



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**FRANCISCO BRUNO SILVA FREIRE**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E INDUÇÃO DE ORGANOGÊNESE EM  
MELOEIRO**

**FORTALEZA**

**2017**

FRANCISCO BRUNO SILVA FREIRE

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E INDUÇÃO DE ORGANOGÊNESE EM  
MELOEIRO

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Co-orientadora: Cristina Paiva da Silveira Carvalho

FORTALEZA

2017

FRANCISCO BRUNO SILVA FREIRE

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E INDUÇÃO DE ORGANOGÊNESE EM  
MELOEIRO

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA

2017

Aos meus pais, Francisco e Marluce.  
À minha família e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que sempre me ajudou e me apoiou em alcançar meus objetivos.

À Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, por me receber, me instruir e me acompanhar por todo o percurso, além de ser mentora para o meu aprendizado.

A Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho, por me receber em seu laboratório no início de minha formação e me ensinar muito do que sei sobre processos laboratoriais e cultura de tecidos de plantas.

Aos professores do curso de Biotecnologia, que participaram ativamente da minha formação acadêmica e profissional.

Ao secretário do curso de Biotecnologia, Gilmar Ferreira, por ser a pessoa mais prestativa e solícita que eu já conheci.

À Universidade Federal do Ceará, por me conceder recursos e a oportunidade de desenvolvimento pessoal.

A todos meus amigos, pelos momentos de auxílio e diversão.

Aos meus colegas de curso, pelo companheirismo e amizade.

À minha amada Eva Moraes, por estar comigo desde o início de nosso caminho na formação acadêmica, me ajudando nos momentos mais difíceis.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pela oportunidade de estágio e aprendizado.

À Arlene Santisteban Campos, por me ajudar com toda a análise estatística.

Aos colegas de laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical, pela amizade, carinho e imenso auxílio.

## RESUMO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma planta de grande interesse econômico, cultivada em regiões tropicais e subtropicais em vários países, inclusive no Brasil. Em função do clima, o Nordeste é a região maior produtora de melão do Brasil. A organogênese é uma via morfogênica muito utilizada como técnica na cultura de tecidos vegetais por proporcionar vantagens como a elevada taxa de multiplicação de clones, produção em larga escala de mudas e propagação de plantas elite desenvolvidas através de programas de melhoramento genético. Visando à regeneração de plantas de meloeiro, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo de germinação *in vitro* de sementes de meloeiro do tipo Cantaloupe e a determinação da concentração ideal de reguladores de crescimento para indução de organogênese em explantes cotiledonares dos tipos Pele de Sapo e Cantaloupe. Para a germinação *in vitro*, as sementes do tipo Cantaloupe foram submetidas a dez tratamentos de pré-germinação com a embebição da semente em água destilada autoclavada por diferentes intervalos de tempo e a remoção ou não do tegumento. Para a indução da organogênese foram utilizados segmentos de cotilédones com 12 dias de idade dos dois tipos de meloeiro em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). O melhor tratamento de pré-germinação foi obtido com a remoção do tegumento, resultando em 100% de germinação, três dias após a inoculação *in vitro* das sementes de meloeiro tipo Cantaloupe. Esses resultados indicam que o tegumento retarda a germinação *in vitro* das sementes pela pouca permeabilidade à água. Na indução de organogênese houve a formação de calos, gemas e brotos adventícios no tipo Cantaloupe e apenas calos e gemas adventícias no Pele de Sapo. A melhor concentração de regulador de crescimento para o desenvolvimento de calos e gemas adventícias foi  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP com média de massa fresca de 3,7 g de calos por explante e 88% dos explantes formando gemas e brotos adventícios, no tipo Cantaloupe e para o Pele de Sapo apenas quanto a formação de calos com 1,8 g de média de massa fresca. O tipo Pele de Sapo não mostrou resultados conclusivos quanto a indução de gemas adventícias. A indução da organogênese em meloeiro é dependente da concentração do regulador de crescimento BAP e, principalmente, do genótipo.

**Palavras-chave:** Germinação; Morfogênese; *Cucumis melo*; Cotilédone;

## ABSTRACT

The melon (*Cucumis melo* L.) is a plant with great economic interest, cultivated in tropical and subtropical regions in several countries, including Brazil. Due to the climate, the Northeast is the most melon producing region in Brazil. Organogenesis is a morphogenetic pathway widely used as a technique in plant tissue culture because it provides advantages such as high clone multiplication rate, large-scale plantlets production and reproduction of elite plants developed through genetic improvement programs. Aiming the complete regeneration of melon plants, the present work has the objective of developing a protocol for *in vitro* germination protocol of Cantaloupe type melon seeds and the determination of the ideal concentration of growth regulators for induction of organogenesis in cotyledonary explants of the melon types Pele de Sapo and Cantaloupe. For the *in vitro* germination, the Cantaloupe seeds were submitted to ten pre-germination treatments such as seed soaking in autoclaved distilled water by different time intervals and the removal or not of the tegument. For the induction of organogenesis, 12-day old cotyledon segments of the two types of melon were used in MS culture medium containing different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). The data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and the means compared by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ). The best pre-germination treatment was obtained with the tegument removal, resulting in 100% germination, three days after *in vitro* inoculation of the seeds of melon type Cantaloupe. These results indicate that the tegument retards the *in vitro* germination of the seeds due to poor permeability to water. In the induction of organogenesis occurred the formation of calluses, buds and adventitious shoots in the Cantaloupe type, and only calluses and adventitious buds in Pele de Sapo. The best concentration of growth regulator for the development of calluses and adventitious buds was 3.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP with fresh weight average of 3.7 g of calli per explant and 88% of explants forming buds and adventitious shoots, in the type Cantaloupe and for the Pele de Sapo just about callus formation with 1.8 g of fresh mass average. The type Pele de Sapo did not show conclusive results regarding the induction of adventitious buds. The induction of organogenesis in melon is dependent of the concentration of the growth regulator BAP and, mainly, the genotype.

**Keywords:** Germination; Morphogenesis; *Cucumis melo*; Cotyledon

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tipos de melões mais comercializados no Brasil, os não climatéricos: Honeydew, Pele de Sapo, Amarelo, e os climatéricos: Charentais, Gália e Cantaloupe.

Figura 2 – Princípio geral da cultura *in vitro* de tecidos vegetais.

Figura 3 – Sementes do tipo de meloeiro Cantaloupe com tegumento, à esquerda e sem tegumento à direita.

Figura 4 – Semente sem tegumento do meloeiro Cantaloupe inoculada *in vitro* com a parte apical inserida no meio de cultura.

Figura 5 – Semente com tegumento do meloeiro Cantaloupe inoculada *in vitro* apresentando crescimento da radícula.

Figura 6 – Explantes de cotilédone de meloeiro tipo Pele de Sapo, seccionado transversalmente em dois segmentos, removendo-se as extremidades e as bordas.

Figura 7 – Calos de meloeiro Cantaloupe apresentando desenvolvimento de gemas adventícias e broto.

Figura 8 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de meloeiro tipo Cantaloupe em diferentes tratamentos de pré-germinação, no decorrer de 28 dias após a inoculação das sementes com tegumento.

Figura 9 – Explantes de segmentos cotiledonares com 28 dias dos tipos de meloeiro Cantaloupe e Pele de Sapo.

Figura 10 – Média da massa fresca total dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro*.

Figura 11 – Média da massa fresca total dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro*.

Figura 12 – Calos formados aos 28 dias, após a inoculação *in vitro* de explantes de cotilédone de meloeiro tipos Cantaloupe e Pele de Sapo.

Figura 13 – Porcentagem de formação de gemas adventícias do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

Figura 14 – Porcentagem de formação de gemas adventícias do tipo de meloeiro Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

Figura 15 – Calos formados aos 38 dias, após a inoculação *in vitro* de explantes de cotilédones de meloeiro tipos Cantaloupe e Pele de Sapo, apresentando desenvolvimento de gemas adventícias.

Figura 16 – Calos formados aos 38 dias, após a inoculação *in vitro* de explantes de cotilédones do tipo Cantaloupe, apresentando desenvolvimento de brotos.

Figura 17 – Brotos excisados dos calos, obtidos a partir de explantes cotiledonares, do tipo Cantaloupe, visualizados com o auxílio de microscópio estereoscópico, apresentando folhas.

Figura 18 – Brotos do meloeiro do tipo Cantaloupe obtidos a partir de explantes cotiledonares, em subcultivo no meio MS sem fitorreguladores, visualizados com o auxílio de microscópio estereoscópico, apresentando desenvolvimento de flores *in vitro*.

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Tratamentos de pré-germinação utilizados na germinação *in vitro* de sementes do tipo de meloeiro Cantaloupe.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes do meloeiro Cantaloupe em diferentes tratamentos de pré-germinação com e sem tegumento, três dias após a inoculação das sementes.

Tabela 2 – Quadrado médio e níveis de significância pelo teste F do fator tratamento dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Cantaloupe nas variáveis porcentagem de formação de calo pequeno, médio e grande, de calo total, de calo formando gema, massa fresca total, número de gemas por calo e número de brotos por calo.

