



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALEXYA VITORIA FELIX CARVALHO

CULTIVO *IN VITRO* DE ÓVULOS DE MELOEIRO

FORTALEZA

2018

ALEXYA VITORIA FELIX CARVALHO

CULTIVO *IN VITRO* DE ÓVULOS DE MELOEIRO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Izabel Gallão.
Coorientadora: Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.

FORTALEZA

2018

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

C321c Carvalho, Alexya Vitória Felix.
Cultivo in vitro de óvulos de meloeiro / Alexya Vitória Felix Carvalho. – 2018.
37 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Maria Izabel Gallão.

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

1. Cucumis melo L.. 2. Ginogênese. 3. Linhagem pura. I. Título.

CDD 570

ALEXYA VITORIA FELIX CARVALHO

CULTIVO *IN VITRO* DE ÓVULOS DE MELOEIRO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria Izabel Gallão (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, Luciana e Bruno.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido pela bolsa de iniciação científica.

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

À Universidade Federal do Ceará por me proporcionar a oportunidade de cursar Ciências Biológicas, e aos excelentes professores que foram fundamentais para a minha formação acadêmica.

À Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, por todos os ensinamentos desde o início da minha graduação, incentivos e por ser muito mais do que uma orientadora.

À professora Maria Izabel Gallão, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pela grande contribuição na realização deste trabalho.

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

Ao Dr. Frederico Inácio Costa de Oliveira, pela parceria nos últimos anos, por todos os ensinamentos, pela paciência e por tornar o ambiente de trabalho mais divertido.

Aos colegas dos laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais (Embrapa) e Biologia Celular Vegetal (UFC), muito obrigada por toda ajuda.

À minha mãe, Francisca Luciana Felix, por todo o amor, cuidado e dedicação.

Ao meu pai, Alex Bruno de Sousa Carvalho, pela confiança e incentivo.

Aos meus amigos, pelo companheirismo. A vida é mais leve graças a vocês.

Por fim, manifesto a minha gratidão à Deus, que me deu forças e acalmou o meu coração nos momentos mais difíceis.

RESUMO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça de grande importância econômica mundial. A produção de dihaploides é uma alternativa promissora para reduzir o tempo de obtenção de linhagens homozigotas. No entanto, em meloeiro, a eficiência desse método é baixa, principalmente na etapa de regeneração das plantas haploides. A cultura *in vitro* de óvulos é uma via para a obtenção desses haploides. Portanto, objetivou-se com este trabalho a obtenção de plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de óvulos. Óvulos das variedades botânicas: *inodorus*; *cantalupensis* e *reticulatus*, foram excisados de flores com ovários não polinizados, colhidas um dia antes da antese, a partir de plantas mantidas em casa de vegetação. Na etapa de calogênese, os óvulos foram colocados em meio MS + 1,0 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,0 µM de ácido naftalenoacético (ANA), por oito semanas, a 25 ± 1 °C, inicialmente no escuro por uma semana e posteriormente no claro, sob fotoperíodo de 16 horas de luz. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo cada variedade botânica um tratamento, com 15 repetições de 10 tubos de ensaio (contendo dois óvulos cada). Aos 60 dias, foi avaliada a indução de calos nos explantes. Para regeneração de parte aérea, os calos das variedades *inodorus* e *cantalupensis* foram transferidos para o meio MS + BAP, nas concentrações: 0,0; 2,22, 4,44, 6,66 e 8,88 µM, por 60 dias, a 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5, sendo duas variedades botânicas e cinco meios de cultivo, com 10 repetições de cinco tubos cada (um calo por tubo). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nos estudos histológicos, os calos formados a partir do cultivo *in vitro* de óvulos foram fixadas em solução de Karnovsky aos dias 0, 30 e 60 após a inoculação em meio para a indução a calogênese e aos 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação em meios para a regeneração de parte aérea. Houve diferença significativa para a média de formação de calos nas três variedades botânicas estudadas. A variedade *inodorus* foi a mais eficiente, produzindo calos em 60,65% dos óvulos avaliados, diferindo estatisticamente das variedades *cantalupensis* (37,65%) e *reticulatus* (18,65%). Já na fase de regeneração de parte aérea, não houve formação de gemas nos meios testados para as duas variedades. As análises histológicas mostraram presença de amido e formação de vasos condutores, principalmente nos calos submetidos aos meios para regeneração de parte aérea. Portanto, o protocolo utilizado não foi eficiente para obtenção de plantas haploides das três variedades de meloeiro estudadas.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L. Ginogênese. Linhagem pura.

ABSTRACT

The melon (*Cucumis melo* L.) is a vegetable of worldwide economic importance. The production of dihaploids is a promising alternative to reduce the time to obtain homozygous strains. However, in melon, the efficiency of this method is low, mainly in the stage of regeneration of haploid plants. The *in vitro* culture of ovules is a way to obtain these haploids. Therefore, the objective of this work was to obtain melon haploid plants by *in vitro* ovule culture. Ovules of botanical varieties: *inodorus*, *cantalupensis* and *reticulatus*, were excised from flowers with unpollinated ovaries, harvested one day before anthesis, from plants kept in a greenhouse. In the calogenesis step, the ovules were placed in MS + 1.0 μ M 6-benzylaminopurine (BAP) and 2.0 μ M naphthaleneacetic acid (NAA) for eight weeks at 25 ± 1 ° C, initially in the dark for one week and later in the clear, under photoperiod of 16 hours of light. The design was completely randomized, with each botanical variety being treated with 15 replicates of 10 test tubes (containing two eggs each). At 60 days, callus induction was evaluated in the explants. For aerial part regeneration, calli *inodorus* and *cantalupensis* were transferred to the MS + BAP medium at concentrations of: 0.00, 2.22, 4.44, 6.66 and 8.88 μ M for 60 days at 25 ± 1 ° C, under a photoperiod of 16 hours of light. The experimental design was completely randomized, in a 2x5 factorial scheme, with two botanical varieties and five culture media, with 10 replicates of five tubes each (one callus per tube). The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test at 5% probability. In the histological studies, calli formed from *in vitro* egg culture were fixed in Karnovsky's solution at days 0, 30 and 60 after inoculation in medium for the induction of calogenesis and at 15, 30, 45 and 60 days after inoculation in means for aerial part regeneration. There was a significant difference for the average callus formation in the three botanical varieties studied. The *inodorus* variety was the most efficient, producing calluses in 60.65% of the evaluated ovules, differing statistically from the *cantalupensis* (37.65%) and *reticulatus* (18.65%) varieties. In the aerial part regeneration phase, there was no bud formation in the media tested for the two varieties. Histological analysis showed presence of starch and formation of conducting vessels, mainly in the callus submitted to the means for aerial part regeneration. Therefore, the protocol used was not efficient to obtain haploid plants of the three varieties of melon studied.

Keywords: *Cucumis melo* L. Gynogenesis. Pure lines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Tipos comerciais de melão (*Cucumis melo* L.). Fonte: ARAGÃO (2011) ... 18
- Figura 2 - A) Flor feminina de meloeiro (*Cucumis melo* L.) da variedade botânica *cantalupensis*, com ovário não polinizado um dia antes da antese. B) Flor em corte longitudinal visualizada em microscópio estereoscópio. C) Óvulos retirados do ovário. D) Detalhe do óvulo (explante). Barra: A e B: 5 mm, C e D: 1 mm..... 22
- Figura 3 - Calos obtidos a partir de óvulos de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0 µM de BAP + 2,0 µM de ANA. A) *inodorus* B) *cantalupensis* e C) *reticulatus*. Barra: 10 mm..... 25
- Figura 4 - Corte histológico de segmento de ovário de meloeiro (*Cucumis melo* L.), evidenciando os óvulos imaturos, antes da indução a calogênese *in vitro* na variedade botânica *reticulatus* sob microscopia de luz..... 26
- Figura 5 - Calos das variedades botânicas *inodorus* e *cantalupensis* após 60 dias de cultivo em meios para regeneração de parte aérea. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 µM de BAP; T3) MS + 4,44 µM de BAP; T4) MS + 6,66 µM de BAP; T5) MS + 8,88 µM de BAP..... 27
- Figura 6 - Óvulos excisados de ovários não fecundados, um dia antes da antese, de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.): A) e D) *cantalupensis*; B) e E) *inodorus*; C) e F) *reticulatus*, antes da indução a formação de calos sob microscopia de luz. Am: amido..... 29
- Figura 7 - Calos formados em óvulos (7A; 7B e 7C) e 60 dias (7D, 7E e 7F) de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.): A) e D) *cantalupensis*; B) e E) *inodorus*; C) e F) *reticulatus*, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob microscopia de luz. Vc: vasos condutores..... 30
- Figura 8 - Calos formados aos 30 dias (8A; 8B; 8C; 8D e 8E) e aos 60 dias (8F; 8G; 8H; 8I e 8J) na variedade botânica *cantalupensis* de meloeiro (*Cucumis melo* L.) em meios para regeneração de parte aérea, sob microscopia de luz. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 µM de BAP;

