



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

LARISSA DOS SANTOS LOPES

CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE MELOEIRO

FORTALEZA

2019

LARISSA DOS SANTOS LOPES

CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE MELOEIRO

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Medeiros Filho.

Coorientadora: Dr^a. 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)

L854c Lopes, Larissa dos Santos.

Cultivo in vitro de anteras de meloeiro / Larissa dos Santos Lopes. – 2019.
38 f. : il. color.

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

Orientação: Prof. Dr. Sebastião Medeiros Filho.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.

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

CDD 630

LARISSA DOS SANTOS LOPES

CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE MELOEIRO

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Aprovada em: 19/06/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Medeiros Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho (Coorientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Fernando Antônio de Sousa Aragão
Embrapa Agroindústria Tropical/UFC

Dr. Frederico Inácio Costa de Oliveira
CNPQ/ Embrapa Agroindústria Tropical/UFC

A Deus.

Aos meus pais, a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa Agroindústria Tropical, por prover as instalações necessárias para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Ceará por ter sido por alguns anos meu lar. Aqui cresci, e tive a oportunidade de ser ensinada por grandes mestres.

Ao meu orientador Dr. Sebastião Medeiros Filho, um referencial de profissional e ser humano.

A Dr^a Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho que gentilmente concordou em me coorientar. Uma das pessoas mais humanas que já conheci, sou grata por todo o aprendizado.

Ao Dr. Fernando Antonio de Sousa Aragão que de bom grado realizou as análises estatísticas do presente trabalho, muito obrigada.

Ao Dr. Frederico Inácio Costa de Oliveira pela imensa ajuda ao longo do experimento, e por toda a sabedoria.

A Alexya Vitória Félix Carvalho, pela paciência ao me ensinar tanto no laboratório de cultura de tecidos, quanto pela amizade sincera.

Ao professor Lamartine Soares Cardoso de Oliveira, por todos os conselhos na etapa de graduação. Muito obrigada pela sabedoria, e por toda a ajuda. Foi essencial

Ao meu namorado Neto, por ter sido fundamental para a elaboração da minha monografia, obrigada por todo o companheirismo e carinho.

Aos meus amigos do grupo no whatsapp “Espalha...” e a todos os irmãos que a Agronomia me proporcionou, sem vocês a caminhada certamente teria sido muito mais difícil.

A República Ovelha Negra, obrigada pela parceria, e por tantos momentos divertidos.

A minha amiga Úrsula, por ter sempre palavras doces e motivadoras. Obrigada por todos os conselhos, e confidências trocados.

A minha família que sempre esteve tão presente em minha vida, obrigada pela torcida.

Por fim, e certamente o mais importante, dedico a Deus, obrigada por mais uma etapa concluída.

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o
que torna a vida interessante.”

Paulo Coelho

RESUMO

O meloeiro (*Cucumis melo L.*), pertencente à família Cucurbitaceae, é uma hortaliça de ampla importância mundial. A haploidização é uma técnica que permite a fixação de genes de forma rápida, pelo uso de dihaploides, facilitando a seleção de genótipos com características de interesse. A dihaploidização é utilizada com objetivo de acelerar o programa de melhoramento de algumas espécies cultivadas, sendo uma alternativa promissora para reduzir o tempo de obtenção de linhagens homozigotas. Contudo, em meloeiro, a eficiência desse método é baixa, principalmente na etapa de regeneração das plantas haploides. A cultura *in vitro* de anteras é uma via para a obtenção de haploides em Cucurbitáceas. Portanto, objetivou-se com este trabalho a obtenção de plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de anteras. As variedades botânicas utilizadas foram: *inodorus*; *cantalupensis* e *reticulatus*. Utilizou-se como explantes anteras excisadas de botões florais masculinos obtidos na pré-antese, a partir de plantas mantidas em casa de vegetação. As anteras foram seccionadas ao meio, e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo. Na etapa de calogênese, as anteras foram colocadas em meio de cultivo básico MS, suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2x2, sendo os fatores: três variedades botânicas, dois pré-tratamentos, à frio ($4 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, durante 7 dias) e o outro à calor ($32 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, durante 7 dias), e dois tempos de permanência no meio de cultivo (aos 14 e 28 dias), totalizando 12 tratamentos, com 60 repetições. As culturas permaneceram por 28 dias na sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16h de luz, e intensidade luminosa de $30\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Não se constatou formação de calos na fase de indução. Aos 28 dias, todos os explantes foram transferidos para o meio de cultivo de maturação de calos (MS + 2,0 mg/L de 2,4 D + 0,5 mg/L de BAP). Os calos foram formados a partir da primeira semana no meio de cultivo de maturação, permanecendo neste meio por um período de 4 semanas. Aos 63 dias após a inoculação *in vitro* das anteras, os explantes foram avaliados quanto à formação, tamanho, oxidação e massa fresca dos calos. Os dados obtidos foram submetidos à análise univariada de Scott Knott, e as médias comparadas entre si a um nível de 5% de significância. Houve diferença significativa para formação de calos, sendo *cantalupensis* a variedade mais eficiente dentre as três estudadas. A taxa de oxidação foi mínima, não interferindo na condução do experimento. A variedade *cantalupensis* submetida aos tratamentos de renovação do meio de cultivo aos 14 dias, e ao choque térmico a 32°C no escuro por sete dias, se destacou em formação e massa fresca de calos. Os pré-tratamentos, aliados a renovação ou não e os

reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultivo, não foram eficazes para formação de parte aérea, a partir dos calos das três variedades botânicas estudadas.

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

ABSTRACT

The melon (*Cucumis melo* L.), belongs to Cucurbitaceae family, it is a vegetable of global importance. Haploidization is a technique that allows fast genes fixation by the use of dihaploids, facilitating to select genotypes with characteristics of interest. Dihaploidization is used to accelerate the breeding program of some cultivated species, being a promising alternative to reduce time to obtain homozygous strains. However, in melon, the efficiency of this method is low, mainly in haploid plants regeneration stage. The in vitro culture of anthers is a way to obtain haploids in Cucurbitaceae. Therefore, the objective of this work was to obtain melon haploid plants by in vitro culture of anthers. The botanical varieties used were: *inodorus*, *cantalupensis* and *reticulatus*. Anther explants, obtained from male floral buds in pre-anthesis stage, were used from plants kept in greenhouse. The anthers were split in half and inoculated into test tubes containing 10 mL of culture medium. In the calogenesis step, the anthers were placed in MS basic culture medium, supplemented with 2.0 mg / L 2,4-D. The experimental design was completely randomized in a 3x2x2 factorial scheme, with the following factors: three botanical varieties, two pre-treatments, cold ($4 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark for 7 days) and the other in the heat ($32 \pm 1^\circ\text{C}$, in the dark for 7 days), and two permanence time in the culture medium (at 14 and 28 days), totaling 12 treatments, with 60 replicates. The cultures remained for 28 days in the growth room at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ under photoperiod of 16h light, and luminous intensity of $30\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. No callus formation was observed in the induction phase. After 28 days, all explants were transferred to callus maturation medium (MS + 2.0 mg / L of 2.4 D + 0.5 mg / L of BAP). The calluses were formed from the first week in the maturation culture medium, remaining in this medium for 4 weeks. At 63 days after the in vitro inoculation of the anthers, the explants were evaluated for formation, size, oxidation and fresh mass of the calli. Data were submitted to Scott Knott's univariate analysis, and means were compared to each other at a 5% level of significance. There was a significant difference for callus formation, with *cantalupensis* being the most efficient variety among the three studied. The oxidation rate was minimal, not interfering with the conduction of the experiment. *Cantalupensis* variety, submitted to renewal of culture medium at 14 days, and the thermal shock at 32°C in the dark for seven days, showed better callus formation and fresh mass. The pre-treatments allied to culture medium renewal or not and the growth regulators added to the culture media, were not effective for shoot formation, from the calli of the three botanical varieties studied.