Tabela 3 – Quadrado médio e níveis de significância pelo teste F do fator tratamento dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Pele de Sapo nas variáveis porcentagem de formação de calo pequeno, médio e grande, de calo total, de calo formando gema, massa fresca total, número de gemas por calo e número de brotos por calo.

Tabela 4 - Porcentagem de formação de calos pequenos (até 1500 mg), médios (a partir de 1501 até 3000 mg), grandes (a partir de 3001 mg) e totais do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios nutritivos MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes.

Tabela 5 – Porcentagem de formação de calos pequenos (até 1500 mg), médios (a partir de 1501 até 3000 mg), grandes (a partir de 3001 mg) e totais do tipo de meloeiro Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes.

Tabela 6 – Número médio de gemas e brotos adventícios do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

Tabela 7 – Número médio de gemas e brotos adventícios do tipo Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Família Cucurbitaceae</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>O meloeiro</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Cultura <i>in vitro</i> de tecidos vegetais</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4</b>	<b>Organogênese</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5</b>	<b>Cultura de tecidos de meloeiro</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Experimento de germinação <i>in vitro</i></b> .....	<b>11</b>
<b>3.1.1</b>	<b><i>Análise da germinação</i></b> .....	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Experimento de organogênese</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Análises da organogênese</i></b> .....	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação do experimento de germinação</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Análise da germinação</i></b> .....	<b>16</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação do experimento de organogênese</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2.1</b>	<b><i>Análise da formação de calos</i></b> .....	<b>19</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>Análise da massa fresca dos calos</i></b> .....	<b>21</b>
<b>4.2.3</b>	<b><i>Análise da cor e textura dos calos</i></b> .....	<b>23</b>
<b>4.2.4</b>	<b><i>Análise das gemas</i></b> .....	<b>24</b>
<b>4.2.4.1</b>	<b><i>Formação de gemas adventícias</i></b> .....	<b>24</b>
<b>4.2.4.2</b>	<b><i>Número de gemas e brotos adventícios por calo</i></b> .....	<b>27</b>
<b>4.2.4.3</b>	<b><i>Análise qualitativa do subcultivo de gemas e brotos adventícios</i></b> .....	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Família Cucurbitaceae

As cucurbitáceas são plantas dicotiledôneas que podem ser dioicas ou monoicas. São constituídas por plantas de crescimento rápido, normalmente rasteiras, herbáceas ou sublenhosas, e em sua maioria com gavinhas espiraladas para sua sustentação. São amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (TAYLOR *et al.*, 2009). Podem ser plantas anuais, morrendo após completarem seu ciclo reprodutivo uma única vez, ou perenes. Suas folhas possuem tricomas com numerosas nervuras convergindo e terminando em um ápice expandido. Suas flores abrem somente por um dia, são tricarpelares e possuem nectários diversos. Seus frutos são do tipo baga chamados de pepônio. No interior desse tipo de fruto encontram-se numerosas placentas preenchendo o lóculo. Suas sementes possuem endosperma escasso e sua testa é composta por diversas camadas (JUDD *et al.*, 2009).

Com várias espécies domesticadas, os membros desta família são principalmente utilizados para a produção agrícola de frutos. Dessa forma as cucurbitáceas possuem uma elevada importância econômica, pois são amplamente utilizadas na alimentação de grande parte da população. Também existem espécies que são responsáveis pela produção de certos tipos de drogas utilizadas no tratamento de algumas doenças, como a *Gynostemma pentaphyllum*, e algumas ainda produzem venenos que podem matar o homem, como a *Luffa operculata*. Outros membros das cucurbitáceas são cultivados apenas como espécies ornamentais, pelo aspecto das flores e frutos, como a abóbora *Cucurbita argyrosperma*. Outros aspectos importantes no seu cultivo se dá por ser uma cultura relativamente simples e adaptada a regiões com menos abundância de recursos, como a água. No Brasil as cucurbitáceas mais cultivadas são o pepino, a abóbora e o melão, sendo este último de grande expressão econômica e produzido principalmente na região Nordeste do país (QUEIRÓZ, *et al.*, 2011).

A cultura de tecidos também é aplicada a muitas cucurbitáceas justamente pelo seu aspecto econômico e interesse comercial. Plantas como *Cucumis melo*, o meloeiro, *Cucumis anguria*, o maxixe (THIRUVENGADAM *et al.*, 2013), *Cucumis sativus*, o pepino (DIAO *et al.*, 2009), *Citrullus lanatus*, a melancia (VASUDEVAN *et al.*, 2017) e *Cucurbita pepo*, a abobrinha (OBEMBE *et al.*, 2017) são todas culturas comerciais.

## 1.2 O meloeiro

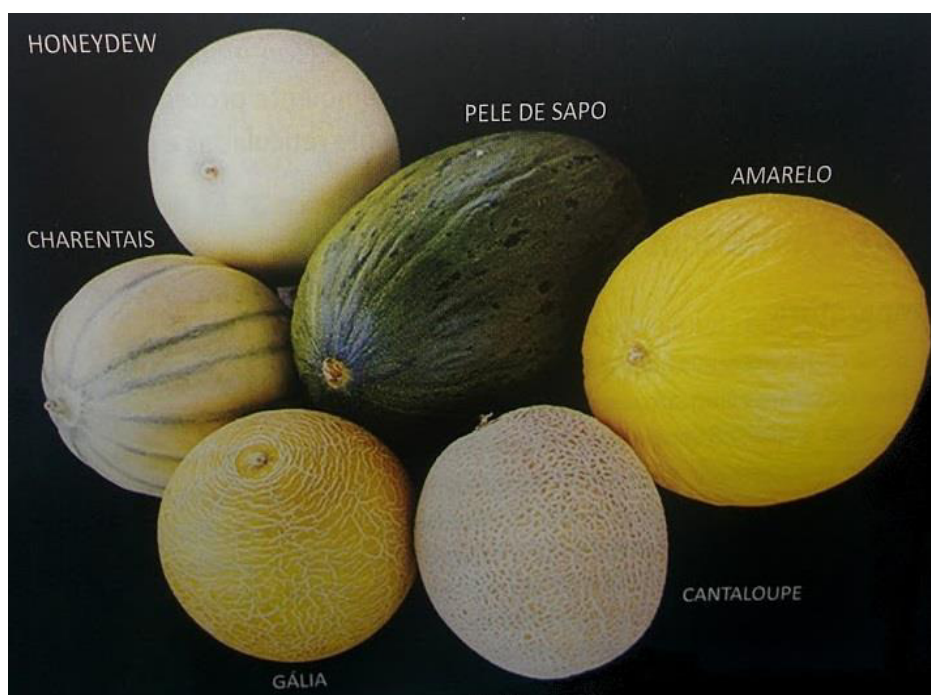
O meloeiro faz parte do gênero *Cucumis*, subtribo Cucumerinae, tribo Melothriaceae, subfamília Cucurbitaceae, família Cucurbitaceae e espécie *Cucumis melo* L. (EMBRAPA, 2010). A planta é dicotiledônea e extremamente polimórfica, ou seja, possui uma diversidade genética muito ampla. Apesar de na natureza ser uma planta perene, é explorada comercialmente como planta anual. Suas flores podem ser apenas masculinas ou hermafroditas na mesma planta. Seus frutos são do tipo pepônio com formas, tamanhos, texturas e cores variadas com até 600 sementes na parte interna da polpa (KIRKBRIDE, 1993).

Quanto às características de cultivo, a temperatura ideal está situada entre 25 °C e 35 °C. O pH do solo deve estar entre 6,4 e 7,2. A cultura do meloeiro necessita de intensa luminosidade, com luz solar direta. No período da maturação dos frutos, o recomendado é que o clima seja quente e seco. Sendo assim, as melhores condições para o cultivo do melão encontram-se em regiões de clima semiárido, contudo isso não significa que ele não possa ser cultivado em outras regiões. O meloeiro deve ser plantado de forma a evitar que a frutificação ocorra nas estações mais chuvosas do ano. Mas ele também pode ser cultivado dentro de estufas agrícolas com condições ambientais controladas (EMBRAPA, 2017).

Os melões mais cultivados atualmente estão inseridos em dois grandes grupos botânicos segundo a classificação de Robinson e Decker-Walters (1997). Os aromáticos e climatéricos da variedade (var.) *cantaloupensis* como os tipos (tipos) Cantaloupe, Gália e Charentais (Figura 1), com sua principal característica sendo a resposta ao hormônio gasoso etileno, promovendo o amadurecimento após a colheita. E os inodoros e não climatéricos da var. *inodorus* como os tipos Amarelo, Pele de Sapo e Honeydew (Figura 1), com sua principal característica sendo o não amadurecimento após a remoção do fruto da planta.

O melão é uma fruta com grande interesse econômico por ser amplamente consumida e cultivada no mundo inteiro. Em 2015 em torno de 94% de toda a produção nacional de melão foi produzida na região Nordeste (IBGE, 2017). A liderança do Nordeste na produção de melão no Brasil é explicada pelo clima quente e seco, propício para o desenvolvimento do meloeiro e de frutos de boa qualidade. Em 2014 o Ceará sozinho foi responsável pela exportação de 111.045 toneladas do fruto, representando 62,4% de toda a exportação nacional (ADECE, 2017).