T3) MS + 4,44 μ M de BAP; T4) MS + 6,66 μ M de BAP; T5) MS + 8,88 μ M de BAP. Vc: vasos condutores..... 31

Figura 9 - Calos formados aos 30 dias (8A; 8B; 8C; 8D e 8E) e aos 60 dias (8F; 8G; 8H; 8I e 8J) na variedade botânica *inodorus* de meloeiro (*Cucumis melo* L.) em meios para regeneração de parte aérea, sob microscopia de luz. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μ M de BAP; T3) MS + 4,44 μ M de BAP; T4) MS + 6,66 μ M de BAP; T5) MS + 8,88 μ M de BAP. Vc: vasos condutores..... 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de indução de calogênese (IC) em três variedades botânicas de meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L.), após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS adicionado de 1,0 µM de BAP + 2,0 µM de ANA.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
ANA	Ácido naftalenoacético
AT	Azul de toluidina
BAP	6-benzilaminopurina
cv.	Cultivar
FAO	Faostat – Statistics Database
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MO	Microscopia óptica
MS	Meio Murashige & Skoog
PAS	Reação do ácido periódico-Schiff

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1 O meloeiro.....	14
3.1.1 Aspectos Botânicos.....	14
3.1.2 Aspectos econômicos.....	15
3.2 Melhoramento genético.....	16
3.3 Técnica de dihaploidização.....	16
3.3.1 Importância.....	16
3.3.2 Métodos de obtenção de plantas haploides.....	17
3.4 Cultura de tecidos vegetais.....	17
3.4.1 Importância.....	17
3.4.2 Ginogênese in vitro em meloeiro.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	20
4.1.1 Fase de indução de calos.....	21
4.1.2 Fase de regeneração de parte aérea.....	21
4.2 Microscopia óptica (MO).....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Indução de calos.....	23
5.2 Regeneração de parte aérea.....	24
5.3 Microscopia óptica.....	26
6 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

A família Cucurbitaceae inclui diversas espécies de grande valor econômico, dentre essas, o meloeiro (*Cucumis melo* L.). É uma das hortaliças de grande relevância mundial, atingindo, em 2016, uma produção superior a 31 milhões de toneladas, em mais de 1,24 milhões de hectares colhidos (FAO, 2018). Nesse ano, o Brasil ocupou a 11ª posição, contribuindo com apenas 2% da produção mundial. Em 2017, a produção brasileira atingiu mais de 540 mil toneladas do fruto, em uma área de 23 mil ha colhidos. A região Nordeste contribuiu com mais de 95% da produção nacional, com destaque para os Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte, representando 79,6 % do percentual regional (IBGE, 2018).

Segundo a classificação taxonômica, a espécie *Cucumis melo* foi dividida em dezesseis variedades botânicas (PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; PITRAT, 2008), sendo que grande parte dos genótipos produzidos comercialmente no país, atualmente, pertence apenas a três variedades botânicas: *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin; *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin e *Cucumis melo* var. *reticulatus* Seringe.

Cultivares comerciais de meloeiro são, em sua maioria, híbridos F₁. Para que a produção desses genótipos seja bem sucedida, os parentais devem possuir alto grau de homozigose (linhas puras) (YASHIRO *et al.*, 2002). No entanto, 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% homozigotos, mesmo após esses sucessivos avanços nas gerações (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013).

Uma alternativa para contornar esse entrave é a obtenção de dihaploides, na qual dois passos principais devem ser considerados: a indução do desenvolvimento de haploides (monoploides) e a posterior duplicação dos cromossomos desses indivíduos haploides (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008). A probabilidade de plantas haploides serem geradas *in vivo* sem que ocorra fusão dos gametas é muito baixa, variando de acordo com a espécie. Em meloeiro, a taxa varia em torno de 2% (LOFTI *et al.*, 2003). Entretanto, *in vitro* é possível obter linhas puras (completamente homozigotas) em um ano e depois proceder a duplicação de seu número cromossômico com uso de colchicina (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013).

Porém, para a aplicação dessas tecnologias, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos eficientes de regeneração de plantas, por meio da cultura de

tecidos (DANG; WEI, 2009).

Desse modo, a cultura *in vitro* de óvulos é uma das alternativas para a obtenção de plantas de meloeiro haploides. Linhagens de dihaploides produzidas a partir da cultura de óvulos são obtidas em menor tempo e apresentam maior variabilidade do que as obtidas pela autopolinização (PLAPUNG, 2014). Diante disso, o objetivo deste trabalho é a obtenção de plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de óvulos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de óvulos.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a indução de calos em óvulos de três variedades botânicas de meloeiro.
2. Testar diferentes concentrações de BAP na regeneração *in vitro* de parte aérea em calos obtidos a partir do cultivo de óvulos de meloeiro.
3. Caracterizar o desenvolvimento dos calos a partir do cultivo *in vitro* de óvulos de meloeiro, por meio de análises histológicas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O meloeiro

3.1.1 Aspectos Botânicos

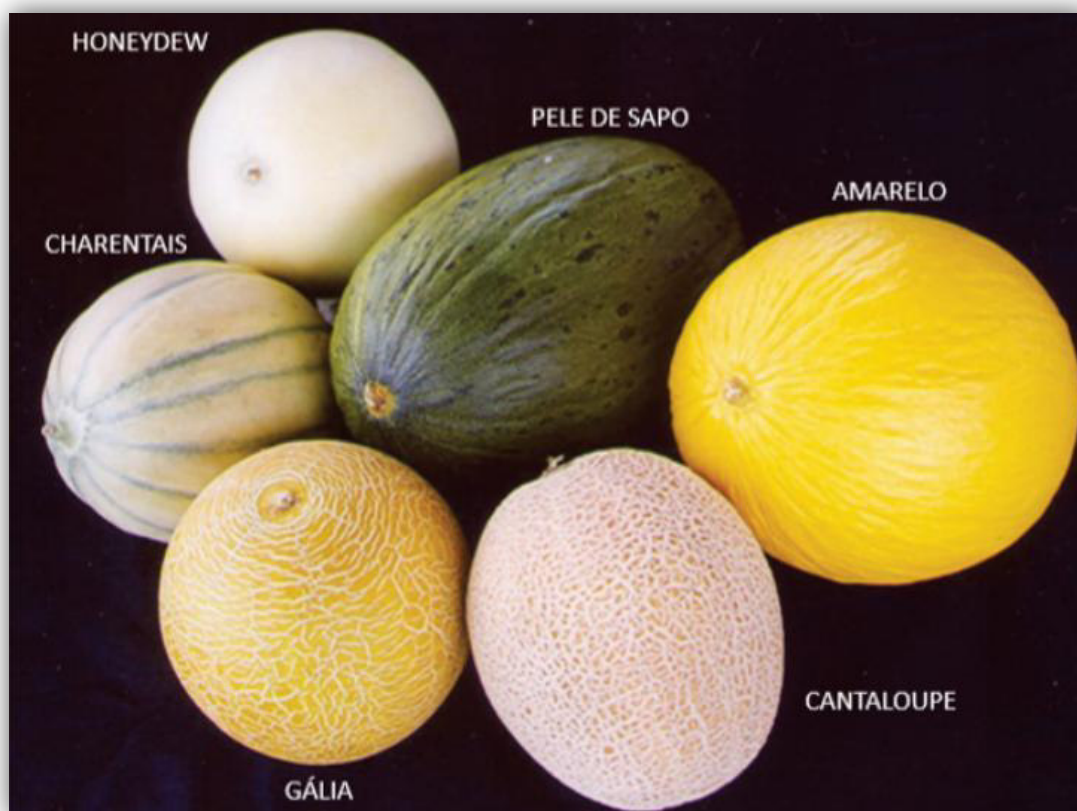
A família Cucurbitaceae inclui diversas hortaliças de grande valor econômico, como pepino (*Cucumis sativus* var. *Sativus* L.), melão (*Cucumis melo* L.), abóbora (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), moranga (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) e outras espécies, cultivadas em todo o mundo (DONG *et al.*, 2016). Dentre essas, o melão destaca-se como uma das principais cucurbitáceas de importância econômica cultivadas no Brasil (LOPES; CARVALHO; PESSOAL, 2003).