Key words: *Cucumis melo* L. Androgenesis. Dihaploide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos comerciais de melão (<i>Cucumis melo L.</i>).....	18
Figura 2 – Oxidação em calos de <i>Cucumis melo L.</i> da variedade <i>cantalupensis</i>	25
Figura 3 – Calos na variedade <i>cantalupensis</i> , sob a influência da renovação do meio de cultivo, e choque térmico à quente e à frio, aos 63 dias de cultivo <i>in vitro</i> de anteras.....	31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Porcentagem de oxidação, e formação de calos em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), submetidas a dois pré-tratamentos, e renovação do meio de cultivo aos 63 dias do cultivo *in vitro* das anteras..... 29
- Tabela 2 Tamanho dos calos de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), sob influência de pré-tratamentos e renovação do meio de cultivo aos 63 dias de cultivo *in vitro* das anteras..... 30
- Tabela 3 Massa fresca dos calos de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), sob influência de pré-tratamentos e renovação do meio de cultivo aos 63 dias de cultivo *in vitro* das anteras..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAP	6-benzilaminopurina
FAO	Faostat –Statistics Database
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MS	Meio Murashige & Skoog(1962)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.1 Objetivos específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 O meloeiro	17
3.1.1 Aspectos botânicos.....	17
3.1.2 Aspectos econômicos	19
3.2 Melhoramento genético	19
3.3 Técnica de dihaploidização	20
3.4 Cultura de tecidos vegetais.....	21
3.5 Androgênese em meloeiro	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Local, material vegetal e condições de cultivo.....	23
4.1.1 Fase de indução de calos.....	24
4.1.2 Fase de maturação dos calos	24
4.1.3 Fase de indução de embriões	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Fase de indução de calos.....	26
5.2 Fase de maturação de calos	27
5.2 Fase de indução de embriões.....	31
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo L.*) pertencente à família das cucurbitáceas, é uma hortaliça de grande importância em todo o mundo (YASIR et al., 2016). Indícios apontam seu centro de origem como sendo nos continentes asiático e africano, de onde ocorreu a dispersão para outras partes do mundo. (LOPES; CARVALHO; PESSOA, 2003).

De acordo com a classificação taxonômica, a espécie *Cucumis melo L.* foi dividida em dezesseis variedades botânicas, sendo seis pertencentes à subsp. *agrestis*, e 10 à subsp. *melo* (PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; PITRAT, 2013). As três variedades botânicas de maior expressividade na produção comercial no Brasil, são *cucumis melo* var. *inodorus*, *cucumis melo* var. *cantalupensis*, e *cucumis melo* var. *reticulatus* (VARGAS et al., 2008; BRITO, 2017).

Segundo dados da FAO (2019), os principais países produtores de melão, são: China, Turquia, Irã, Egito e Índia. Entre aqueles com ascensão na produção e comercialização, o Brasil tem se destacado significativamente, alcançando no ano de 2017 mais de 540 toneladas, em aproximadamente 23 mil hectares colhidos (FAO, 2019). A produção brasileira concentra-se na região Nordeste, onde no mesmo ano contribuiu com mais de 95% da produção nacional com ênfase para os estados de Rio Grande do Norte e Ceará (IBGE 2019).

Com o avanço da cultura do melão e a sua importância para a agricultura mundial, os programas de melhoramento tem procurado incorporar genes para características relativas à superioridade da qualidade de fruto, tais como cor e textura de polpa, aumento do teor de sólidos solúveis, resistência a pragas e doenças e melhor capacidade ao transporte a longas distâncias (LOPES; CARVALHO; PESSOA, 1999).

Uma das técnicas utilizadas para aumentar a produtividade é a obtenção de híbridos. Contudo, este processo demanda considerável tempo e recursos devido a geração de linhagens homozigotas, por conta das sucessivas gerações de autofecundação e seleção, durante o melhoramento convencional (DONG et al., 2016).

Cultivares comerciais de meloeiro são, predominantemente, híbridos F₁. Para que a produção desses genótipos tenha sucesso, os parentais devem possuir alto grau de homozigose (linhas puras) (YASHIRO et al., 2002). Contudo, usando técnicas convencionais de melhoramento de plantas, como a auto-polinização ou retrocruzamentos, essa etapa pode durar mais de sete anos (YASHIRO et al., 2002), e, para outros autores, podem ser necessários de 10 a 12 anos para se

obter linhas puras. Além disso, não é possível obter materiais 100% homocigotos, mesmo após sucessivos avanços nas gerações (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013).

A haploidização é uma técnica empregada há mais de 50 anos que permite a fixação de genes de forma rápida, pelo uso de dihaploides, facilitando a seleção de genótipos com características de interesse. Essa técnica tem sido bastante utilizada com o objetivo de acelerar os programas de melhoramento de algumas espécies cultivadas (GATAZKA; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, 2013).

Aos menos quatro técnicas são utilizadas para obtenção de haploides em Cucurbitáceas: partenogênese haploide *in situ*, induzida principalmente por polinização com pólen irradiado (SAUTON; DUMAS VAULX, 1987; BAKTEMUR et al., 2014; KOŠMRLJ; KASTELEC; BOHANEK, 2014; GALAZKA; SLOMNICKA, 2015; KOUAKOU et al., 2015), ginogênese *in vitro* (cultura *in vitro* de óvulo e ovário) (MALIK et al., 2011; GODBOLE; MURTHY, 2012; KOLI; MURTHY, 2013; LI et al., 2013; PLAPUNG et al., 2014) androgênese *in vitro* (cultura *in vitro* de antera e grão de pólen) (SUPRUNOVA; SHMYKOVA, 2008; HAMIDVAND et al., 2013; USMAN et al., 2015; ABDOLLAHI et al., 2016), e cruzamento interespecífico (DUMAS, 1979; DEVAUX; PICKERING, 2005).

A cultura *in vitro* de anteras tem sido relatada como sendo um método eficiente para produção de haploides em muitas espécies vegetais (FERRIE et al., 1995), inclusive nas cucurbitáceas, como meloeiro (DRYANOVSKA, 1983), abóbora (METWALLY et al., 1998), de melancia (ABDOLLAHI et al., 2015) e pepino (ASHOK KUMAR; MURTHY; PAEK, 2003; VIZINTIN; BOHANEK, 2004; SUPRUNOVA; SHMYKOVA, 2008; HAMIDVAND et al., 2013; ABDOLLAHI et al., 2016).

A cultura *in vitro* de anteras é frequentemente o método de escolha para a produção de dihaploides em muitas culturas, porque a praticidade permite o estabelecimento e a aplicação em larga escala de culturas de anteras a uma ampla gama de genótipos (Sopory e Munshi, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obtenção de plantas haploides a partir do cultivo in vitro de anteras de três variedades botânicas de meloeiro.

2.1 Objetivos específicos

1. Influência do pré-tratamento com frio e calor no cultivo in vitro de anteras de meloeiro das variedades *reticulatus*, *inodorus* e *cantalupensis*;
2. Indução in vitro de calos em anteras, com a renovação do meio de cultivo em intervalos de 14 e 28 dias;
3. Obtenção de mudas haploides por meio da transferência dos calos obtidos para meio de cultivo de regeneração.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O meloeiro

3.1.1 Aspectos botânicos

A família Cucurbitaceae abrange um grande número de espécies de grande valor econômico, como melão (*Cucumis melo* L.), 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.) dentre outras espécies cultivadas em todo o mundo (DONG et al., 2016). O melão destaca-se como uma das hortaliças que apresenta considerável expressão econômica e social no Brasil e no mundo (VALADARES et al.; 2017).