Figura 1 – Tipos de melões mais comercializados no Brasil, os não climatéricos: Honeydew, Pele de Sapo, Amarelo, e os climatéricos: Charentais, Gália e Cantaloupe.



Fonte: Embrapa, 2017

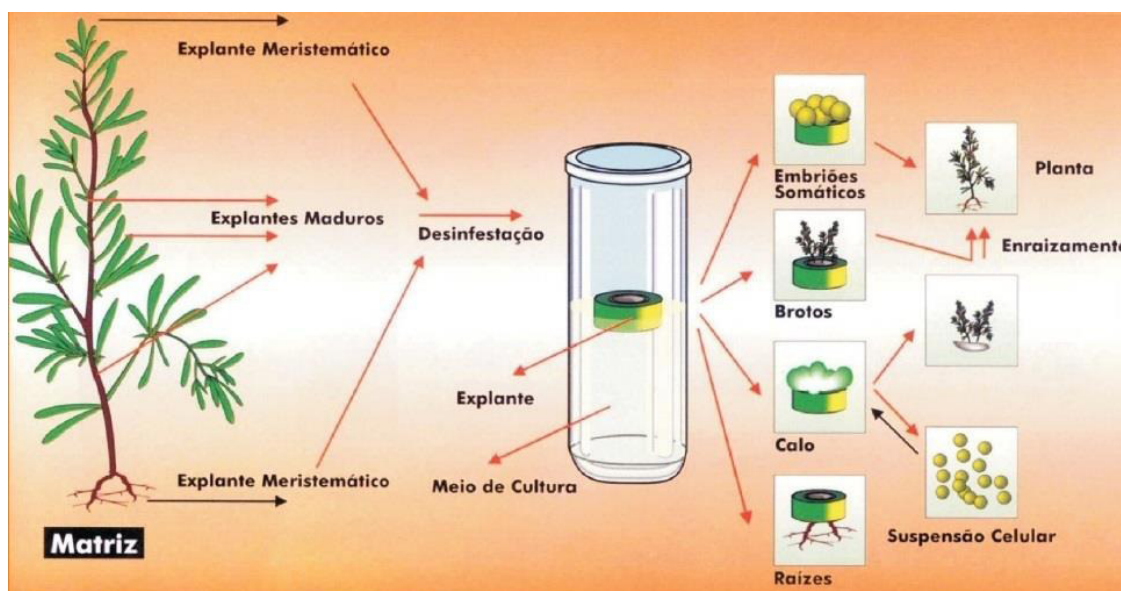
Devido sua importância econômica, estudos que envolvem o meloeiro são cada vez mais comuns. O melhoramento genético tradicional é amplamente aplicado à cultura do meloeiro, mas demanda anos para ser concluído. Com o uso de ferramentas, como a cultura de tecidos, e a aplicação de vias de regeneração, como a organogênica, o melhoramento genético dessa espécie pode ser muito mais eficiente e rápido, podendo levar apenas meses para se atingir cultivares com características melhoradas.

### 1.3 Cultura *in vitro* de tecidos vegetais

A cultura *in vitro* de tecidos vegetais pode ser definida como um conjunto de técnicas que se utiliza de um explante asséptico como material biológico cultivado em meio nutritivo sob condições de luminosidade e temperatura controladas. Os princípios básicos explorados pela cultura de tecidos estão na totipotencialidade vegetal, a capacidade de uma única célula conseguir se desenvolver em um organismo completo (Figura 2). A competência celular é a capacidade das células responderem a sinais específicos, enquanto que a determinação celular é o processo pelo qual a célula é direcionada a um desenvolvimento específico. E a morfogênese é a interação entre a diferenciação e o crescimento com o desenvolvimento de órgãos ou embriões (COOPER, 2001).

Historicamente a cultura de tecidos vegetais percorreu um longo caminho até ser finalmente desenvolvida. O início de sua trajetória se dá com Haberlandt, em 1902, o fundador da cultura de tecidos vegetais. Seu primeiro ensaio foi com a cultura de *Lamium purpureum* L. em meio nutritivo Knop, obtendo apenas o crescimento celular sem divisão, não confirmando a princípio a totipotencialidade das células. Passando então por Kögl (1934) que identificou o primeiro fitormônio, a auxina, ácido indolacético e Miller (1955) que descobriu a primeira citocinina, a cinetina (6-furfurilaminopurina). Skoog e Miller (1957) evidenciaram o balanço hormonal entre citocininas e auxinas em experimentos com células de tabaco, esses autores observaram o crescimento da radícula e da parte aérea em diferentes concentrações de auxinas e citocininas, concentrações altas de citocininas induziram o crescimento de brotos e parte aérea, enquanto que maiores concentrações de auxinas estimularam o surgimento e desenvolvimento de raízes. E em uma proporção similar de citocininas com auxinas ocorreu o crescimento de calos, massas desorganizadas de tecido não-diferenciado. Em 1962, Murashige e Skoog desenvolveram a mais utilizada formulação nutritiva na cultura de tecidos vegetais até hoje, denominado de meio MS.

Figura 2 – Princípio geral da cultura *in vitro* de tecidos vegetais.



Fonte: KERBAUY, 1997

A importância histórica do desenvolvimento da cultura de tecidos vegetais é tão grande que ela permitiu a elucidação de questões básicas sobre fisiologia, bioquímica, biologia e genética de plantas. O uso de suas técnicas também elevou a produção comercial de mudas de forma a manter o aspecto genético intacto, fundamental para a conservação *in*

*in vitro* e a manutenção de características desejadas (GAMBORG, 2002). A sua combinação com técnicas clássicas e modernas de melhoramento vegetal e biologia molecular proporcionaram um enorme crescimento no suprimento de alimentos de origem vegetal no mundo. Mais especificamente as suas vantagens incluem a micropropagação de clones idênticos a planta matriz (ALTMAN *et al.*, 1998), auxílio a estudos de fitorremediação (LEUNG, 2017), melhora do aspecto fitossanitário pela produção de mudas livres de patógenos inclusive de vírus (BHOJWANI *et al.*, 2013), auxílio na identificação de mecanismos da variação somaclonal (STEPHENS *et al.*, 1991), diminuição do tempo necessário para produzir grandes quantidades de plantas e menor número de explantes para a obtenção de grandes volumes de material vegetal (EMBRAPA, 2006).

Alguns exemplos de técnicas que se utilizam da cultura de tecidos como veículo para atingir objetivos diversos podem ser a micropropagação, microenxertia, limpeza clonal, rotas de morfogênese e cultura de protoplastos, embriões, ovários, calos e plantas transgênicas. Todas essas técnicas são aplicações da cultura de tecidos vegetais tanto com finalidades acadêmicas como a elucidação de mecanismos biológicos quanto no aprimoramento de culturas vegetais para fins comerciais de produção e recuperação ambiental (THORPE, 2007).

A cultura *in vitro* de tecidos vegetais segue passos básicos comuns a todas as técnicas. Iniciando-se com a escolha do explante e do meio nutritivo a ser utilizado, continuando com a desinfestação do material, a inoculação do explante no meio de cultura e a definição das condições ambientais até o desenvolvimento do material vegetal. A escolha dos explantes varia conforme o objetivo final, sendo cada tipo de explante também definido pela idade. Estes podem ser cotilédones, hipocótilos, segmentos foliares, raízes, dentre outros. Decidir qual formulação nutritiva utilizar também vai variar conforme o material vegetal usado como explante e o objetivo almejado. A formulação mais usada atualmente é o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), mas também existem os meios Knop (KNOP, 1862), White (WHITE, 1934), B5 (GAMBORG, 1968), WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981), entre outros. Já a desinfestação, remoção dos microrganismos que estejam na superfície do explante, normalmente segue um mesmo princípio, como o uso de hipoclorito de sódio ou cálcio, álcool, detergentes, dentre outros, mas suas concentrações e tempos de exposição também vão depender das condições do material vegetal utilizado. As condições ambientais são definidas conforme o objetivo da cultura e o tipo de material cultivado. Elas variam de

acordo com os níveis de oxigênio e gás carbônico, intensidade luminosa, temperatura e umidade (EMBRAPA, 2006).

O meio de cultura MS é uma mistura balanceada de carboidrato, macronutrientes, micronutrientes, fontes orgânicas de nitrogênio, complementos orgânicos, vitaminas, agente gelificante e água, além de reguladores de crescimento, estes últimos de forma opcional. O carboidrato utilizado é sacarose usada como fonte de carbono pela planta. Os complementos orgânicos e vitaminas são o mio-inositol, glicina, tiamina (B1), ácido nicotínico e piridoxina (B6). Os macronutrientes são fornecidos em forma de sais contendo nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, enxofre e magnésio. Os micronutrientes são em concentrações micromolares de zinco, ferro, cobre, manganês e molibdênio. As fontes de nitrogênio estão na forma de amônia e nitrato. O agente gelificante mais usado é o ágar, derivado de algas. Os reguladores de crescimento usados são as citocininas, sendo as mais empregadas BAP (6-benzilaminopurina), thidiazuron ou TDZ (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) ureia), cinetina ou CIN (6-furfurilaminopurina), IPA (isopentil adenina), 2ip (N<sup>2</sup>-2-isopentiladenina) e zeatina ou ZEA [N<sup>6</sup>-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina] e as auxinas, sendo as mais usadas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoacético), ANA (ácido 1-naftalenoxiacético), AIA (ácido 3-indolacético), AIB (ácido indolbutírico) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico) (EMBRAPA, 2010).