De acordo com a classificação taxonômica, a espécie *Cucumis melo* L. foi dividida em dezesseis variedades botânicas, seis pertencentes à subsp. *agrestis* (*conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *momordica*, *tibish* e *acidulus*) e 10 à subsp. *melo* (*cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chafe*, *dudaim* e *chito*) (PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; PITRAT, 2013). A maior parte dos genótipos produzidos comercialmente no país pertence a três variedades botânicas: 1) *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin: andromonóicas, com frutos variando de redondo a elíptico, sendo, na maioria das vezes pontudo na região do pedúnculo, possui casca muitas vezes enrugada, branca, verde escura ou amarela, com coloração uniforme ou com manchas, com ou sem costelas, polpa de coloração branca e doce, sem aroma (inodoros) e não climatéricos (PITRAT *et al.*, 2000; PITRAT 2008, 2013); 2) *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin: andromonóicas ou monóicas, com frutos doces, aromáticos e climatéricos, que se desprendem do pedúnculo quando maduros. Além disso, possuem baixa resistência ao transporte e reduzida vida pós-colheita. Com presença de costelas (suturas ou gomos) proeminentes no sentido longitudinal, o Charentais é o principal representante dessa variedade botânica produzida no Brasil (MUNGER; ROBINSON, 1991; ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997; PITRAT *et al.*, 2000; PITRAT 2008) e 3) *Cucumis melo* var. *reticulatus* Seringe: são andromonóicas, possuem frutos climatéricos e aromáticos, com sabor doce, formato redondo ou ligeiramente oval, casca reticulada com ou sem costelas e cor variando de amarela à verde escura, polpa de coloração laranja (às vezes verde) (PITRAT *et al.*, 2000; PITRAT 2008, 2013).

Os grupos são divididos comercialmente em tipos (Figura 1). Os tipos são considerados um grupo de cultivares ou de híbridos que apresentam uma ou mais características

semelhantes, facilmente identificáveis e diferenciadas dos demais, como a aparência da casca (cor quando maduro, presença ou ausência de suturas, cicatrizes, reticulação ou rendilhamento), cor da polpa, formato do fruto, entre outros (MENEZES *et al.*, 2000). 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 *cantaloupensis*).

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



Fonte: ARAGÃO (2011).

3.1.2 Aspectos econômicos

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça de grande relevância mundial. Em 2016, atingiu uma produção superior a 31 milhões de toneladas em mais de 1,24 milhões de hectares colhidos (FAO, 2018). Os maiores produtores, neste ano, com cerca de 68% do total produzido foram China, Turquia, Irã, Egito e Índia. O Brasil contribuiu com menos de 2%, ocupando a 11ª posição. Em 2017, a produção brasileira alcançou mais de 540 mil toneladas do fruto, em uma área de 23 mil ha colhidos, e o Nordeste contribuiu com mais de 95% da

produção nacional, com os Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte destacando-se como os maiores produtores nacionais, contribuindo com 79,6 % do percentual regional (IBGE, 2018). Nessas regiões, as condições climáticas, principalmente luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar, são altamente favoráveis ao cultivo dessa espécie (SILVA *et al.*, 2005).

Quanto às exportações, em 2017, mais de 43% (233,6 toneladas) do total produzido foi destinado ao mercado externo, gerando mais de 160 milhões de dólares. Os principais destinos foram Holanda (95,4 mil toneladas/US\$ 67 milhões), Reino Unido (60,3 mil toneladas/US\$43,9 milhões) e Espanha (56,1mil toneladas/US\$ 37,1 milhões). No primeiro semestre de 2018 houve uma redução (4%) das exportações, entretanto, o valor gerado pelas exportações teve um aumento de 12,5 % em relação ao mesmo período de 2017 (MDIC, 2018).

3.2 Melhoramento genético

A obtenção de híbridos é uma técnica utilizada para aumentar a produtividade das culturas. Para obter um híbrido é necessário realizar cruzamentos entre linhagens puras com características contrastantes. Nesse contexto, as linhas homozigotas são fundamentais para os programas de melhoramento de plantas. Entretanto, essa etapa requer uma quantidade considerável de tempo e recursos para gerar linhagens homozigotas, por conta de sucessivas gerações de autofecundação e seleção utilizadas nos programas de melhoramento convencional (DONG *et al.*, 2016). Em meloeiro, essa fase pode durar mais de 10 anos em regiões onde a cultura só avança um ciclo por ano. Além disso, não é possível obter materiais 100% homozigotos, mesmo após sucessivos avanços nas gerações (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013).

3.3 Técnica de dihaploidização

3.3.1 Importância

Uma alternativa para reduzir o tempo, os custos e obter linhagens 100% homozigotas em apenas um ciclo é a produção de dihaploides. Para obter um dihaploide, dois passos são necessários: a indução do desenvolvimento de haploides (monoploides) e a duplicação dos cromossomos desses indivíduos haploides (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008).

A duplicação de cromossomos por meio do uso de colchicina é necessária para obtenção de dihaploides em cucurbitáceas, tendo em vista que em espécies dessa família raramente

ocorre a duplicação cromossômica de forma natural (DRYANOVSKA, 1985).

3.3.2 Métodos de obtenção de plantas haploides

Plantas haploides de qualquer espécie têm metade do número normal de cromossomos (DONG *et al.*, 2016). 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).

A escolha do método para a produção de plantas haploides depende em grande parte da resposta específica da espécie para cada método. No cultivo *in vitro*, Dong *et al.* (2016) mencionam alguns fatores que afetam diretamente a ginogênese, tais como: genótipo da planta doadora, pré tratamentos (baixas e altas temperaturas), estágio de desenvolvimento do gametófilo feminino, concentração e tipo de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo, composição do meio de cultivo, etc.

Em meloeiro, a técnica de fertilização do óvulo com pólen irradiado é a que apresenta maior eficiência e foi usada pela primeira vez em 1987, ela consiste na germinação do pólen no estigma e o crescimento do tubo polínico dentro do estilo sem haver fertilização do óvulo pelo pólen irradiado (SAUTON; DUMAS de VAULX, 1987; MUROVEC; BOHANEK, 2012). Nesta técnica, alguns fatores, tais como: fonte e dose de radiação e protocolo de polinização podem influenciar o grau de sucesso alcançado na partenogênese haploide. Contudo, a obtenção de plantas haploides por meio desta técnica não é uma prática viável em muitos laboratórios de pesquisa, devido à indisponibilidade de instalações específicas de radiação e os riscos envolvidos na utilização dessa prática. Diante disso, a realização da cultivo *in vitro* de ovário e óvulos é uma alternativa viável.

3.4 Cultura de tecidos vegetais

3.4.1 Importância

A cultura *in vitro* de tecidos vegetais é uma técnica que vem sendo bastante utilizada como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento genético (ANDRADE, 2002). Ela foi introduzida no início do século vinte (HABERLANDT, 1902), e pode ser definida como o processo de cultivo de segmentos de tecidos vegetais (explantes) em meios de cultura estéreis e específicos, com o objetivo de regenerar uma nova planta *in vitro*, que será idêntica à planta

doadora do explante. Diferentes tecidos podem ser usados como explantes, como: fragmentos de hastes e folhas, anteras, raízes, gemas axilares ou apicais e etc. (TORRES *et al.*, 2000).

A produção de plantas haploides por meio de técnicas de cultivo *in vitro* permite aos melhoristas obterem novas linhagens homozigotas em menor tempo e rastrearem com maior eficiência genótipos com resistência a doenças. O foco principal da pesquisa com haploides é a obtenção de plantas dihaploides que contenham genes de interesse para os programas de melhoramento. 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).

3.4.2 Ginogênese *in vitro* em meloeiro

A ginogênese tem sido uma fonte alternativa para a produção de plantas haploides em muitas espécies da família das cucurbitáceas, em especial para pepino (GÉMES-JUHÁSZ *et al.*, 2002; SUPRUNOVA; SHMYKOVA, 2008; DIAO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2013; MOQBELI *et al.*, 2013; PLAPUNG *et al.*, 2014; TANTASAWA *et al.*, 2015) e abóbora (METWALLY *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2006; SHALABY, 2007). Entretanto, são poucos os trabalhos que tratam da cultura *in vitro* de óvulos e ovários não fertilizados em meloeiro (FICCADENTI *et al.*, 1999; LOFTI *et al.*, 2003; MALIK *et al.*, 2011; KOLI; MURTHY, 2013).