O centro de origem de uma planta é de suma importância, pois é local onde está a maior diversidade de genes que poderão ser utilizados para o melhoramento genético. Não é sabida exatamente a origem do melão, acredita-se que seja nos continentes africano e asiático, e suas formas selvagens originadas do leste da África ao sul do deserto de Saara, e as encontradas na Índia derivadas de cultivares locais (LOPES; CARVALHO; PESSOA, 2003). A aparição de tipos idênticos nessas regiões e em áreas próximas dá respaldo maior a teoria da deriva continental. A introdução em diferentes locais do mundo pode ter sido através do homem ou por animais (OLIVEIRA et. al, 2017).

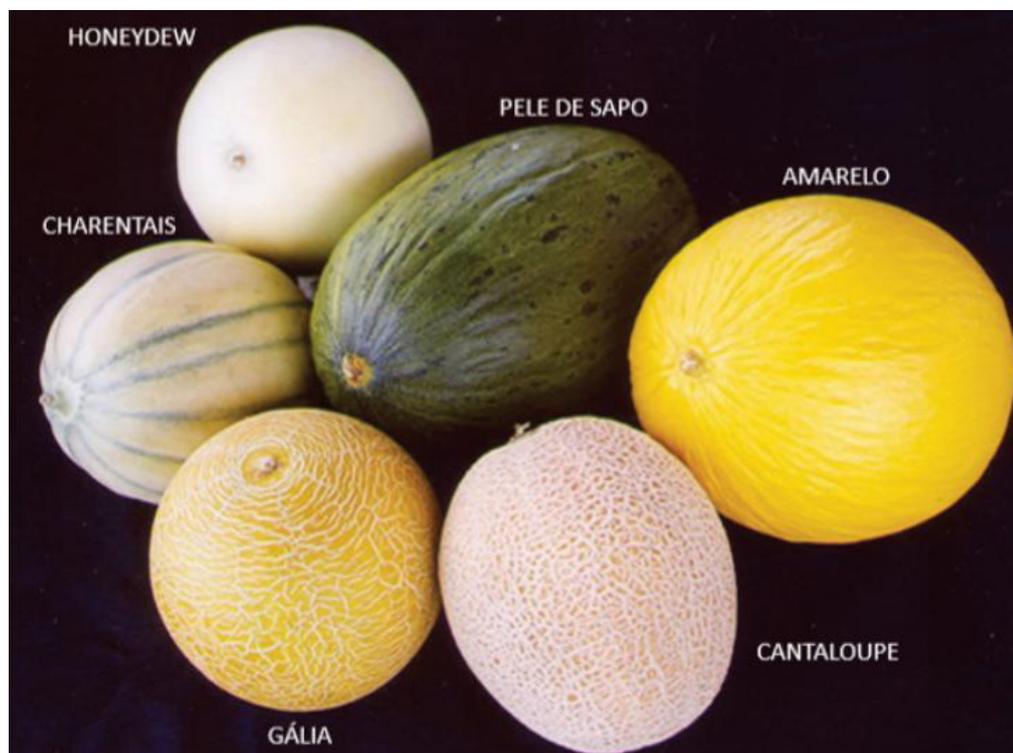
Conforme a classificação taxonômica, a espécie *Cucumis melo* L. foi dividida em dezesseis variedades botânicas, seis pertencentes à subsp. *agrestis* (*conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *momordica*, *acidulus* e *tibish*) e 10 à subsp. *melo* (*cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chate*, *dudaim* e *chito*) (PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; PITRAT, 2013).

As três variedades botânicas mais produzidas comercialmente no Brasil são *Cucumis melo* var. *inodorus*, *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, e *Cucumis melo* var. *reticulatus* (VARGAS et al., 2008; BRITO, 2017). 1- *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin: plantas andromonoicas, com fruto redondo à elíptico, algumas vezes apresentam aspecto pontudo na região do pedúnculo. No que diz respeito à cor da casca, pode ser de coloração branca, amarela ou verde escura, com manchas ou ter sua tonalidade uniforme, mas essencialmente com casca rugosa, com ou sem costelas. Polpa branca e doce, sem aroma, fruto não climatérico (PITRAT 2008); 2- *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin:

Geralmente são plantas andromonoicas, mas também podem se apresentar como monoicas. Frutos de tamanho médio com casca lisa a moderadamente verrugosa; polpa geralmente laranja aromática e doce; são climatéricos, e na maturidade apresentam deiscência. Charentais é o mais comercializado no Brasil pertencente a esta variedade (MUNGER; ROBINSON, 1991; PITRAT et al., 2000; PITRAT 2008). 3- *Cucumis melo* var. *reticulatus* Séringe: andromonoica; casca reticulada com ou sem costelas; fruto redondo a ovalado; polpa geralmente laranja, aromática e doce; fruto climatérico (PITRAT et al., 2000; PITRAT 2008).

A classificação comercial divide os melões em tipos, a fim de facilitar a comercialização em todo o mundo (Figura 01). O tipo relaciona um grupo de cultivares ou de híbridos que manifesta uma ou mais características semelhantes, que são facilmente identificadas e diferenciadas das demais, tais como formato do fruto, cor e textura da casca, cor da polpa, entre outros (Perpiñá et al.; 2016). Os tipos mais comercializados no Brasil são: Amarelo, Pele de Sapo e Honey Dew (pertencentes à variedade *inodorus*); Cantaloupe e Gália (pertencentes à variedade *reticulatus*) e Charentais (pertencentes à variedade *cantalupensis*).

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



Fonte: ARAGÃO (2011).

3.1.2 Aspectos econômicos

Segundo dados mais recentes da FAO (2019), a produção mundial de melão em toneladas no ano de 2017, foi de aproximadamente 32 milhões em mais de 1,22 milhões de hectares colhidos. China, Turquia, Irã, Egito e Índia, responderam a um valor em torno de 68% desse total produzido. O Brasil contribuiu com menos de 2%, ocupando a 11ª posição, alcançando mais de 540 toneladas, cerca de 23 mil hectares colhidos (FAO 2019). Segundo o anuário brasileiro da fruticultura (2018), o Brasil é autossuficiente em termos de produção de melão destacando-se no âmbito econômico, entre as espécies mais exportadas pelo país.

A região Nordeste em 2017 foi responsável por 95% da produção total brasileira, havendo destaque para Rio Grande do Norte e Ceará, sendo os estados de maior concentração da hortaliça (IBGE 2019). A combinação de altas temperaturas, intensa luminosidade e baixa umidade, características do clima nordestino, tem contribuído de forma significativa para sua produção na região (ALVES et al., 2018). Atualmente o cultivo de meloeiro para exportação está dividido entre esses dois centros de produção. Para atender esta demanda, o setor mantém em produção cerca de 22 mil hectares, sendo 20 mil destes localizados nos estados do Rio Grande do Norte e do Ceará (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2018).

Em 2018, mais de 36% do total produzido foi direcionado ao mercado externo, gerando mais de 130 milhões de dólares. Os principais destinos foram Holanda (73,1 mil toneladas/US\$ 4937 milhões), Espanha (55,1 mil toneladas/US\$37,10 milhões) e Reino Unido (48,24 mil toneladas/US\$ 35,33 milhões). Ainda no primeiro trimestre de 2019, as exportações tiveram aumento de mais de 40% (23,8 mil toneladas), gerando uma alta de 11,82 milhões de dólares em relação ao mesmo período de 2018 (MDIC, 2019).