#### **1.4 Organogênese**

De todos os mecanismos de regeneração que as plantas possuem, como a cicatrização e formação de calos, a organogênese é o mais comum deles. A organogênese é conhecida como o processo que origina novos órgãos na planta, gerados a partir de células somáticas ou embrionárias. Para que isso aconteça as células já diferenciadas exploram, mais uma vez, sua totipotencialidade, precisando passar por um processo de desdiferenciação, no qual a célula volta a um estágio semelhante a células meristemáticas, e só então elas rediferenciam em qualquer tipo celular como células de folhas e raízes, chegando até a desenvolver gemas e brotos adventícios. Gemas adventícias são estruturas com meristema apical originadas pela desdiferenciação de células do parênquima e brotos são estruturas caulinares com folhas originadas do desenvolvimento de gemas (CARVALHO *et al.*, 2011). Assim como na embriogênese somática, a organogênese também pode ocorrer de forma indireta, passando pelo estágio de calo até a formação de novos órgãos ou direta, sem ocorrer calogênese (EMBRAPA, 2010).

Na natureza, durante o desenvolvimento, as plantas possuem reguladores da regeneração que são silenciados impedindo a reprogramação celular em momentos inadequados. Mas estímulos exógenos podem ativar esses reguladores. Por exemplo, para algumas espécies da família Crassulaceae quando uma folha é destacada da planta matriz, ela começa a desenvolver raízes e brotos dando origem a uma nova planta (ALANI, 2009). Apesar do corte ser um estímulo externo, ele só ativa a organogênese por controle hormonal induzindo a produção ou acúmulo de fitormônios gerando respostas organogênicas. Fitormônios, como as auxinas, induzem a expressão de genes que participam da formação de um novo meristema radicular (CALLIS, 2005). Utilizando-se desses reguladores de crescimento pode-se conseguir artificialmente a regeneração *in vitro* de uma planta inteira a partir de apenas um pequeno seguimento dela.

A indução da organogênese *in vitro* varia muito a depender do tipo, idade e genótipo do explante. Essas três principais variáveis direcionam qual a concentração e qual regulador de crescimento utilizar. Grozeva e Velkov (2014) utilizaram dois tipos de explantes com cinco dias de idade, cotilédones e hipocótilos de *Cucumis sativum*, cultivar Gergana, na indução de organogênese e como resultados obtiveram 76 e 0% de indução de organogênese na concentração de BAP 3,0 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente em cotilédone e hipocótilo como explantes e obtiveram 80 e 0% de indução de organogênese na concentração de BAP 2,0 mgL<sup>-1</sup> respectivamente em hipocótilo e cotilédone como explantes. Shukla (2014) utilizou cotilédones com 2, 3 e 5 dias de idade como explantes de *Cucumis sativus* cultivar Pusa Uday, na regeneração por organogênese e obteve o melhor resultado da indução da regeneração com 35% em explantes com três dias de idade, 31% com cinco dias de idade e 29% com dois dias de idade na concentração de 0,45 mgL<sup>-1</sup> de BAP. Esses dois exemplos apresentam resultados diferentes com relação ao tipo e idade do explante sobre a concentração do regulador de crescimento na indução da organogênese. Nota-se também que a comparação dos dois exemplos demonstra a influência do genótipo sobre esses fatores, pois são resultados da mesma espécie, mesmo tipo explante e mesma idade, mas de tipos distintos e, mesmo assim, apresentam diferenças na indução da resposta morfogênica.

A importância de estudos de regeneração de plantas através da organogênese é significativa observando que eles ajudam a formular novas rotas de multiplicação de plantas. Apesar das aplicações serem muito semelhantes as da embriogênese somática, incluindo como fonte de variabilidade genética, a organogênese é mais utilizada como fonte de variabilidade genética através da forma indireta com calos, pois o estágio de calo é uma

grande fonte de variação somaclonal ocasionada pelo crescimento desorganizado das células. (FLORES *et al.*, 2007). A variação somaclonal é desejada quando se necessita de mais fontes com genótipos diferentes e para realizar estudos fisiológicos, como quando se almeja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular.

### 1.5 Cultura de tecidos de meloeiro

A cultura de tecidos aplicada à espécie *C. melo* é muito utilizada atualmente. Para o sucesso da aplicação comercial da biotecnologia em melão é necessário um sistema eficiente de regeneração *in vitro* (NUNEZ *et al.*, 2008). Mas primeiramente é preciso estabelecer protocolos iniciais específicos para a cultura *in vitro* de meloeiro, como estabelecimento da germinação *in vitro* para obtenção de fonte de explantes assépticos.

A germinação *in vitro* de sementes de *C. melo* ainda possui muitas limitações em ser atingida corretamente, pois elas podem apresentar dormência ou germinação muito lenta. A obtenção de uma germinação uniforme de sementes de meloeiro *in vitro* propiciaria a excisão de explantes na mesma fase de desenvolvimento em condições assépticas. Dessa forma, um protocolo de germinação *in vitro* de sementes auxiliaria no desenvolvimento de estudos que demandam grande quantidade de explantes uniformes (ALVES *et al.*, 2011).

A diversidade genética presente no meloeiro é responsável pelo elevado grau de polimorfismo nos frutos e nas variedades botânicas encontradas nesta espécie (MLIKI *et al.*, 2001). Nunez (2008) concluiu que a resposta *in vitro* do melão está sob o controle genético, mas os reguladores de crescimento também têm grande importância nesse processo. Essa elevada variabilidade genética dificulta o desenvolvimento de protocolos gerais para a regeneração de diferentes variedades e tipos dessa espécie. A via organogênica é uma das alternativas *in vitro* que pode ser empregada na regeneração de plantas, sendo direta ou indireta. Porém, componentes não genotípicos do cultivo *in vitro*, como fatores ambientais, também podem afetar a eficiência de regeneração de plantas de meloeiro através de organogênese (NUNEZ *et al.*, 2008).

Na literatura são relatadas algumas tentativas de regeneração de plantas de meloeiro por organogênese. Mendi e colaboradores (2010) obtiveram a indução de organogênese direta a partir de segmentos de cotilédones da var. *flexuosus* cultivar híbrido 46 KSU. Liu e colaboradores (2013) relataram a indução de organogênese indireta na var. *ameri*, pelo desenvolvimento de gemas adventícias em calos a partir de segmentos de cotilédones das cultivares Jin Queen, Hongmibao e Huangzhuixian em meio MS suplementado com BAP. A regeneração da variedade de meloeiro *cantalupensis* também foi observada por Sebastiani e

Ficcadenti (2016) utilizando a cultura de tecidos para indução da organogênese direta de cotilédones como explantes em meio MS contendo BAP em combinação com AIA. O sucesso na obtenção de plantas regeneradas pelo uso de cotilédones como explantes é muito frequente na indução de organogênese em meloeiro (KISS-BÁBA *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2013). A regeneração também foi obtida na variedade *reticulatus* cultivar híbrido Muskmelon via organogênese indireta a partir de calos de explantes de folhas em meio de cultura MS contendo BAP (RHAMAN *et al.*, 2012).

Como já mencionado anteriormente, o genótipo do meloeiro possui grande influência sobre a organogênese induzida por reguladores de crescimento (STIPP *et al.*, 2001). Tendo em vista a grande variabilidade genética do meloeiro é necessária a realização de estudos para cada genótipo em questão visando à identificação de concentrações e combinações de reguladores de crescimento ideais para a indução de organogênese e posterior regeneração de plantas. A regeneração de meloeiro via organogênese auxiliará projetos como a micropropagação de clones superiores e a obtenção de plantas haploides, a partir do cultivo *in vitro* de pólen ou óvulos, para posterior geração de plantas duplo-haploides.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar condições favoráveis de germinação *in vitro* de sementes de meloeiro e induzir organogênese nos tipos Pele de Sapo e Cantaloupe.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar o efeito do tempo de embebição de sementes com tegumento em água e a remoção do tegumento das sementes sobre o tempo de germinação *in vitro*.
2. Avaliar o efeito de diferentes concentrações da citocinina BAP sobre a formação de calos e a indução de gemas e brotos adventícios *in vitro* nos diferentes genótipos de meloeiro Pele de Sapo e Cantaloupe, a partir de explantes de cotilédone.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Experimento de germinação *in vitro*

O experimento de germinação *in vitro* foi conduzido alterando-se apenas as variáveis embebição (0, 16, 24 e 48 horas) e a retirada ou não do tegumento (Figura 3). Todos os frascos e a água destilada necessária para a embebição e para o preparo das soluções de desinfestação foram previamente autoclavados a 121 °C por 30 min. Os procedimentos de embebição, desinfestação e inoculação das sementes foram realizados em câmara de fluxo laminar em condição asséptica, incluindo o preparo das soluções.