O primeiro relato, foi o de Ficcadenti *et al.* (1999). Esses autores estudaram as variedades botânicas *inodorus* e *reticulatus* e seus híbridos, obtendo um total de 82 embriões ginogênicos, que resultaram em plantas haploides (15,4%), diploides (23,1%) e mixoploides (61,5%), por meio da análise cromossômica.

Lofti *et al.* (2003) compararam as técnicas de cultivo *in vitro* de segmentos de ovário, com o uso de pólen irradiado na produção de plantas haploides. Esses autores observaram regeneração de mudas apenas na cv. Khatooni, cuja ploidia não foi determinada. Com base nos resultados obtidos, esses autores concluíram que o cultivo *in vitro* de ovários é menos eficiente do que a técnica de embriões partenogênicos, na obtenção de plantas haploides, além de apresentar maior especificidade genotípica.

Malik *et al.* (2011) desenvolveram protocolo de indução de embriogênese somática a partir da cultura *in vitro* de ovários não fertilizados, aumentando consideravelmente a eficiência da técnica e reduzindo o tempo necessário para identificação da ploidia das plantas regeneradas.

Koli e Murthy (2013) propuseram protocolo para a produção de haploides e dihaploides, para a variedade *conomon* cv. Mudicode, utilizando óvulos não polinizados de flores colhidas

um dia antes da antese. Nesse trabalho, mais de 90% dos calos formados regeneraram parte aérea, e a ploidia das plantas foi confirmada após análises citológicas.

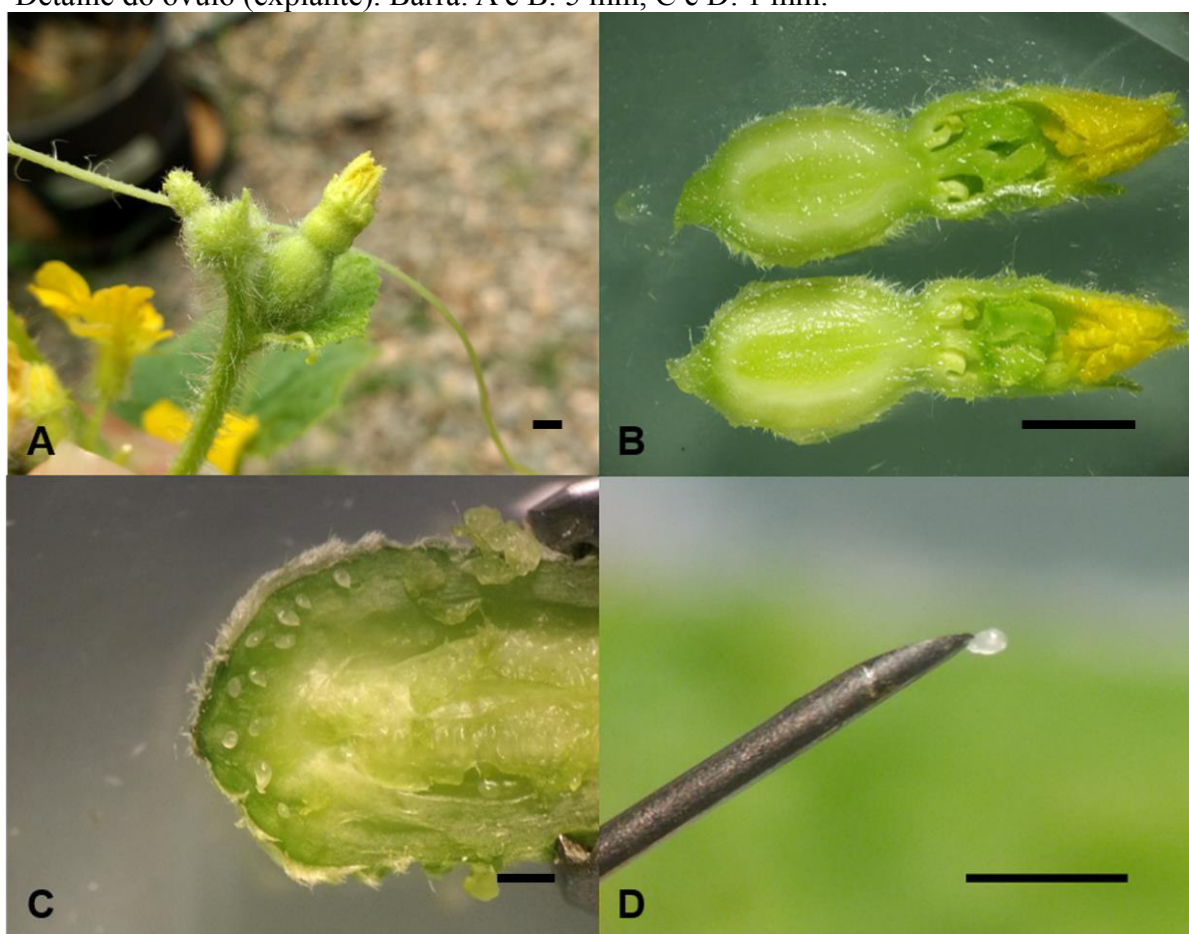
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e condições de cultivo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza, Ceará, e desenvolvido de março a agosto de 2018.

Foram utilizados como explantes óvulos obtidos de flores (femininas e hermafroditas). Essas flores possuíam os ovários não polinizados, e foram colhidas um dia antes da antese (Figura 2), de plantas das três variedades botânicas de meloeiro: *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin; *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin e *Cucumis melo* var. *reticulatus* Seringe. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação.

Figura 2. A) Flor feminina de meloeiro (*Cucumis melo* L.) da variedade botânica *cantalupensis*, com ovário não polinizado um dia antes da antese. B) Flor em corte longitudinal visualizada em microscópio estereoscópio. C) Óvulos retirados do ovário. D) Detalhe do óvulo (explante). Barra: A e B: 5 mm, C e D: 1 mm.



Fonte: elaborada pela autora.

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 $1,8 \text{ g L}^{-1}$. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 121°C , por 15 minutos. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, permanecendo no escuro por um período de sete dias (para a fase de indução de calos). Posteriormente, os explantes foram transferidos para 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 esta fase, o meio de cultivo básico utilizado foi o MS adicionado de $1,0 \mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e $2,0 \mu\text{M}$ de ácido naftalenoacético (ANA) de acordo com o protocolo utilizado por Koli & Murthy (2013).

Em capela de fluxo laminar, as flores foram desinfestadas em solução de álcool 70% por 1 minuto, a seguir em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%) por 7,5 minutos e, posteriormente, três enxágues com água destilada autoclavada, de 1 minuto cada. Os óvulos individuais foram isolados dos ovários com o auxílio de pinças e bisturis, sob microscópio estereoscópio Nova XTS - 30. Dois óvulos foram inoculados por tubo de ensaio com $150 \times 25 \text{ mm}$, contendo $20,0 \text{ mL}$ de meio de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foram utilizadas 15 repetições formadas por 10 tubos de ensaio contendo dois explantes cada (totalizando 20/repetição e 300 óvulos/tratamento), para cada tratamento, que consistiu em cada variedade botânica: *inodorus*, *cantalupensis* e *reticulatus*, totalizando três tratamentos. Aos 60 dias foi registrado o número de óvulos que desenvolveram 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.

4.1.2 Fase de regeneração de parte aérea

Oito semanas após a primeira fase, os calos das variedades botânicas *inodorus* e *cantalupensis* foram transferidos para os meios: T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + $2,22 \mu\text{M}$ de BAP; T3) MS + $4,44 \mu\text{M}$ de BAP; T4) MS + $6,66 \mu\text{M}$ de BAP; T5) MS + $8,88 \mu\text{M}$ de BAP, para a regeneração de parte aérea. Os meios foram baseados no trabalho de Koli e Murty (2013).

A variedade *reticulatus* não foi utilizada nesta etapa, devido à taxa de formação de calos ter sido insuficiente na fase anterior. Este fato impossibilitou a inclusão desta variedade no experimento realizado para regeneração de parte aérea.

As culturas foram mantidas por 60 dias em sala de crescimento, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, sendo duas variedades botânicas e cinco meios de cultivo. Foram testados 10 tratamentos, com 10 repetições de cinco tubos de ensaio contendo um calo cada, totalizando 50 calos/tratamento/variedade.