3.2 Melhoramento genético

O melhoramento genético de plantas é uma importante estratégia para o aumento da produtividade de forma mais ecológica e equilibrada (BORÉM, 2005). Estima-se que metade do incremento de produtividade, nas principais culturas nos últimos 50 anos, tenha sido proporcionado pelo melhoramento genético, o qual busca elevação na produção mundial, e ao mesmo tempo redução da quantidade de insumos utilizados (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Uma das técnicas utilizadas para aumentar a produtividade é a obtenção de híbridos, alcançados por meio do cruzamento de linhagens puras com características

contrastantes entre si. Todavia, este processo demanda considerável tempo e recursos para a geração de linhagens homocigotas, devido às sucessivas gerações de autofecundação e seleção, etapas do melhoramento convencional (DONG et al., 2016). Cultivares comerciais de melão, são, predominantemente, híbridos F₁. Para que a produção desses genótipos tenha sucesso, os parentais devem possuir alto grau de homocigose (YASHIRO *et al.*, 2002). Contudo, usando técnicas convencionais de melhoramento de plantas, como a auto-polinização ou retrocruzamentos, essa etapa pode durar mais de sete anos (YASHIRO *et al.*, 2002), e, para outros autores, podem ser necessários de 10 a 12 anos para se obter linhas puras. Além disso, não é possível obter materiais 100% homocigotos, mesmo após sucessivos avanços nas gerações (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013).

3.3 Técnica de dihaploidização

A produção de dihaploides inclui inúmeras vantagens, a saber: máxima variação genética, redução de tempo, custos, e ainda obter linhagens 100% homocigotas, em apenas um ciclo (GEIGER e GORDILLO, 2009; GONZALO, et al., 2011). A técnica consiste na duplicação do número de cromossomos de uma planta haploide, ocasionando a dihaploidia (CANHOTO, 2010). Os estágios que compreendem a obtenção de dihaploides englobam a geração de haploides por meio de cruzamentos de indução, seguida da separação de haploides da descendência desse cruzamento.

Para o próximo passo, os haploides devem passar por um tratamento para estimular a duplicação cromossômica por meio do uso de substâncias antimitóticas, sendo a colchicina mais utilizada (RAO; SUPRASANNA, 1996; CARVALHO; VIDAL, 2003; SILVA, 2017). Seu uso é fundamental para obtenção de dihaploides em cucurbitáceas, pois em espécies dessa família, a duplicação cromossômica pode ocorrer raramente de forma natural (DRYANOVSKA, 1985).

As técnicas mais utilizadas para obtenção de haploides em cucurbitáceas são: polinização com pólen irradiado (SAUTON; DUMAS VAULX, 1987; BAKTEMUR et al., 2014; KOŠMRLJ; KASTELEC; BOHANEK, 2014; GALAZKA; SLOMNICKA, 2015; KOUAKOU et al., 2015); cultura *in vitro* de óvulo e ovário (MALIK et al., 2011; GODBOLE; MURTHY, 2012; KOLI; MURTHY, 2013; LI et al., 2013; PLAPUNG et al., 2014), e cultura *in vitro* de grão de pólen e da antera (SUPRUNOVA; SHMYKOVA, 2008; HAMIDVAND et al., 2013; USMAN et al., 2015; ABDOLLAHI et al., 2016), e cruzamento interespecífico (DUMAS, 1979; DEVAUX; PICKERING, 2005).

Para a escolha da técnica a ser utilizada, é importante levar em consideração a resposta específica de cada espécie às diferentes técnicas. A técnica de pólen irradiado é a mais amplamente utilizada para induzir dihaploidização de Cucurbitáceas. A dihaploidia foi alcançada pela técnica de pólen irradiado em abobrinha (Kurtar et al. 2002; Berber 2009; Baktemur et al. 2014), abóbora (Kurtar et al. 2009), e *C. maxima* (Kurtar e Balkaya 2010).

Contudo, esta técnica depende do genótipo, dose de irradiação, duração da irradiação, composições do meio de cultivo, condições de cultura, tempo de colheita, dentre outros (Kurtar e Balkaya 2010). Essa dependência resulta em baixos números de plantas haploides obtidas, dessa técnica (KURTAR; BALKAYA; KANDEMIR, 2016). Por tais restrições, a cultura in vitro de anteras surge como uma das possibilidades à obtenção de dihaploides.

3.4 Cultura de tecidos vegetais

A técnica consiste na retirada de fragmentos de tecidos (chamados explantes) como células ou órgãos, que respondam às condições de indução, principalmente à regeneração de plantas. Estes explantes são acondicionados em meio nutritivo, cultivados assépticamente, sob condições controladas de luz e temperatura (TORRES et al., 2000).

A metodologia do cultivo in vitro é baseada na totipotência das células vegetais, isto é, na capacidade de produção de órgãos, como brotos e/ou raízes, ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa num meio de cultivo favorável (CARVALHO; VIDAL, 2003).

O número de pesquisas envolvendo haploidização em plantas a partir do cultivo in vitro utilizando tecidos haploides (ginogênese e androgênese) e subsequentemente indução da duplicação de cromossomos forneceu uma estratégia para acelerar significativamente o processo de melhoramento de culturas, já que as características podem ser fixadas sem múltiplas gerações de autofecundação.

Uma vez obtidas as linhas dihaploides, seu genótipo pode ser rapidamente multiplicado, permitindo que os melhoristas avaliem as muitas características quantitativas e qualitativas que precisam para o desenvolvimento de uma cultivar com características de interesse. O resultado é uma economia substancial em tempo e recursos em relação à prática convencional (ISHII; KARIMI-ASHTIYANI; HOUBEN, 2016). O desenvolvimento de técnicas in vitro, para a produção haploide em cucurbitáceas, representa um avanço

relativamente recente, nos campos da biotecnologia e reprodução de plantas (DONG et al., 2016).

3.5 Androgênese em meloeiro

A descoberta de Guha e Maheshwari (1964, 1996), ao evidenciarem que plantas poderiam ser geradas a partir de anteras cultivadas de *Datura innoxia*. O método foi testado e utilizado em muitas espécies, porém com baixíssimo conhecimento dos mecanismos subjacentes envolvidos. Na atualidade, a cultura de anteras é um dos métodos amplamente utilizado (WEDZONY et al, 2009), sendo que mais de cem espécies já foram testadas e avaliadas.

A cultura *in vitro* é frequentemente o método de escolha para a produção de dihaploides em muitas culturas, devido à simplicidade desta técnica, permitindo a aplicação em escala comercial para várias espécies (SOPORY E MUNSHI, 1996).

A cultura *in vitro* de anteras tem sido mencionada como sendo um método eficiente para produção de haploides em muitas espécies (FERRIE et al., 1995), bem como na família das cucurbitáceas, como: meloeiro (DRYANOVSKA; ILEVA, 1983; DRYANOVSKA, 1985), abóbora (METWALLY et al., 1998), pepino (ASHOK KUMAR et al., 2003; SONG et al., 2007 e HAMIDVAN et al., 2013) e de melancia (ABDOLLAHI et al., 2015).

Numerosos fatores endógenos e exógenos afetam significativamente a resposta embriogênica de anteras (DATTA, 2005; SMYKAL, 2000; WANG et al, 2000), tais como o genótipo, estado fisiológico e as condições de crescimento de plantas doadoras de explantes, estágio de desenvolvimento do pólen, pré-tratamento dos botões florais ou anteras, meios e condições de cultivo *in vitro*, juntamente com suas interações (KELLER et al., 1975; GERMANÀ, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, material vegetal e condições de cultivo

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza, Ceará, no período de fevereiro a junho de 2019.