Sementes do tipo de meloeiro Cantaloupe (cultivar comercial Cantaloupe Italiano) foram submetidas a 10 tratamentos distintos de pré-germinação *in vitro*. Todas as sementes utilizadas foram obtidas do fornecedor Sakata® e já estavam previamente tratadas com fungicida. A desinfestação foi feita em solução de álcool 70% por 1 minuto, seguida de 7,5 minutos em solução de 0,1% de hipoclorito de sódio e por fim as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada, sendo que cada lavagem teve duração de 1 minuto. Em todos os tratamentos as sementes foram desinfestadas como primeira etapa. Com o auxílio de pinças, todas as sementes foram inoculadas, com a parte apical inserida no meio nutritivo, ou seja, com o ponto de incisão no ovário voltado para o meio de cultura, e de forma que metade do comprimento da semente ficasse inserida no meio (Figura 4). O meio de cultura base utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com gelrite (Gelzan®) a 1,8 g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 121 °C, por 15 minutos. Foram utilizados os seguintes tratamentos, de acordo com o Quadro 1.

Figura 3 – Sementes do tipo de meloeiro Cantaloupe com tegumento, à esquerda e sem tegumento à direita.



Fonte: Elaborada pelo autor.

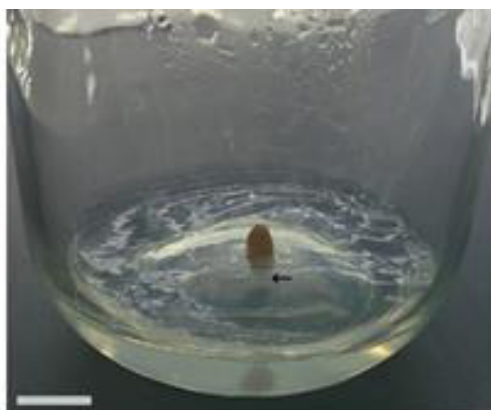
Quadro 1 – Tratamentos de pré-germinação utilizados na germinação *in vitro* de sementes do tipo de meloeiro Cantaloupe.

Tratamento	T1 (controle)	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Embebição*	não	Água d.a. 4 horas	Água d.a. 16 horas	Água d.a. 24 horas	Água d.a. 48 horas	não	Água d.a. 4 horas	Água d.a. 16 horas	Água d.a. 24 horas	Água d.a. 48 horas
Retirada do Tegumento	não	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim	sim

\*Água d.a.: água destilada autoclavada

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 – Semente sem tegumento do meloeiro Cantaloupe inoculada *in vitro* com a parte apical (seta) inserida no meio de cultura. Barra: 1 cm.



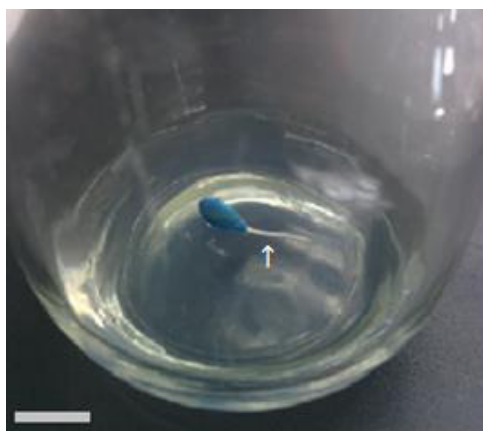
Fonte: Elaborada pelo autor.

As culturas, foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, no escuro por três dias e após esse período as culturas foram transferidas para fotoperíodo de 8/16 horas (escuro/luz) e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 10 tratamentos de pré-germinação, em 4 repetições de 5 frascos contendo uma semente cada, totalizando 20 sementes por tratamento.

### 3.1.1 Análise da germinação

No terceiro, sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia, contou-se o número de sementes germinadas. A semente foi considerada germinada quando apresentava o crescimento da radícula (Figura 5). Os dados foram analisados apenas por porcentagem de germinação por semana até o final de 28 dias.

Figura 5 – Semente com tegumento do meloeiro Cantaloupe inoculada *in vitro* apresentando crescimento da radícula (seta). Barra: 1 cm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.2 Experimento de organogênese

O experimento de organogênese foi elaborado alterando-se apenas as concentrações de BAP no meio nutritivo. Todos os frascos e a água destilada necessária para o preparo das soluções de desinfestação foram previamente autoclavados a 121 °C por 30 min. Os procedimentos de desinfestação, inoculação e excisão dos cotilédones foram realizados em câmara de fluxo laminar asséptica, incluindo o preparo das soluções.

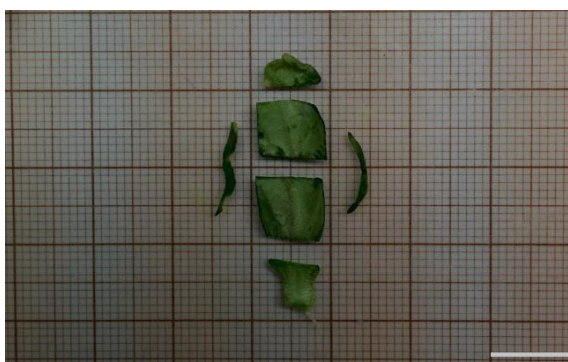
Quarenta sementes dos meloeiros Cantaloupe (cultivar comercial Cantaloupe Italiano) e Pele de Sapo (cultivar comercial Asturia) foram submetidas a cinco tratamentos de organogênese. Todas as sementes utilizadas foram obtidas do fornecedor Sakata® e já estavam previamente tratadas com fungicida. A desinfestação foi feita em solução de álcool 70% por 1 minuto, seguido de 7,5 minutos em solução de 0,1% de hipoclorito de sódio e por fim lavadas três vezes com água destilada autoclavada. Em todos os tratamentos as sementes foram desinfestadas como primeira etapa. Todas as sementes foram inoculadas sem tegumento com o ponto de incisão do ovário voltado para o meio de cultura, e de forma que metade do comprimento da semente ficasse inserida no meio nutritivo. A formulação nutritiva utilizada foi o meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com gelrite (Gelzan®) a 1,8 g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 121 °C, por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C, na ausência de luz por três dias e após esse período as culturas foram transferidas para fotoperíodo de 8/16 horas (escuro/luz) e intensidade luminosa de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Para indução de organogênese foram utilizados, como explantes, os cotilédones das plântulas germinadas *in vitro* dos dois meloeiros, com 12 dias de idade após a germinação. Em câmara de fluxo laminar as plântulas foram selecionadas ao acaso e tiveram seus cotilédones excisados, com o auxílio de bisturis e pinças, sendo cada cotilédone seccionado transversalmente em dois segmentos em relação à nervura e removendo-se as extremidades e as bordas do cotilédone (Figura 6). Os segmentos tinham em média 8 mm<sup>2</sup> e foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura MS, em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de meio em 5 tratamentos distintos variando-se apenas a concentração de BAP. Os tratamentos utilizados foram:

- T1. MS sem reguladores de crescimento (controle);
- T2. MS adicionado de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP);
- T3. MS adicionado de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP;
- T4. MS adicionado de 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP;
- T5. MS adicionado de 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP;

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 8/16 horas (escuro/luz) e intensidade luminosa de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos nos dois meloeiros e 5 repetições de 5 tubos de ensaio contendo um explante cada, totalizando 25 explantes por tratamento por cultivar. Após 38 dias de cultivo, as gemas e brotos formados foram removidos com o auxílio de pinças e bisturis em capela de fluxo laminar e inoculados em meio MS sem a adição de fitorreguladores para manutenção do material obtido.

Figura 6 – Explantes de cotilédone de meloeiro tipo Pele de Sapo, seccionado transversalmente em dois segmentos, removendo-se as extremidades e as bordas. Barra: 1 cm.

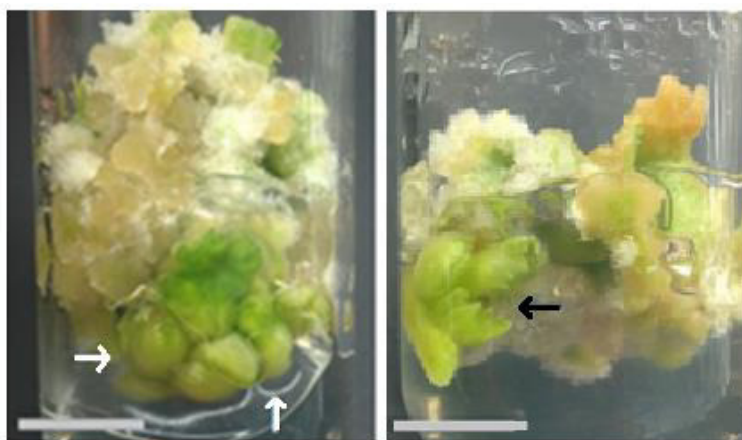


Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.2.1 Análises da organogênese

As culturas foram avaliadas a cada 7 dias quanto à observação da formação de calos e gemas adventícias por até 35 dias. Aos 38 dias foram avaliadas a média da massa fresca total dos explantes, a porcentagem de formação de gemas adventícias e de calos pequenos (até 1500 mg), médios (a partir de 1501 até 3000 mg) e grandes (a partir de 3001 mg), cor e textura dos calos, o número médio de gemas adventícias por explante e o número médio de brotos por explante. Visualmente, foram consideradas como gemas estruturas globulares e lisas de coloração verde com tonalidade diferente do restante do calo e como brotos foram consideradas as gemas com o surgimento de folhas (Figura 7). Outra característica avaliada foi o número médio de gemas e brotos adventícios por calo, dividindo-se o número de gemas e de brotos totais pelo número de calos que formaram gemas e brotos, respectivamente. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de médias de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Figura 7 – Calos de meloeiro Cantaloupe apresentando desenvolvimento de gemas adventícias (setas brancas) e broto (seta preta). Barra: 1 cm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação do experimento de germinação

#### 4.1.1 Análise da germinação

A germinação *in vitro* das sementes de meloeiro Cantaloupe atingiu 100% em apenas 3 dias, após a inoculação, em todos os tratamentos em que as sementes foram inoculadas sem tegumento (Tabela 1). Não houve contaminações de qualquer tipo em todos os explantes utilizados. A ausência de contaminação pode ser atribuída pela desinfestação feita sempre como primeira etapa de todos os tratamentos.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes do meloeiro Cantaloupe em diferentes tratamentos de pré-germinação com e sem tegumento, três dias após a inoculação das sementes.