4.2 Microscopia óptica (MO)

Os estudos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular Vegetal da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, Ceará, no período de junho a novembro de 2018.

Para os estudos histológicos, calos formados a partir do cultivo *in vitro* de óvulos das variedades botânicas de meloeiro: *inodorus*, *reticulatus* e *cantalupensis* foram coletados aos dias 0, 30 e 60 após a inoculação em meio para a fase de indução a calogênese e aos 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação em meios para a fase de regeneração de parte aérea nas variedades *cantalupensis* e *inodorus*. As amostras (duas por tratamento) foram fixadas em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato, pH 7,2) (KARNOVSKY, 1965) e permaneceram acondicionadas em geladeira até o processamento.

Após esse período, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (60, 70, 80, 90 e 100%), por uma hora cada e incluídas em historresina (LEICA®). Para montagem das lâminas, cortes de 6 μm foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço semi-automático (CUT5062, Slee Mainz). Os cortes de cada amostra foram corados por coloração específica: a) azul de toluidina (AT) a 0,025% pH 4,0 para detecção de radicais aniônicos, e b) submetidos a reação do ácido periódico-Schiff (PAS), para auxiliar na detecção de polissacarídeos neutros (glicogênio, amido e celulose) e de radicais glicídicos de glicoproteínas. Por fim, os cortes foram visualizadas em microscópio OLYMPUS BX41, fotografadas com câmera digital modelo OLYMPUS UC30 e as imagens foram obtidas utilizando o software “cellSens”.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução de calos

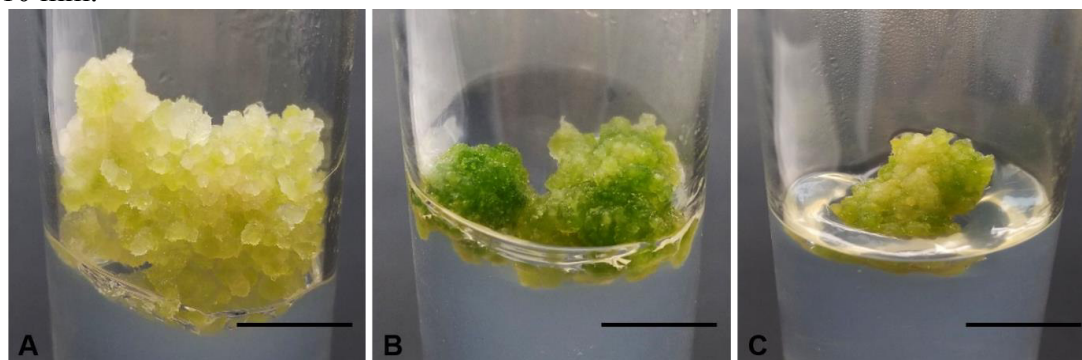
Houve diferença significativa para formação de calos entre as três variedades botânicas de meloeiro estudadas (Tabela 1). A variedade *inodorus* foi a mais eficiente, produzindo calos em 60,65% dos óvulos avaliados, diferindo estatisticamente das variedades *cantalupensis* (37,65%) e *reticulatus* (18,65%), que também apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 3). Ao utilizar o mesmo meio de cultivo em óvulos da var. *conomon* cv. Mudicode, Koli & Murthy (2013) obtiveram calogênese em mais de 90% dos explantes. Tal variação pode ser explicada pela influência direta que o genótipo exerce na ginogênese (DONG *et al.*, 2016).

Tabela 1. Porcentagem de indução de calogênese (IC) em três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS adicionado de 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de ANA.

Variedade botânica	IC (%) ¹
<i>Cucumis melo</i> var. <i>inodorus</i>	60,65a
<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	37,65 b
<i>Cucumis melo</i> var. <i>reticulatus</i>	18,65 c
CV%	32.74

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente segundo o teste de Tukey (P<0,05).

Figura 3. Calos obtidos a partir de óvulos de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionado de 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de ANA. A) *inodorus* B) *cantalupensis* e C) *reticulatus*. Barra: 10 mm.



Fonte: elaborada pela autora.

Plapung (2014), ao investigar o efeito de reguladores de crescimento na calogênese de óvulos de pepino (*Cucumis sativus*), verificou respostas divergentes entre as variedades botânicas testadas, corroborando com o presente estudo, onde cada variedade botânica se comportou de maneira específica na indução de calos a partir de óvulos. Além disso, o estágio de desenvolvimento do gametófito feminino é outro fator relacionado à recuperação bem-sucedida de haploides e dihaploides na cultura de óvulos e ovários (DONG *et al.*, 2016). Nesse contexto, é possível que o desenvolvimento dos óvulos ocorra de maneira diferente entre as variedades testadas, sendo os óvulos da variedade *reticulatus* mais imaturos quando foram submetidos ao meio para indução de calos (Figura 4).

Figura 4. Corte histológico de segmento de ovário de meloeiro (*Cucumis melo* L.), evidenciando os óvulos imaturos, antes da indução a calogênese *in vitro* na variedade botânica *reticulatus* sob microscopia de luz. Ov: óvulo. Am: amido.



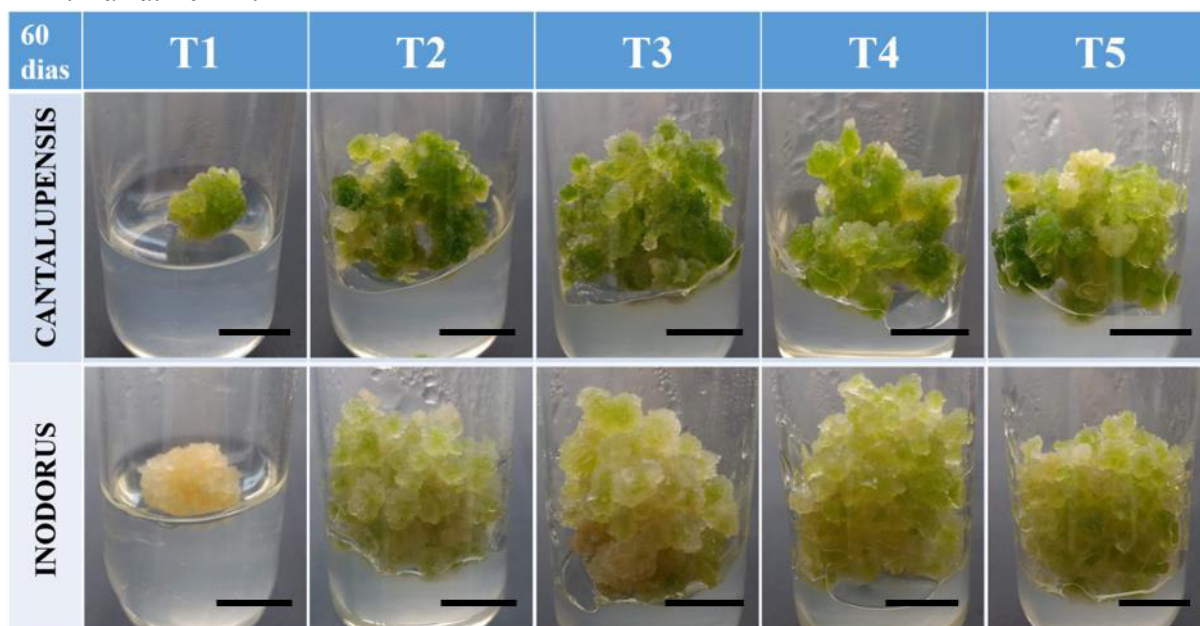
Fonte: elaborada pela autora.

Comportamento semelhante tem sido detectado em vários trabalhos com meloeiro, indicando a necessidade do desenvolvimento de protocolos de regeneração específicos para cada cultivar, visando à otimização da resposta *in vitro* (Gray *et al.*, 1993).

5.2 Regeneração de parte aérea

Não foi observada formação de parte aérea para nenhum dos tratamentos testados nas variedades botânicas *cantalupensis* e *inodorus* de meloeiro (Figura 5).

Figura 5. Calos das variedades botânicas *inodorus* e *cantalupensis* após 60 dias de cultivo em meios para regeneração de parte aérea. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μM de BAP; T3) MS + 4,44 μM de BAP; T4) MS + 6,66 μM de BAP; T5) MS + 8,88 μM de BAP. Barra: 10mm.



Fonte: elaborada pela autora.