Como explantes foram utilizadas anteras excisadas de botões de flores masculinas obtidos na pré-antese. As flores masculinas foram colhidas de plantas sadias, pertencentes a três variedades botânicas de meloeiro: *cucumis melo* var. *inodorus*, *Jacquin*; *cucumis melo* var. *cantalupensis*, *Naudin* e *Cucumis melo* var. *reticulatus* *Séringe*.

A semeadura das plantas foi realizada em bandejas de 200 células, contendo substrato comercial - Hortaliça CA® e fibra de coco, na proporção de 1:1, permanecendo neste recipiente até o décimo dia, as mudas foram transplantadas para vasos de 5 litros contendo areia. O espaçamento adotado em casa de vegetação foi de 0,4m entre vasos e 0,8m entre linhas. O tutoramento das plantas foi guiado verticalmente por meio do uso de fitilho. As coletas das flores masculinas em estágio de pré-antese foram iniciadas duas semanas após o início do florescimento e realizadas entre 07h00min e 09h30min.

Em capela de fluxo laminar, os botões florais foram desinfestados em solução de álcool 70% por 1 minuto, a seguir em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%) contendo duas gotas de Tween 20 por 100 mL de solução, por 10 minutos e, posteriormente, enxaguados três vezes com água destilada autoclavada, de 1 minuto cada. O procedimento de desinfestação foi realizado duas vezes. A seguir as flores foram abertas e as anteras excisadas com o auxílio de pinças e bisturis, partidas ao meio e inoculadas em tubos de ensaio com 150 x 25 mm, contendo 10 mL de meio de cultura, sendo uma antera por tubo.

O meio de cultivo básico utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (Gelzan®) a 1,8 g L⁻¹. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 121°C, por 15 minutos.

As anteras, após a inoculação *in vitro* foram submetidas a dois pré-tratamentos: manutenção em estufa B.O.D, a 32 ° C; e em geladeira a 4°C, no escuro por um período de sete dias (para a fase de indução de calos). Posteriormente, os todos os explantes foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.1.1 Fase de indução de calos

Para a fase de indução de calos foi utilizado o meio de cultivo básico MS, suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D, de acordo com o protocolo de Kurtar et al., (2016).

As culturas foram mantidas por 28 dias em sala de crescimento, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e analisado em esquema fatorial. Foram utilizadas 60 repetições, para cada tratamento, que consistiu em três variedades botânicas: *inodorus*, *cantalupensis* e *reticulatus*, dois pré-tratamentos, um a frio, e o outro a calor, dois tempos de renovação do meio de cultivo de indução que foi dividida em 14, e 28 dias, totalizando 12 tratamentos (3x2x2).

4.1.2 Fase de maturação dos calos

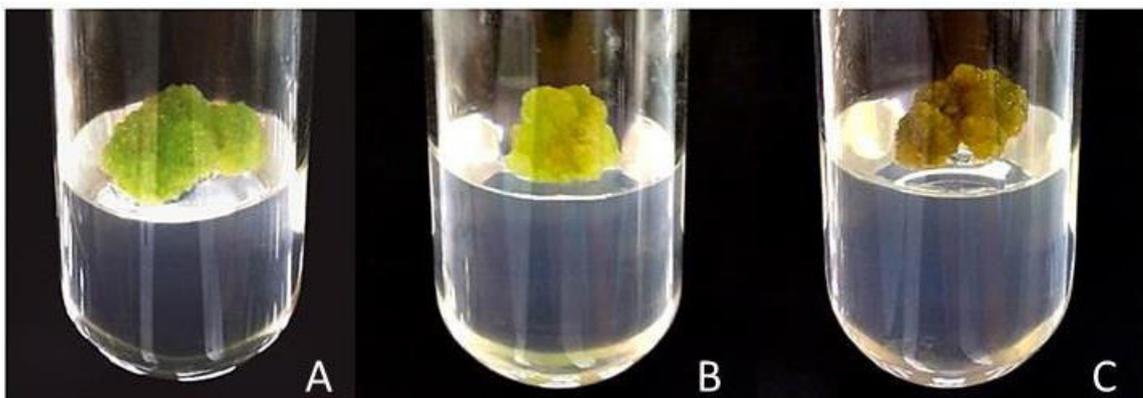
28 dias após a primeira fase, os explantes foram transferidos para o meio: MS + 2,0 mg/L de 2,4 D + 0,5 mg/L de BAP, para a maturação dos calos, de acordo com protocolo de KURTAR et al. (2016).

As culturas foram mantidas por quatro semanas em sala de crescimento, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Aos 63 dias após a instalação do experimento, foi registrado o número de anteras que desenvolveram calos, e a porcentagem de calos oxidados, tamanho e massa fresca.

No presente trabalho, os calos foram considerados oxidados quando apresentavam um amarelecimento inicial seguido de escurecimento na superfície do tecido, com posterior possibilidade de morte do explante. A avaliação foi realizada aos 48 dias de experimento. Os calos foram classificados em níveis de oxidação, de acordo com a figura 2.

Figura 2: Oxidação em calos de *Cucumis melo L.* da variedade *cantalupensis*, aos 63 dias de cultivo in vitro de anteras. A) Ausência de oxidação; B) calo parcialmente oxidado; C) calo oxidado.



Foram considerados três tamanhos diferentes para calos, a saber: pequeno (tamanho do calo \leq duas vezes o tamanho da antera), médio (duas vezes o tamanho da antera $< tc \leq$ seis vezes o tamanho da antera), grande ($tc >$ seis vezes o tamanho da antera).

Para a obtenção dos valores de massa fresca foram retirados de cada tratamento, dez repetições alatórias, onde os calos foram pesados, para posterior obtenção da média.

Os dados obtidos foram submetidos à análise univariada de Scottt knott, e as médias, dentro de cada tratamento, comparadas entre si a um nível de 5% de significância.

4.1.3 Fase de indução de embriões

Aos 63 dias após a inoculação das anteras, os calos da variedade botânica *cantalupensis* foram transferidos para o meio: MS + 4,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de ANA, para a indução de embriões, de acordo com o protocolo de KURTAR et al.(2016).

As variedades *reticulatus* e *inodorus* não foram utilizadas nesta etapa do trabalho, devido à baixa taxa de formação de calos. O número de calos obtidos foi insuficiente para a implantação desta fase do trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fase de indução de calos

Não houve formação de calos no meio de cultivo MS suplementado apenas com a 2,0 mg/L da auxina 2,4-D. O meio utilizado por Kurtar et al. (2016) diferindo do presente estudo apenas por ter sido suplementado com 120g/L de sacarose, obtiveram formação de calos de coloração amarela na fase de indução de calos, utilizando anteras de abóbora e moranga para o cultivo *in vitro*.

Contudo, Diógenes Neto (2019, no prelo), utilizando os meios de cultivo MS + 1,0 μ M de BAP + 2,0 μ M de 2,4D, contendo 30 g/L e 120 g/L de sacarose, para indução de calos em anteras de meloeiro das variedades *reticulatus*, *cantalupensis*, e *inodorus*, concluiu que o meio contendo 30 g/L de sacarose mostrou-se o mais adequado no que concerne ao tamanho e peso dos calos formados.

Outro fator importante para a indução de calos é a combinação de reguladores de crescimento no meio de cultivo. O 2,4-D é a auxina mais empregada nos processos de calogênese. Tal uso está relacionado com o papel deste regulador de crescimento na célula, pois ele estimula o início da divisão e atua controlando o crescimento celular. (GEORGE, 1996). Assim, sob ação do 2,4-D, as células do explante passam pelo processo de desdiferenciação, seguido de divisão (GEORGE et al., 2008).