Porcentagem de germinação ao 3º dia (%)				
Com tegumento				
T1	T2	T3	T4	T5
0	0	0	0	0
Sem tegumento				
T6	T7	T8	T9	T10
100	100	100	100	100

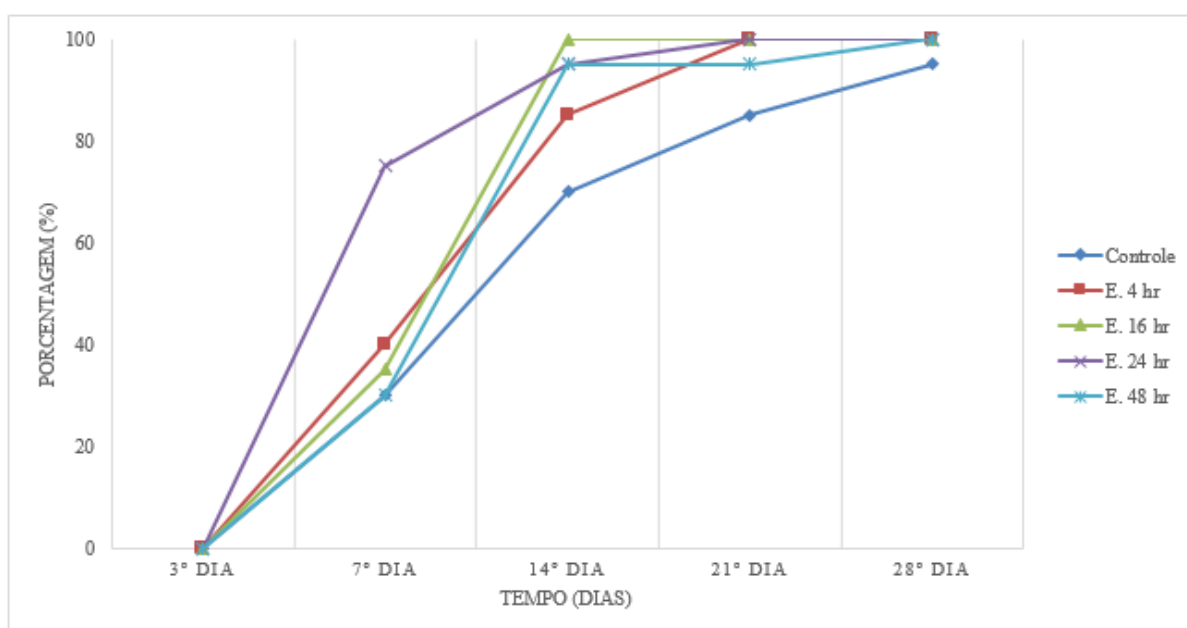
\*Legenda – T1: Com tegumento, sem embebição; T2: Com tegumento, embebido por 4 horas; T3: Com tegumento, embebido por 16 horas; T4: Com tegumento, embebido por 24 horas; T5: Com tegumento, embebido por 48 horas; T6: Sem tegumento, sem embebição; T7: Sem tegumento, embebido por 4 horas; T8: Sem tegumento, embebido por 16 horas; T9: Sem tegumento, embebido por 24 horas; T10: Sem tegumento, embebido por 48 horas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Silva e colaboradores (2012) observaram resultados semelhantes na germinação de porongo (*Lagenaria siceraria*) no qual apenas a remoção do tegumento propicia a germinação *in vitro* dessa espécie de cucurbitácea. Nogueira e colaboradores (2004) observaram que a remoção do tegumento de sementes de *Byrsonima intermedia* aumentou em 48% a germinação em meio MS 50% em comparação com as sementes com tegumento. Eles acreditam que o tegumento retarda o processo germinativo, por servir como barreira para a entrada de água, inibindo, assim, a ativação de enzimas responsáveis pela germinação. Esse resultado se assemelha aos observados neste trabalho confirmando, assim, a necessidade da remoção do tegumento para uma maior eficiência de germinação da semente.

A embebição das sementes em água destilada autoclavada combinada com a remoção do tegumento não alterou a taxa de germinação em nenhum dos intervalos de tempo de embebição testados (T7 a T10). Quanto às sementes inoculadas com tegumento pode-se concluir que a embebição das sementes, em água destilada autoclavada, acelerou a germinação, e que o intervalo de tempo de embebição também influenciou na velocidade de germinação. O tratamento controle T1, sem embebição, resultou em somente 30% de germinação em sete dias enquanto que o tratamento T4, com 24 horas de embebição, alcançou 75% de germinação em apenas sete dias. Observa-se assim, que uma embebição por 24 horas aumenta a velocidade de germinação. As embebições por 4 e 16 horas não diferiram na velocidade de germinação, com 40 e 35% respectivamente. Entretanto, verificou-se que embebição acima do intervalo de 24 horas, como no tratamento T5, a velocidade de germinação *in vitro* começa a reduzir. E no tratamento com embebição de 16 horas a porcentagem de germinação atingiu 100% no 14º dia, enquanto que as sementes submetidas ao tratamento T4 apresentavam 95% de germinação nesse mesmo tempo. Eventualmente todos os tratamentos atingiram 100% de germinação ao final de 28 dias, com exceção do controle (Figura 8).

Figura 8 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de meloeiro tipo Cantaloupe em diferentes tratamentos de pré-germinação, no decorrer de 28 dias após a inoculação das sementes com tegumento.



\*Legenda – Controle: sem embebição; E. 4 hr: Embebido por 4 horas; E. 16 hr: Embebido por 16 horas; E. 24 hr: Embebido por 24 horas; E. 48 hr: Embebido por 48 horas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Taxas semelhantes de germinação, devido ao procedimento de embebição das sementes por 24 horas em água destilada autoclavada, também foram constatadas por Souza e colaboradores (2016) na indução de germinação *in vitro* de sementes de *Genipa americana* pela embebição das sementes em água destilada autoclavada por 48 horas obtendo taxa máxima de 70% de germinação. É possível que a embebição em água tenha efeito na germinação por propiciar um ambiente hidratado dentro da semente com tegumento o que facilita a ação de hidrolases na germinação e quebra da dormência de sementes de meloeiro. A embebição por 48 horas reduziu a velocidade de germinação possivelmente devido à redução na disponibilidade de oxigênio para as sementes comprometendo a sua qualidade e, conseqüentemente, diminuindo a eficiência de germinação (BARROS *et al.* 2005). A embebição de sementes com tegumento em água destilada autoclavada por 24 horas aumentou a velocidade de germinação em 35% em sete dias comparada com os outros tempos de embebição, mas apenas a remoção do tegumento proporcionou 100% de germinação em 3 dias e de forma uniforme.

#### 4.2 Avaliação do experimento de organogênese

De acordo com os resultados da análise de significância pelo teste F, e comparação das médias por Scott-Knott, o meloeiro Cantaloupe apresentou diferenças significativas em todos os fatores analisados, com exceção da porcentagem de formação total de calos (Tabela 2). Já a do tipo Pele de Sapo apresentou resultados significativos entre os tratamentos, com exceção das variáveis porcentagem de formação total de calos, formação de gemas adventícias e número de gemas adventícias por calo (Tabela 3).

Tabela 2 – Quadrado médio e níveis de significância pelo teste F do fator tratamento dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Cantaloupe nas variáveis porcentagem de formação de calo pequeno, médio e grande, de calo total, de calo formando gema, massa fresca total, número de gemas por calo e número de brotos por calo.

FV	GL	Quadrado médio							
		Calo pequeno (%)	Calo médio (%)	Calo grande (%)	Calo total (%)	Massa fresca total (g)	Calo formando gema (%)	Número de gemas por calo	Número de brotos por calo
<b>Tratamento</b>	4	9.376,0000*	969,0000*	7.495,0000*	16,0000 (ns)	10,6552*	5.960,0000*	10,5993*	1,4650*
<b>Residuo</b>	20	88,0000	227,0000	326,0000	16,0000	0,0656	208,0000	0,7148	0,5100
<b>Total corrigido</b>	24	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CV (%)</b>	-	37,07	77,66	36,85	4,03	10,43	30,05	34,38	93,97

\* %5 de significância pelo teste F; ns – não significativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Quadrado médio e níveis de significância pelo teste F do fator tratamento dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Pele de Sapo nas variáveis porcentagem de formação de calo pequeno, médio e grande, de calo total, de calo formando gema, massa fresca total, número de gemas por calo e número de brotos por calo.