Em meloeiro, Koli & Murthy (2013) ao utilizarem BAP na concentração de 5 μM obtiveram mais de 90% de formação de parte aérea para a cultivar Mudicode da variedade botânica *conomon*. Malik *et al.* (2011), estudaram a regeneração de plantas haploides em segmentos de ovário, alcançando resultados satisfatórios em meio MS suplementado com 2,66 μM de BAP, com uma taxa de regeneração superior a 22,5%. Já Ficcadenti *et al.* (1999), obtiveram maior eficiência de regeneração de plantas haploides a partir de ovários cultivados em meio MS suplementado com 0,27 μM de ANA e 0,88 μM de BAP.

A regeneração indireta de plantas *in vitro* é baseada no equilíbrio entre duas classes principais de fitoreguladores, citocinina e auxina, e na qualidade das fontes de explantes durante o desenvolvimento da planta (TEKDAL; CETINER, 2013). Este balanço hormonal é muito peculiar sendo influenciado por vários fatores, como espécie, variedade, tipo de explante, meio de cultivo, etc (SILVA *et al.*, 2012). Mukhambetzhanov (1997) relatou que concentrações altas de reguladores de crescimento estimulam a formação de calos a partir de tecidos somáticos, e inibem a formação de elementos haploides do saco embrionário. Panaia *et al.* (2004) relatam que a composição dos nutrientes, presentes nos meios de cultivo, desempenha um papel importante na cultura *in vitro* de gametófitos femininos não fertilizados. Além disso, esses autores mencionam que a citocinina (BAP) é geralmente

incorporada em meios de cultivo para estimular a divisão celular e diferenciação de brotações adventícias de calos e órgãos.

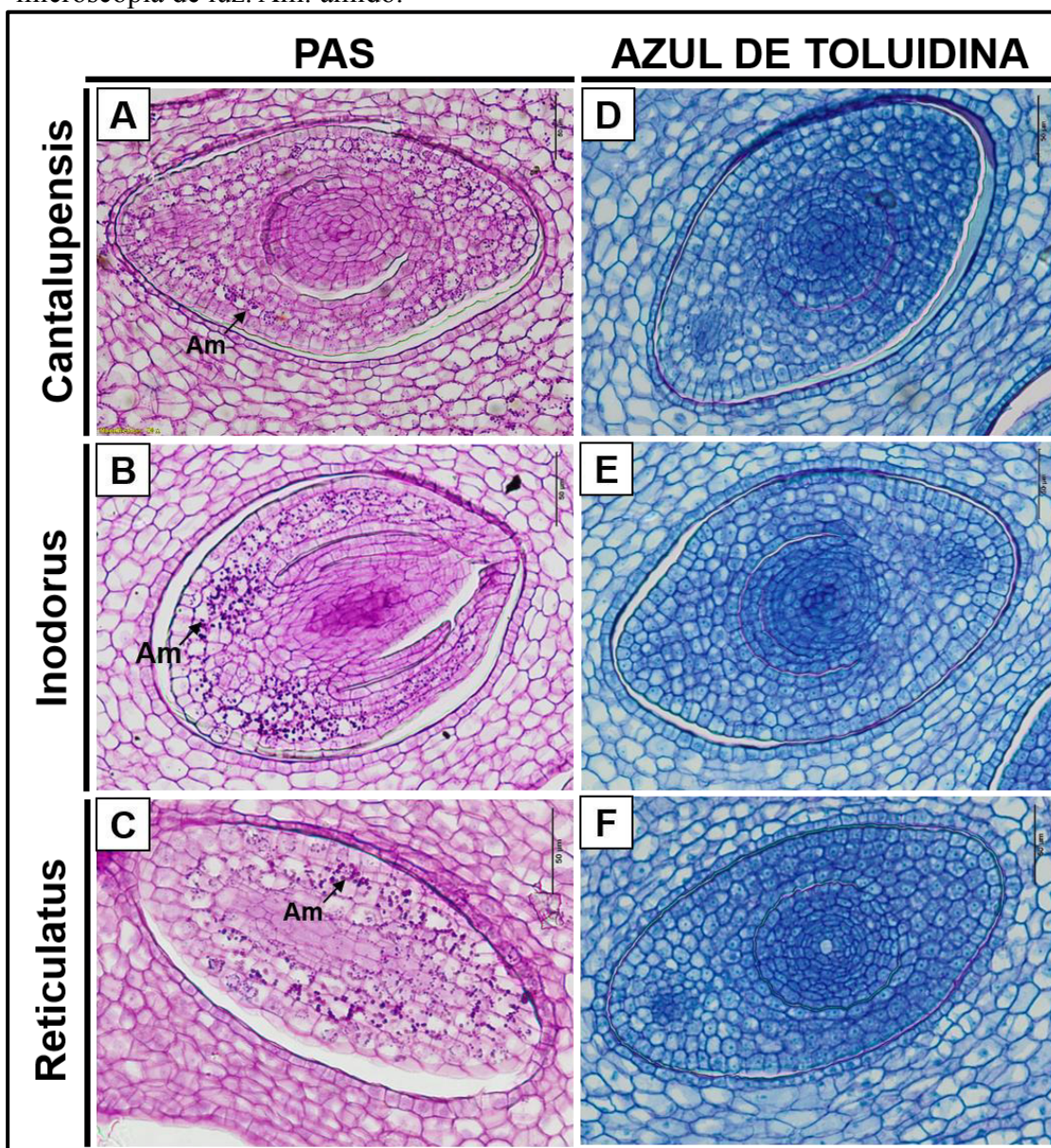
A incorporação de BAP em baixos níveis foi aplicada com sucesso em alguns estudos, para a maturação embrionária e, em última análise, para a regeneração de mudas, focados na obtenção de plantas haploides através da ginogênese *in vitro* de meloeiro (FICCADENTI *et al.*, 1999; MALIK *et al.*, 2011; KOLI; MURTHY, 2013) e em outras espécies como pepino (GEMES JUHÁSZ *et al.*, 2002).

Protocolos para obtenção de plantas haploides a partir do cultivo *in vitro* de óvulos tem incluído estudos sobre o estágio de desenvolvimento do saco embrionário, composição do meio e pré-tratamento com temperatura (CHAMBONNET; DUMAS de VAULX, 1985; METWALLY *et al.*, 1998; GÉMES JUHÁSZ *et al.*, 2002).

5.3 Microscopia óptica

O corante PAS revelou a presença de polissacarídeos no citoplasma das células, e após teste positivo com o lugol, foi confirmada a presença de amido nos óvulos, antes de serem submetidos ao meio para indução *in vitro* de calos. Com o azul de toluidina foi possível observar as células de tamanho reduzido e a presença do núcleo (Figura 6).