Kurtar et al. (2016) obtiveram resultados positivos para a calogênese suplementando o meio MS com apenas 2,4 D. Já Kouakou et al. (2015) constataram que a indução de calos na cucurbitácea *L. siceraria* foi melhorada com a adição dos aminoácidos: arginina, glutamina, glicina, e da citocinina BAP ao meio de indução. Abdollahi et al. (2015) relataram o efeito da combinação do 2,4-D com BAP em anteras da cultivar Charleston Gray de melancia, sendo o mesmo positivo com respostas de 75% a 88% de indução de calos.

As citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (GEORGE et al., 2008b; PIERIK, 1990). As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

O uso do choque térmico no escuro como pré-tratamento para a indução de calos, é mencionado em diversos trabalhos. Kumar et al.(2003) testaram em anteras de duas cultivares de pepino, tanto o tratamento com frio (4°C) quanto com choque térmico (32°C), concluindo que um choque a frio durante 2 dias foi benéfico, pois aumentou

significativamente a produção de embriões, contudo, em ambas as cultivares, o choque frio prolongado diminuiu drasticamente o potencial embriogênico das anteras, e o pré-tratamento térmico dos botões florais à 32°C durante 1 dia não foi benéfico em ambas as cultivares.

Kurtar et al. (2016) incubaram as anteras das abóboras (*Cucurbita maxima* Duch e *Cucurbita moschata* Duch) a 32°C durante 1 semana no escuro, havendo a formação de calos para as anteras submetidas a este tratamento já na fase de indução de calos, oposto ao registrado no presente trabalho, onde os mesmos resultados só foram alcançados na fase de maturação de calos para as variedades *reticulatus*, *cantalupensis*, e *inodorus* de meloeiro. Tal fato pode ser relacionado pelo ciclo do melão ser mais curto que o do abóbora, e portanto, precisar de uma duração menor de choque térmico aliado ao escuro. Segundo Dong et al. (2016), o período adequado para o estresse, difere entre as mais diversas cucurbitáceas. A temperatura e o tempo de exposição ideais do pré-tratamento são informações fundamentais, e que variam de espécie para espécie.

A aplicação de pré-tratamento com estresse térmico, tem sido um fator essencial para aumentar a eficiência da androgênese em diferentes espécies (TOURAEV et al., 1997; IMMONEN E ROBINSON, 2000; PECHAN E SMYKAL, 2001). O estresse, particularmente o pré-tratamento a frio e a quente, tem sido usado para induzir a embriogênese de anteras isoladas, uma vez que rompe o citoesqueleto em micrósporos (FERRIE et al., 1995). Aliado a isso, a manutenção dos explantes no escuro na fase inicial, aumentou a produção de calos (JARAMILLO; SUMMERS, 1991).

5.2 Fase de maturação de calos

Duas semanas após a transferência das anteras do meio de cultivo de indução para o de maturação, foi possível observar a formação de calos. A variedade *cantalupensis* apresentou a maior taxa de calogênese (Tabela 1). Tal variação pode ser explicada pela influência direta que o genótipo exerce na androgênese, em cucurbitáceas (DONG et al., 2016). Corroborando com os resultados obtidos por Kurtar et al. (2016), onde as variedades 57Sİ21 de abóbora (*Cucurbita maxima* Duch), e G9 de *Cucurbita moschata* Duch se mostraram superiores para formação de calos do que as demais variedades estudadas. Kumar et al. (2003), trabalhando com pepino também constataram diferenças entre as cultivares, *Calypson* e *Green Long*, para a resposta das anteras à indução de calos.

Segundo Parrot et al. (1991), o genótipo das plantas é um dos fatores que mais influencia a indução embriogênica, uma vez que, genótipos específicos dentro da mesma

espécie variam muito no que se refere à capacidade embriogênica, de tal forma que podem refletir diferenças correntes na aptidão de ativar elementos-chave para o desenvolvimento desta via morfogênica.

Outra razão que possa explicar a formação majoritária de calos na variedade *cantalupensis*, e minoritária nas variedades *reticulatus* e *inodorus*, seria o estágio de desenvolvimento do grão de pólen. De acordo com Paiva & Paiva (2001), o micrósporo no estágio uninucleado é o mais adequado (antes ou logo após a antese) para o cultivo in vitro de anteras, havendo correlação entre o tamanho do botão floral masculino e o estágio do desenvolvimento do pólen.

Tabela 1. Porcentagem de oxidação, e formação de calos em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), submetidas a dois pré-tratamentos, e renovação do meio de cultivo aos 48 dias do cultivo in vitro das anteras.

Variáveis	Calos	
	Formação (%)	Oxidação ¹
Variedade botânica		
<i>Cantalupensis</i>	80,36	1,05
<i>Inodorus</i>	12,83	1,00
<i>Reticulatus</i>	4,55	1,00
Pré-tratamento		
Frio	27,90	1,04
Quente	32,85	1,04
Renovação do meio de cultivo aos 14 dias		
Sim	39,39	1,02
Não	22,15	1,08
Média	31,43	1,04

¹/Oxidação: 1- ausência; 2- parcialmente oxidado; e, 3- oxidado.

O pré-tratamento a quente se mostrou mais eficaz em termos de formação de calos (Tabela 1), quando comparado com o percentual do pré-tratamento a frio. Rakha et al.(2012) submeteram anteras resultantes da hibridação entre variedades cultivadas de *Cucurbita pepo* L. a 35°C no escuro durante uma semana, obtendo resultados positivos para a calogênese.

Song et at. (2007) ponderam que a resposta ao estresse adequado de temperatura e luminosidade, depende do ecótipo da planta - por exemplo, pepinos cultivados em áreas de clima com temperaturas baixas respondem bem ao pré-tratamento a frio, enquanto aqueles cultivados em ambientes quentes respondem melhor ao pré-tratamento em temperaturas mais altas. O que é similar aos resultados encontrados, onde as variedades estudadas são adaptadas ao clima tropical, sendo mais cultivadas no semi-árido do nordeste brasileiro.

Foi constatado que a renovação do meio de cultivo aos 14 dias foi positiva para a formação de calos (Tabela 1), Lemos et al. (2002) ao trabalharem com cana de açúcar em condições padrões de cultivo, notaram que as plantas cresceram rapidamente e consumiram a

maior parte dos nutrientes do meio em quatro semanas, sendo necessária a renovação. Kurtar et al., (2016) renovaram os meios por três vezes em intervalos de 7 dias para manter a formação de calos esverdeada e estimular a iniciação a regeneração das plantas.

Verificaram-se no presente trabalho níveis baixos de oxidação nos explantes (Tabela 1), não comprometendo assim a condução do experimento. A reação de oxidação é indesejável para a cultura de tecidos uma vez que é, desencadeada no processo de injúria dos tecidos (corte), causando a liberação e a oxidação de compostos fenólicos que provocam um escurecimento no tecido do explante, inibindo o seu crescimento (MELO et al., 2001).

Para a classificação do tamanho dos calos, eles foram comparados com relação ao tamanho das anteras (Figura 2). Houve diferença significativa para tamanho dos calos entre as variedades *cantalupensis* e *reticulatus* (Tabela 2). A variedade *cantalupensis* foi a mais eficiente, sendo os calos maiores quando se utilizou o pré-tratamento quente, e havendo a renovação do meio. Na Tabela 3, a variedade *cantalupensis*, corroborando com os resultados apresentados anteriormente, se mostrou a mais satisfatória em termos de massa fresca de calo, sob a influência do pré-tratamento à quente, e da renovação do meio de cultivo aos 14 dias.

Tabela 2. Tamanho dos calos de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), sob influência de pré-tratamentos e renovação do meio de cultivo aos 48 dias de cultivo *in vitro* das anteras.