FV	GL	Quadrado médio							
		Calo pequeno (%)	Calo médio (%)	Calo grande (%)	Calo total (%)	Massa fresca total (g)	Calo formando gema (%)	Número de gemas por calo	Número de brotos por calo
Tratamento	4	1.880,0000*	1.520,0000*	264,0000*	6.400,0000 <sup>(ns)</sup>	2,5059*	520,0000 <sup>(ns)</sup>	2,4000 <sup>(ns)</sup>	-
Residuo	20	224,0000	176,0000	56,0000	40,0000	0,0171	216,0000	1,8200	-
Total corrigido	24	-	-	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	31,18	47,38	116,93	7,53	10,38	122,47	149,90	0,00

\* %5 de significância pelo teste F; ns – não significativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.1 Análise da formação de calos

Com 14 dias de inoculação nos tratamentos que continham BAP ocorreu a formação de calos em todos os explantes de ambos os tipos. Após 38 dias, a análise da formação de calos nos cotilédones de Cantaloupe revelou indução de calos em 100% dos explantes em qualquer concentração de BAP, sem diferença significativa até mesmo com o tratamento controle sem regulador de crescimento (Figura 9). A maior taxa de formação de calos pequenos (até 1500 mg) ocorreu no tratamento controle em 96% dos explantes, calos médios (a partir de 1501 até 3000 mg) tenderam a se formar em menor porcentagem em quase todas as concentrações de BAP com no máximo 34% e calos grandes (a partir de 3001 mg) somente se formaram em ampla proporção em concentrações de BAP igual ou superior a 2,0 mg L<sup>-1</sup> atingindo 83% (Tabela 4).

Nos explantes de Pele de Sapo, após 38 dias, também foi observada indução de calos em 100% dos explantes em qualquer concentração de BAP, sem diferença significativa entre os tratamentos, mas no tratamento controle houve pouquíssimas formações calosas (Figura 9). As maiores porcentagens de calos pequenos foi evidente nas concentrações de BAP 1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>, sem diferença significativa entre esses tratamentos. Calos médios foram formados em todas as concentrações de BAP, sem diferença significativa entre os tratamentos, mas alcançando 44% de formação na concentração de 4,0 mg L<sup>-1</sup>, e os melhores resultados de calos grandes foram observados, no geral, em pequenas proporções em concentrações de BAP igual ou acima de 3,0 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 5).

Tabela 4 - Porcentagem de formação de calos pequenos (até 1500 mg), médios (a partir de 1501 até 3000 mg), grandes (a partir de 3001 mg) e totais do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios nutritivos MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes.

Tratamentos	Calo pequeno (%)	Calo médio (%)	Calo grande (%)	Calo total (%)
<b>MS sem regulador de crescimento (controle)</b>	96,0 a	0,0 b	0,0 b	96,0 a
<b>MS + BAP 1,0 mg/L</b>	55,0 b	30,0 a	15,0 b	100,0 a
<b>MS + BAP 2,0 mg/L</b>	0,0 c	34,0 a	66,0 a	100,0 a
<b>MS + BAP 3,0 mg/L</b>	0,0 c	21,0 a	79,0 a	100,0 a
<b>MS + BAP 4,0 mg/L</b>	3,0 c	14,0 b	83,0 a	100,0 a
<b>Média geral</b>	30,8	19,8	48,6	99,2

\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Porcentagem de formação de calos pequenos (até 1500 mg), médios (a partir de 1501 até 3000 mg), grandes (a partir de 3001 mg) e totais do tipo de meloeiro Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes.

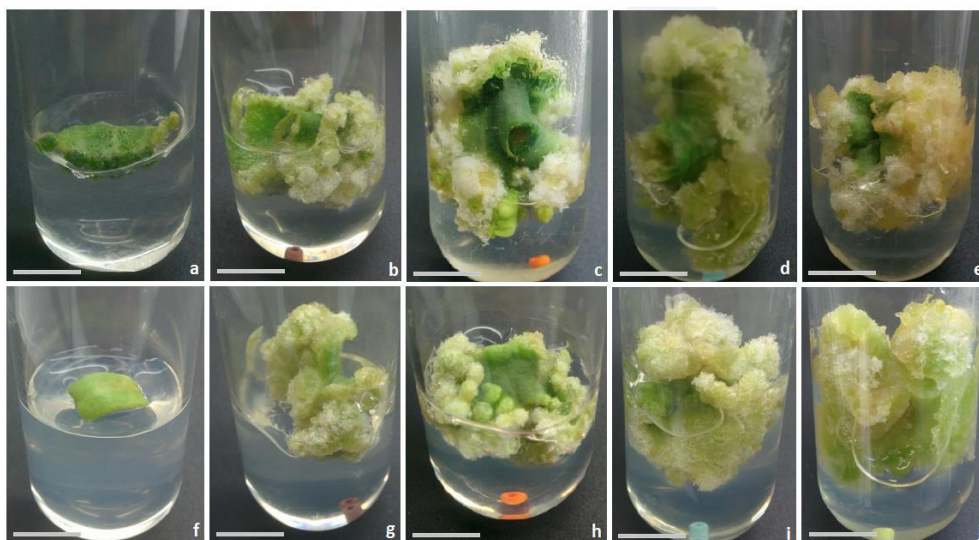
Tratamentos	Calo pequeno (%)	Calo médio (%)	Calo grande (%)	Calo total (%)
<b>MS sem regulador de crescimento (controle)</b>	20,0 c	0,0 b	0,0 b	20,0 b
<b>MS + BAP 1,0 mg/L</b>	74,0 a	26,0 a	0,0 b	100,0 a
<b>MS + BAP 2,0 mg/L</b>	56,0 a	40,0 a	4,0 b	100,0 a
<b>MS + BAP 3,0 mg/L</b>	54,0 a	34,0 a	12,0 a	100,0 a
<b>MS + BAP 4,0 mg/L</b>	40,0 b	44,0 a	16,0 a	100,0 a
<b>Média geral</b>	48,8	28,8	6,4	84,0

\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dentro do gênero *Cucumis*, esses resultados mostram-se diferentes daqueles observados por Selvaraj e colaboradores (2006) que apenas observaram indução de calos de *Cucumis sativus* em meio MS suplementado com BAP. Eles obtiveram a menor porcentagem de formação de calos no meio MS com apenas BAP 1,0 mg L<sup>-1</sup>, com no máximo 15,2% de formação.

Figura 9 – Explantes de segmentos cotiledonares com 38 dias dos tipos de meloeiro Cantaloupe (a, b, c, d, e) e Pele de Sapo (f, g, h, i, j). a. f. MS sem regulador de crescimento (controle). b. g. MS com BAP 1,0 mg L<sup>-1</sup>. c. h. MS com BAP 2,0 mg L<sup>-1</sup>. d. i. MS com BAP 3,0 mg L<sup>-1</sup>. e. j. MS com BAP 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Barra: 1 cm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

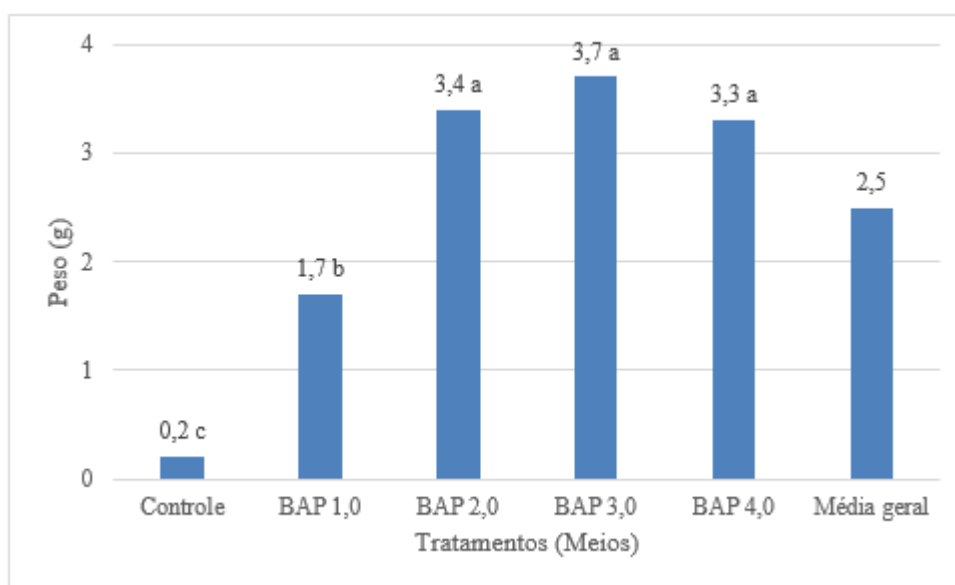
#### 4.2.2 Análise da massa fresca dos calos

A massa fresca dos calos de Cantaloupe foi menor no meio de cultura sem a adição de regulador de crescimento. No meio contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, a massa fresca total dos calos foi inferior daquela do meio contendo a partir de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Em média, a massa fresca dos calos desse tipo atingiu um máximo de 3,7 g no meio com BAP 3,0 mg L<sup>-1</sup>. Mas esse resultado não divergiu significativamente com as médias da massa fresca dos calos dos meios com BAP 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 10). O meloeiro Pele de Sapo atingiu apenas 1,8 g de média da massa fresca dos calos nos tratamentos com BAP 3,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, sem diferença entre esses tratamentos. E assim como o Cantaloupe, a massa fresca dos calos de Pele de Sapo foi muito baixa no meio de cultura sem a adição de regulador de crescimento (Figura 11).