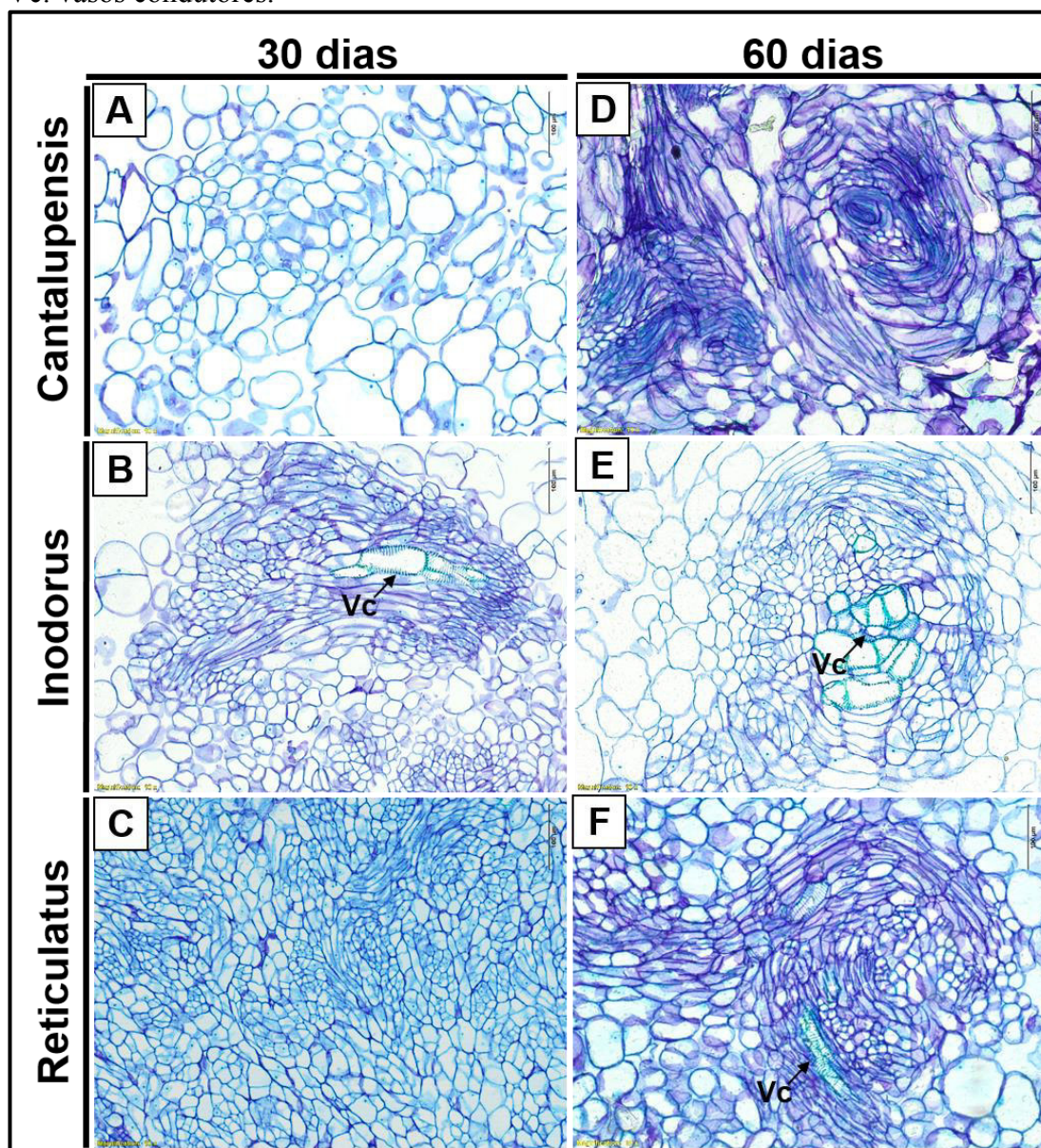
Figura 6. Óvulos excisados de ovários não fecundados, um dia antes da antese, de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.): A) e D) *cantalupensis*; B) e E) *inodorus*; C) e F) *reticulatus*, antes da indução a formação de calos sob microscopia de luz. Am: amido.



Fonte: elaborada pela autora.

Aos 30 dias de inoculação *in vitro*, já foi possível verificar a formação de calos nos óvulos que foram inoculados no meio de cultivo MS adicionado de 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de ANA (Figura 7A; 7B e 7C). Foram observadas células indiferenciadas, com grandes vacúolos e núcleos pequenos na maior parte dos calos, porém também foram registradas regiões com células menores e núcleos grandes e que, provavelmente, estão em divisão celular (Figura 7).

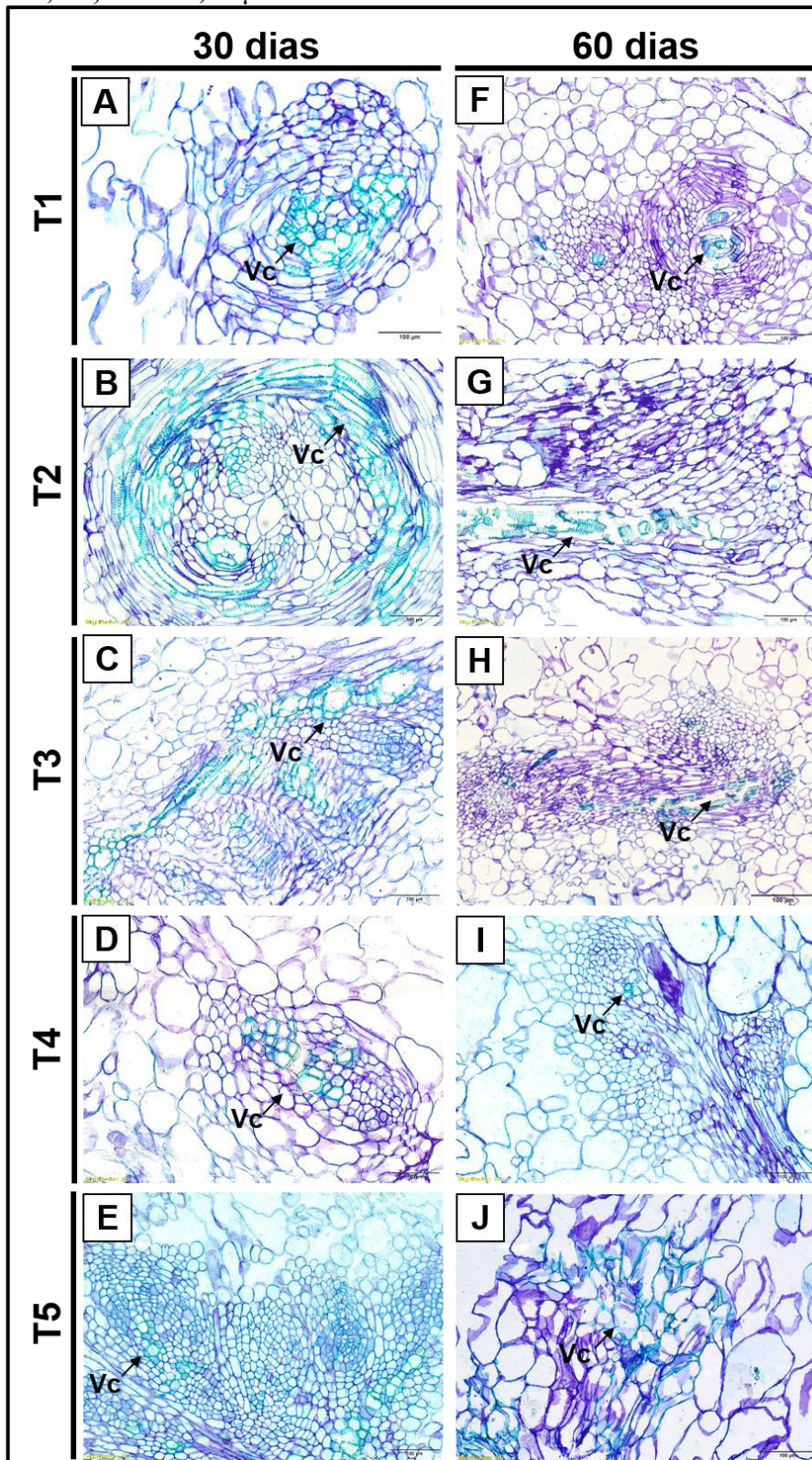
Figura 7. Calos formados em óvulos (7A; 7B e 7C) e 60 dias (7D, 7E e 7F) de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.): A) e D) *cantalupensis*; B) e E) *inodorus*; C) e F) *reticulatus*, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob microscopia de luz. Vc: vasos condutores.



Fonte: elaborada pela autora.