Tratamentos ¹	Variedades botânicas					
	<i>Cantalupensis</i>		<i>Inodorus</i>		<i>Reticulatus</i>	
Pré-tratamento						
Frio	1,36	aB	1,00	bA	1,00	bB
Quente	1,87	aA	1,00	bA	1,40	bA
Renovação do meio de cultivo aos 14 dias						
Sim	1,80	aA	1,00	bA	1,25	aA
Não	1,38	aB	1,00	aA	1,00	aA
Média	1,61		1,00		1,22	

¹Tamanho dos calos: pequeno (tamanho do calo \leq duas vezes o tamanho da antera), médio (duas vezes o tamanho da antera $< tc \leq$ seis vezes o tamanho da antera), grande ($tc >$ seis vezes o tamanho da antera).

²Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância.

Não houve interferência para *reticulatus* no que concerne ao tamanho (Tabela 02) dos calos sob a influência dos pré-tratamentos a calor e a frio, contudo, a variedade foi satisfatória para a renovação do meio de cultivo aos 14 dias (Tabela 02). Para a variedade *inodorus* não houve diferença significativa no que se refere ao tamanho e massa fresca dos calos (Tabelas 2, e 3, respectivamente), isto é, não houve influência dos choques térmicos a

quente e a frio, e não houve influência quanto à renovação do meio de cultivo para o tamanho, e massa fresca dos calos nessa variedade.

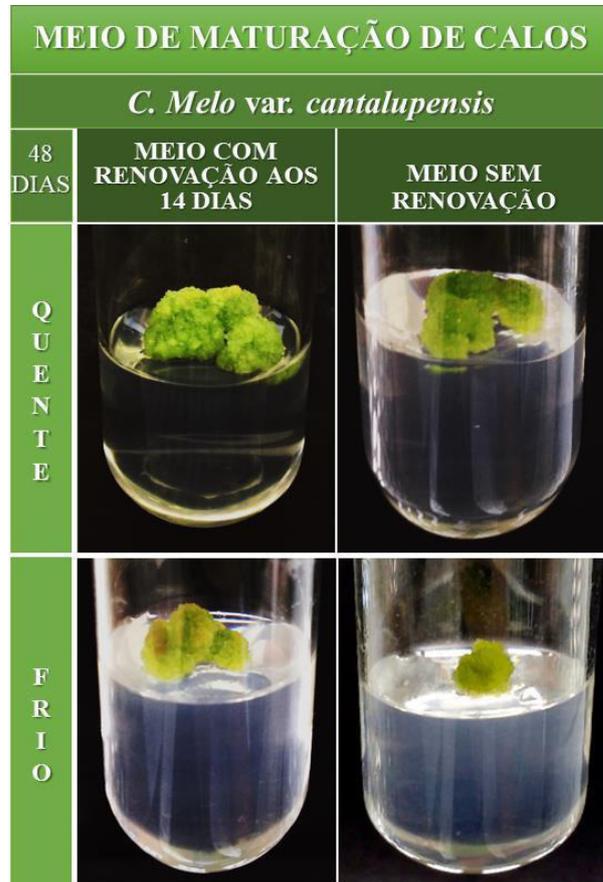
Tabela 3. Massa fresca dos calos de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), sob influência de pré-tratamentos e renovação do meio de cultivo aos 48 dias de cultivo *in vitro* das anteras.

Tratamentos	Variedades botânicas					
	<i>Cantalupensis</i>		<i>Inodorus</i>		<i>Reticulatus</i>	
Pré-tratamento						
Frio	76,92	aB	25,00	aA	19,24	aA
Quente	201,14	aA	31,70	bA	34,52	bA
Renovação do meio de cultivo aos 14 dias						
Sim	175,00	aA	30,97	bA	33,98	bA
Não	78,54	aB	25,72	aA	19,79	aA
Média	132,13		28,35		26,88	

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

A utilização do pré-tratamento no escuro por uma semana à 32°C aliada a renovação do meio de cultivo aos 14 dias, foi mais eficiente para formação, tamanho e massa fresca dos calos na variedade *cantalupensis* de *Cucumis melo* L. Para a variedade *reticulatus* exclusivamente em tamanho de calos, houve maior eficiência quando foi submetida à renovação do meio de cultivo aos 14 dias. A variedade *inodorus* não respondeu a nenhum dos tratamentos.

Figura 3: Calos na variedade *cantalupensis*, sob a influência na renovação do meio de cultivo, e choque térmico à quente e à frio, aos 63 dias de cultivo *in vitro* de anteras de meloeiro (*Cucumis melo* L.).



5.2 Fase de indução de embriões

Após quatro semanas no meio de maturação, os calos obtidos da variedade botânica *cantalupensis* foram transferidos para o meio de indução de embriões. Aos 18 dias, ainda não foram obtidas respostas para esse meio.

6. CONCLUSÃO

A resposta à calogênese é genótipo dependente, sendo *cantalupensis* a variedade botânica de meloeiro que apresentou maior percentual de formação, tamanho, e massa fresca de calos.

A porcentagem de formação de calos nas anteras das variedades *reticulatus* e *inodorus* foi baixa, na fase de indução de calos, no meio de cultivo MS, suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D.

As respostas das anteras ao pré-tratamento no escuro com temperatura a 32 °C e uso dos reguladores 2,4-D com BAP dependem do genótipo, sendo *cantalupensis* a variedade estudada mais eficiente na formação de calos.

A renovação do meio de cultivo foi positiva para tamanho de calos nas variedades *cantalupensis* e *reticulatus*; e apenas para massa fresca dos calos, em *cantalupensis*.

Os tratamentos de choque térmico, aliados a renovação ou não do meio de cultivo, não são apropriados para induzir a regeneração de parte aérea, a partir dos calos das três variedades botânicas estudadas.

Os meios de cultivo testados não foram eficazes para obtenção de plantas haploides para a variedade *cantalupensis* de meloeiro a partir de calos de anteras.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. R.; HOSKING, B.; RAVINDRAN, V., 2015. **Nutrient analysis, metabolisable energy and ileal amino acid digestibility of palm kernel meal for broilers.** Anim. Feed. Sci. Technol., 206: 119-125.
- ABDOLLAHI, M., R.; NAJAFI, S.; SARIKHANI, H.; MOOSAVI, S. S. **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.
- ALVES, D. F.; ALENCAR, M. O.; JUSTO, W. R.; JÚNIOR, F. L. A relevância da produção de melão na economia do nordeste. Acesso em: 14 de maio 2019.
- ASHOK KUMAR H.G.; MURTHY H.N.; PAEK K.Y. **Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L.** Scientia Horticulturae. 98:213-222. 2003.
- 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, vol. 2013, Article ID 529502, 7 pages, 2013.
- BAKTEMUR, G.; YÜCEL, N.K.; TAŞKIN, H.; ÇÖMLEKÇİOĞLU, S.; BÜYÜKALACA, S. **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.
- BORÉM, A.; MIRANDA, V. G. **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV, 2013, 6ª ed.
- BRITO, E. S. Avaliação da capacidade antioxidante de variedades de melão (*Cucumis melo* L.) comercializadas no Brasil e determinação do teor de glutathiona reduzida (GSH). 2017. 1 recurso online (130 p.). **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/330677>>. Acesso em: 14 maio 2019.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, p. 87-132, 1998.
- CANHOTO, J. M. **Biotechnology vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética.** ed. Universidade de Coimbra, 407p. 2010.
- CARVALHO, J. M. F. C; VIDAL, M. S. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** Campina Grande, PB: Embrapa algodão. 39p –Documentos/Embrapa Algodão, ISSN 0103 - 0205; Documentos, 116. 2003.
- DONG, Y.Q., ZHAO, W.X., LI, X.H., LIU, X.C., GAO, N.N., HUANG, J.H., WANG, W.Y.; XU, X.L.; TANG, Z.H. **Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in**

cucurbit species. Plant Cell Reports, 35(10), 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>, 2016.

