; COELHO, E. F.; TRINDADE, A. V. (Org.). **Fertirrigação em fruteiras tropicais**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura - SIN, cap. 7, p. 122-128. 2002.

PITRAT, M. Melon. In: PROHENS J.; NUEZ F. (eds.) **Handbook of plant breeding. Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopoidicaceae, and Cucurbitaceae**. Springer, USA, pp. 283–315, 2008.

PITRAT, M. Phenotypic diversity in wild and cultivated melons (*Cucumis melo*). **Plant Biotechnology** 30, 273-278, 2013.

PITRAT, M.; HANELT, P.; HAMMER, K. Some comments on infra-specific classification of cultivars of melon. In: N. Katzir and H.S. Paris (eds.). **Proc. Cucurbitaceae**. Acta Horticulturae. 510:29–36, 2000.

PLAPUNG, P. *et al.* Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences** 9 (3): 261-269, 2014.

POZO, J. C. D. *et al.* Hormonal control of the plant cell cycle. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 2, p. 173-183, 2005.

REIS, L. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2, 4-D na indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium parahyba* var *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.

SAUTON, A.; DUMAS DE VAULX, R. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenese induite par du pollen irradie. **Agronomie**, 7: 141-148. 1987.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and genome research**, v. 120, n. 3-4, p. 358-369, 2008.

SONG, H. *et al.* Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 3, p. 245-254, 2007.

TORRES, A. C. *et al.* **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 128 p. 2000.

USMAN, M. *et al.* Exploring embryogenic competence in anthers of bitter melon (*Momordica charantia* L.) cultivar faisalabad long. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 25(1), page: 181-188 ISSN: 1018-7081, 2015.

WERNER, E. T. *et al.* Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, 2009.

YAMADA, Y.; SATO, F.. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 19, n. 4, p. 691-699, 1978.

YASHIRO K, HOSOYA K, KUZUYA M, TOMITA K, EZURA E. Efficient production of doubled haploid melon plants by modified colchicines treatment of parthenogenetic haploids. **Acta Horticulturae**, v.588, p.335–338, 2002.

ZHANG, X. *et al.* Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 39, n. 6, p. 905-919, 2004.