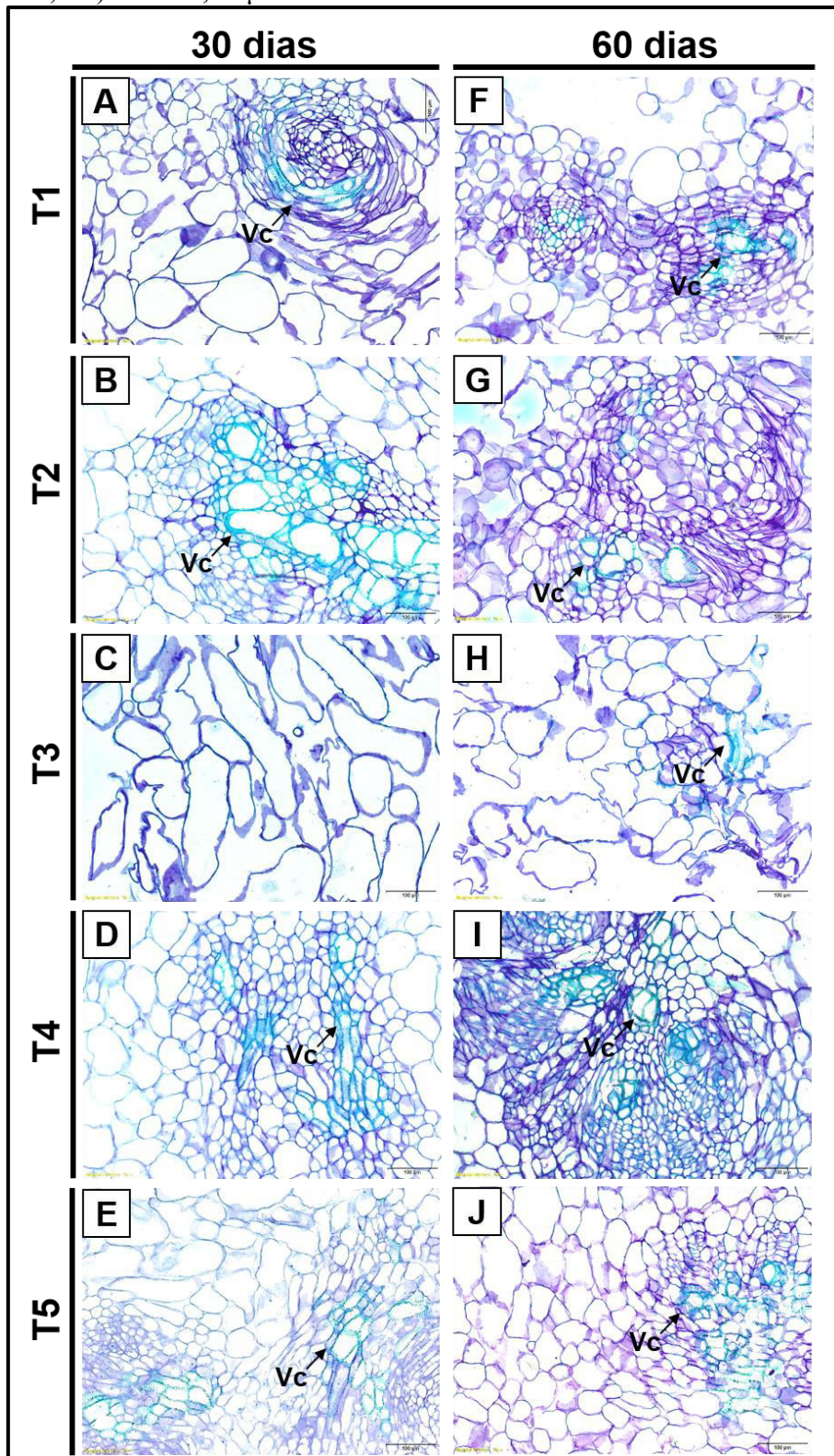
Foi observado metacromasia (processo que consiste na obtenção de uma coloração diferente do corante utilizado) com o corante azul de toluidina, principalmente nos calos submetidos aos meios de cultivo MS adicionados apenas de BAP, para regeneração de parte aérea (Figuras 8 e 9), onde os vasos condutores apresentaram coloração verde claro, enquanto que as outras estruturas apresentaram coloração azul escura, característica do corante utilizado.

Figura 8. Calos formados aos 30 dias (8A; 8B; 8C; 8D e 8E) e aos 60 dias (8F; 8G; 8H; 8I e 8J) na variedade botânica *cantalupensis* de meloeiro (*Cucumis melo* L.) em meios para regeneração de parte aérea, sob microscopia de luz. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μ M de BAP; T3) MS + 4,44 μ M de BAP; T4) MS + 6,66 μ M de BAP; T5) MS + 8,88 μ M de BAP. Vc: vasos condutores.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 9. Calos formados aos 30 dias (8A; 8B; 8C; 8D e 8E) e aos 60 dias (8F; 8G; 8H; 8I e 8J) na variedade botânica *inodorus* de meloeiro (*Cucumis melo* L.) em meios para regeneração de parte aérea, sob microscopia de luz. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μ M de BAP; T3) MS + 4,44 μ M de BAP; T4) MS + 6,66 μ M de BAP; T5) MS + 8,88 μ M de BAP. Vc: vasos condutores.



Fonte: elaborada pela autora.

De uma forma geral, os calos apresentaram células indiferenciadas (exceto nos vasos condutores) com grandes vacúolos e núcleos pequenos. Além disso, os calos submetidos aos meios para regeneração de parte aérea apresentaram mais áreas com vasos condutores, evidenciadas pelo corante azul de toluidina.

6 CONCLUSÃO

Os meios testados não foram eficientes para obtenção de plantas haploides das três variedades de meloeiro a partir de calos de óvulos.

A resposta à calogênese é particular para cada uma das três variedades botânicas.

Os tratamentos testados não são apropriados para induzir a regeneração de parte aérea, a partir dos calos das variedades botânicas *cantalupensis* e *inodorus*.

As análises histológicas, por meio da microscopia óptica, permitiram identificar diferenças anatômicas entre os calos nas duas fases.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** Planaltina: Embrapa Cerrados. 16p – Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 58. 2002
- 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.; ÇÖMLEKÇIOĞLU, 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.
- CHAMBONNET, D., DUMAS de VAULX, R. **Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*.** Cucurbit Genetics Coop. Rep. 8: 66. 1985.
- CURUK, S.; ANANTHAKRISHNAN, G.; SINGER, S; XIA, X. D.; ELMAN, C.; NESTEL, D., CETINER, S., GABA, V. **Regeneration *in vitro* from the hypocotyl of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light.** Hort. Science, 38: 105-109. 2003.
- DANG, W.; WEI, Z.M. **High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean.** Biologia Plantarum, 53(2): 312-316, 2009.
- 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. **Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from the Cucurbitaceae family.** C.R. Acad.Bulgare Sci. 38: 1243–1244. 1985.
- FAO. **Faostat – Statistics Database.** Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#home> > Acesso em 7 de setembro de 2018.
- FICCADENTI, N; SESTILI, S; ANNIBALI, S; DI MARCO, M; SCHIAVI, M. ***In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L.** Journal of Genetics and Breeding. 53:255–257. 1999.
- 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.

GÉMES JUHÁSZ, A.; BALOGH, P.; FERENCZY A.; KRISTÓF, Z. **Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.).** Plant Cell Rep. 21: 105-111. 2002.

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.

GRAY, D.J; McColley, D.W; COMPTON, M. E. **High- frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo*.** Journal American Society for Horticultural Science, v.118, p.425- 432, 1993.

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>

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

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.

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.

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.

LOTFI, M.; ALAN, A.R.; HENNING, M.J.; JAHN, M.M.; EARLE, E.D. **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.; 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.
- 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://alicesweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em 8 de setembro de 2018.
- MUKHAMBETZHANOV S.K. **Culture of non-fertilized female gametophytes *in vitro*.** *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 48: 111–119. 1997.
- 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 bioassay with tobacco tissue culture.** *Physiol. Plant*, 15: 473-497. 1962.
- MUROVEC, J.; BOHANEK, B. **Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding.** *Plant Breeding*, Dr. Ibromkhim Abdurakhmonov (Ed.), ISBN: 978-953-307-932-5, InTech, DOI: 10.5772/29982. 2012.
- NIEDZ, R. P.; SMITH, S. S.; DUNBAR, K. B.; STEPHENS, C.T.; MURAKISHI, H. H. **Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*.** *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 18: 313- 319. 1989.
- PANAIA M., SENARATNA T., DIXON K.W., SIVASITHAMPARAM, A. **The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae.** *Australian Journal of Botany*, 52: 257–265. 2004.
- PINHEIRO, M. V. M. **Propagação fotoautotrófica de *Etinglera elatior* 'Porcelana' e aspectos anatômicos e caracterização e expressão do gene *SERK* na embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel'.** 2014.
- 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 2000. Acta Horticulturae. 510:29–36, 2000.

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.

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

SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; NUEZ, F. **Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis**. Cytogenetic and Genome Research 120(3-4): 358-369, 2008.

SILVA, A.L.L.; BISOGNIN, D.A.; FRANCO, E.T.H; HORBACH, M.A.; LUZ COSTA, J.; SCHEIDT, G.N.; ALVES, S.A.O.; BRONDANI, G.E. **Germinação *in vitro* de sementes e indução de calos em plântulas, cotilédones e anteras de porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Stand.) – Cucurbitaceae**. Journal of Biotechnology and Biodiversity. Gurupi, v.3, n.4, p.117-126, 2012.

SILVA, L. A.; INNECCO, R.; COSTA, J. T. A.; MELO, F. I. O.; MALUF, W. R.; FERNANDES, P. J. **Estudo de aspectos quantitativos e qualitativos de frutos de genótipos de melão**. Revista Ciência Agrônômica, vol. 36, no. 3, pp. 310-315, 2005.

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.

TEKDAL, D.; CETINER, S. **The effects of different combinations and varying concentrations of growth regulators on the regeneration of selected Turkish cultivars of melon**. In: Current Progress in Biological Research, Agricultural and Biological Sciences (ed. Silva-Opps, Marina), InTech, Croatia (Book Chapter), 2013.

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

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

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.