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.

FAO. Faostat – Statistics Database. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#home> > Acesso em 05 de maio de 2019.

FERRIE, A.M.R.; PALMER, C.E.; KELLER, W.A. Haploid embryogenesis. In: THORPE, T.A., ed. ***In vitro* embryogenesis in plants.** v. 20. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 309–344, 1995.

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.

GEIGER, H.H.; GORDILLO, G.A. **Doubled haploids in hybrid maize breeding.** Maydica, v.54, p. 485-499, 2009.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology.** Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. **Plant propagation by tissue culture, 3rded.** Dordrecht: The Background, 2008. V. 1,501 p.
Germanà, M. A. (2010). **Anther culture for haploid and doubled haploid production.** **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 104(3), 283–300. doi:10.1007/s11240-010-9852-z

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., CLAVERIA, E., MONFORTE, A. J., & DOLCET-SANJUAN, R. (2011). **Parthenogenic Haploids in Melon: Generation and Molecular Characterization of a Doubled Haploid Line Population,** Journal of the American Society for Horticultural Science J. Amer. Soc. Hort. Sci., 136(2), 145-154. Disponível em: <<https://journals.ashs.org/view/journals/jashs/136/2/article-p145.xml>> . Acesso em: 21 maio 2019

GUHA, S., & MAHESHWARI, S. C. (1964). **In vitro Production of Embryos from Anthers of Datura.** Nature, 204(4957), 497–497. doi:10.1038/204497a0.

GUHA, S., & MAHESHWARI, S. C. (1966). **Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of Datura in vitro.** Nature, 212(5057), 97–98. doi:10.1038/212097a0.

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>
IMMONEN, S.; ROBISON, J. **Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture**. *Plant Science*, v.150, p.77-84, 2000.

ISHII, T., KARIMI-ASHTIYANI, R., & HOUBEN, A. (2016). **Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms**. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 421–438. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114714

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

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., & BOHANEC, 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.

KURTAR ES, SARIN, ABAK K (2002). **Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.)**. *Euphytica* 127:335–344. DOI:10.1023/a:1020343900419.

KURTAR ES, BALKAYA A, OZBAKIR M, OFLUOGLU T (2009) **Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir)**. *Afr J Bio* 8:5944–5951

KURTAR ES, BALKAYA A (2010) **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 Organ Cult* 102:267–277

KURTAR, E. S., BALKAYA, A., & KANDEMIR, D. (2016). **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)*, 127(2), 497–511. doi:10.1007/s11240-016-1074-6

LI, J.W.; SI, S.W.; CHENG, J.Y.; LI, J.X.; LIU, J.Q. **Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus***. *Biologia Plantarum* 57 (1): 164-168, 2013.

LEMOS E. E. P.; FERREIRA M. S.; ALENCAR L. M. C.; RAMALHO NETO C. E.; ALBUQUERQUE MM. 2002. **Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar**. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37: 1359-1364.

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). 2003.

MALIK, A.A.; CUI, L.; ZHANG, S.; CHEN, J. **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.

MELO, B; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (MART.)BECC.]. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, Nov/Dez., 2001.

MENEZES, J. B.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MAIA, C. E.; ANDRADE, C. E.; ANDRADE, G. G. de; ALMEIDA, J. H. S. de; VIANA, F. M. P. **Características do melão para exportação**. In: ALVES, R. E. (Org.). **Melão: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, (Frutas do Brasil, 10), 2000.

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 02 de maio de 2019.

MURASHIGE T, SKOOG F. **A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture**. *Physiol. Plant*, 15: 473-497. 1962.

OLIVEIRA, F. I. C. de; NUNES, A. C.; SILVA, F. D.; SILVA, G. T. M. A.; ARAGAO, F. A. S. de. A cultura do melão. In: FIGUEIRÊDO, M. C. B. de; GONDIM, R. S.; ARAGÃO, F. A. S. de (Ed.). **Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. Brasília, p. 19, 2007.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos Textos acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.

PARROTT WA, MERKLE SA, WILLIAMS EG (1991) Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. In: **Murray DR (ed) Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. CAB Int, Wallingford, UK, pp 158–200

PECHAN, P.M.; SMYKAL, P. 2001. **Androgenesis: affecting the fate of the male gametophyte**. *Physiol. Plant*. 111: 1-8.

PERPIÑÁ, G., ESTERAS, C., GIBON, Y., MONFORTE, A. J., & PICÓ, B. (2016). **A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits**. *BMC Plant Biology*, 16(1).doi:10.1186/s12870-016-0842-0

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

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 2000. Acta Horticulturae. 510:29–36, 2000.

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.

PLAPUNG, P.; KHAMSUKDEE, S.; POTAPOHN, N.; SMITAMANA, P. **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

ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS, D.S. Cucurbits. CAB International, Oxon (GB). 1997.

RAO, P. S.; SUPRASANA, P. Methods to double haploid chromosome numbers. In: JAIN, S. M.; SOPORY, S. K.; VEILLEUX, R. E. (Coord.). *In vitro* haploid production in higher plants. London: Editora Kluwer Academic Publishers, 1996, p. 317-339. Volume I

RAKHA MT, METWALLY EI, MOUSTAFA SA, ETMAN AA, DEWIR YH (2012) **Evaluation of regenerated strains from six Cucurbita interspecific hybrids obtained through anther and ovule *in vitro* cultures**. Aust J Crop Sci 6(1):23–30

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.

SONG H, LOU QF, LUO XD, WOLUKAU J, DIAO WP, QIAN CT, CHEN JF (2007) **Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.)**. Plant Cell Tissue Organ Cult 90:245–254

SILVA, H. A. **Indução de haploidia e eficiência de técnicas aplicadas na obtenção de duplohaploides em milho**. 2016. 141p Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, 2016.

SUPRUNOVA, T.; SHMYKOVA, N. ***In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus***. IN: Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), p. 371-374, 2008.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÀ, F. G. de; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 128p, 2000.

TOURAEV, A.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. **Initiation of microspore embryogenesis by stress**. Trends in Plant Science, v.2, p.297-302, 1997.

USMAN, M.; BAKHSH, K.; FATIMA, B.; ZAMAN, Q.; SHAH, M.H. **Exploring embryogenic competence in anthers of bitter melon (*Momordica charantia* L.) cultivar faisalabad long**. The Journal of Animal & Plant Sciences, 25(1), p.181-188 ISSN: 1018-7081, 2015.

VALADARES, RN; MELO, RA; SILVA, JAS; ARAÚJO, ALR; SILVA, FS; CARVALHO FILHO, JLS; MENEZES, D. 2017. **Estimativas de parâmetros genéticos e correlações em acessos de melão do grupo momordica**. Horticultura Brasileira 35: 557-563.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620170413>

VARGAS PF; CASTOLDI R; CHARLO HCO; BRAZ LT. 2008. **Qualidade de melão rendilhado (*Cucumis melo* L.) em função do sistema de cultivo**. Ciência Agrotecnologia 32: 137-142.

VIŽINTIN, L.; BOHANEK, B. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, v. 46, p. 177–183, 2004

WĘDZONY, M.; FORSTER, B.P.; ZUR, I.; GOLEMIC, E.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; DUBAS, E.; GOTEOBIOWSKA, G. **Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants**. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (eds) Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_1, 2. 2009.

YASIR, M., IMRAN, R., IRSHAD, M., MOHAMAD, N., & KHAN, M. (2016). **Leadership Styles in Relation to Employees' Trust and Organizational Change Capacity: Evidence from Non-Profit Organizations**. SAGE Open, 6(4), 1-12.