Esses resultados evidenciam que a diferença genética entre os tipos da mesma espécie pode ser responsável pela grande divergência na formação de calos em resposta à citocinina BAP. Estes resultados mostram-se diferentes dos obtidos por Moon e colaboradores (2000), que observaram máxima proliferação de calos, com massa média de 2,43 g por calo de *Cucumis melo* em meio MS suplementado com a citocinina BAP na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> e a auxina ANA na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Estes autores não revelaram a variedade utilizada, mas a necessidade do uso de BAP em conjunto com uma auxina para uma máxima

indução de calos com uma massa média menor que a obtida no presente trabalho, evidenciam a influência genotípica na formação de calos.

Figura 10 – Média da massa fresca total dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro*.



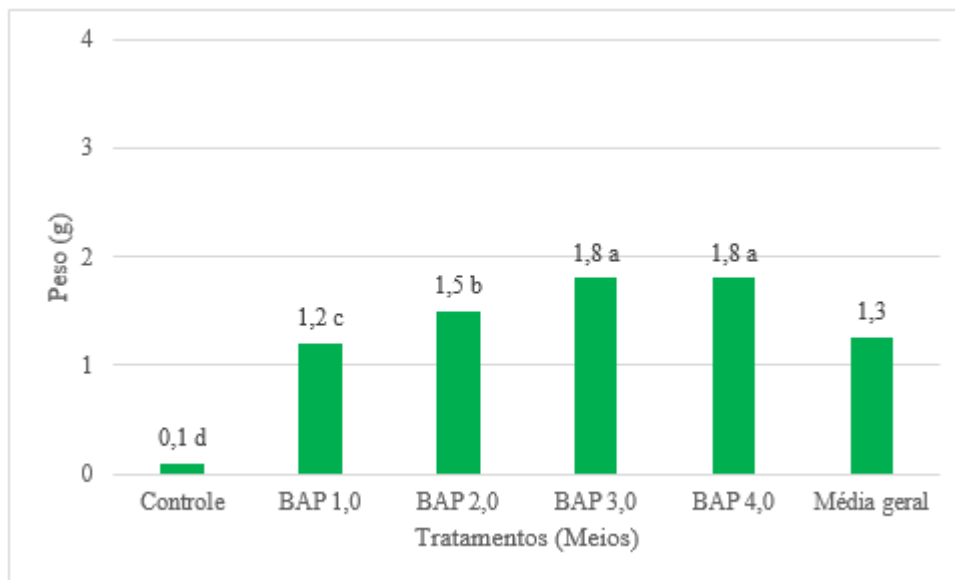
\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

\*\*Legenda - Controle: MS sem reguladores de crescimento; BAP 1,0: MS com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 2,0: MS com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 3,0: MS com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 4,0: MS com  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No geral, as massas frescas dos calos do Cantaloupe foram superiores aos do Pele de Sapo. Além disso, o Pele de Sapo necessita de uma maior concentração de BAP, tendo em vista que o valor para esta característica tende a se estabilizar a partir de  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto que para o Cantaloupe, essa dose é menor, apenas  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Figura 11 – Média da massa fresca total dos explantes de cotilédones do tipo de meloeiro Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro*.



\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

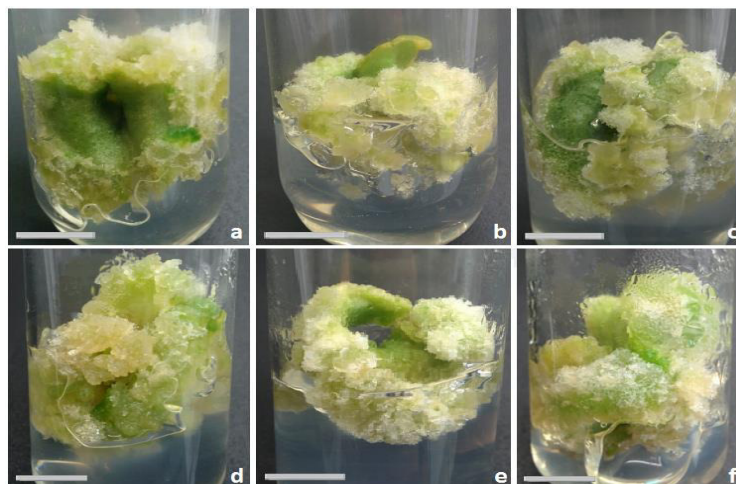
\*\*Legenda - Controle: MS sem reguladores de crescimento; BAP 1,0: MS com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 2,0: MS com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 3,0: MS com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 4,0: MS com  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.3 Análise da cor e textura dos calos

Os calos de Cantaloupe apresentaram, em sua maioria, coloração verde-clara e estrutura friável nos meios suplementados com BAP (Figura 12) e apenas os calos desenvolvidos no tratamento controle apresentaram textura compacta. Os calos de Pele de Sapo também possuíam, na maior parte, cor verde-clara (Figura 12), mas em todos os cinco tratamentos os calos possuíam textura compacta, com poucas áreas de ocorrência de textura friável. Aos 38 dias de cultivo em meio MS, independente das concentrações de BAP, os calos que possuíam gemas adventícias, em ambos os tipos, começaram a apresentar uma tonalidade amarelada. É possível que essas gemas funcionem como dreno de energia das outras partes do calo, realocando para essas regiões a maior parte do metabolismo. Lee e colaboradores (2014) formularam a hipótese de que o carboidrato acumulado por estresse osmótico em calos de *Oryza sativa* L. poderia estar sendo usado como fonte de energia e sinal osmótico requerido para a regeneração de brotos via organogênese.

Figura 12 – Calos formados aos 28 dias, após a inoculação *in vitro* de explantes de cotilédone de meloeiro tipos Cantaloupe e Pele de Sapo. a, b, c. Calos verde-claros do tipo Cantaloupe em meio MS com BAP 3,0; 1,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. d, e, f. Calos verde-claros do tipo Pele de Sapo em meio MS com BAP 3,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Barras: 1 cm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

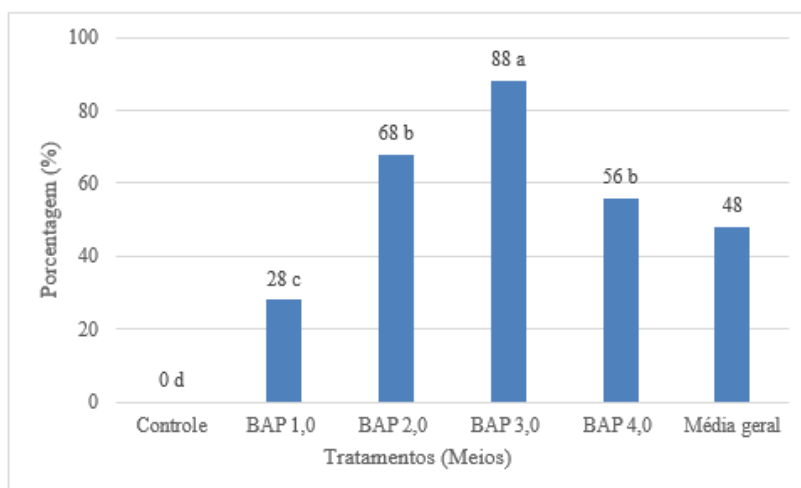
#### 4.2.4 Análise das gemas

##### 4.2.4.1 Formação de gemas adventícias

Após 21 dias da inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédone, constatou-se o desenvolvimento das primeiras formações de gemas adventícias nos calos de Cantaloupe em todos os tratamentos em quaisquer concentrações de BAP e no Pele de Sapo apenas nos meios MS contendo 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Posteriormente, aos 38 dias, em outras concentrações de BAP, constatou-se a formação de gemas adventícias no Pele de Sapo.

Após 38 dias, a maior taxa de formação de gemas adventícias foi observada no meio MS com BAP 3,0 mg L<sup>-1</sup>, nos calos de Cantaloupe (Figura 15 c, d) com 88% dos explantes apresentando este tipo de resposta organogênica (Figura 13). Entretanto, para o Pele de Sapo verificou-se um máximo de apenas 28% dos explantes que apresentaram a formação de gemas adventícias no meio MS contendo esta mesma concentração de BAP (Figura 15 h, i), mas, estatisticamente, sem qualquer diferença significativa entre todos os outros tratamentos, incluindo o controle sem adição de BAP (Figura 14). Resultados similares foram observados para o gênero *Cucumis* por Ugandhar e colaboradores (2011) que utilizaram segmentos de cotilédones de *Cucumis sativus* como explantes e obtiveram 60% de indução de gemas em meio MS suplementado com somente BAP 3,0 mg L<sup>-1</sup>.

Figura 13 – Porcentagem de formação de gemas adventícias do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

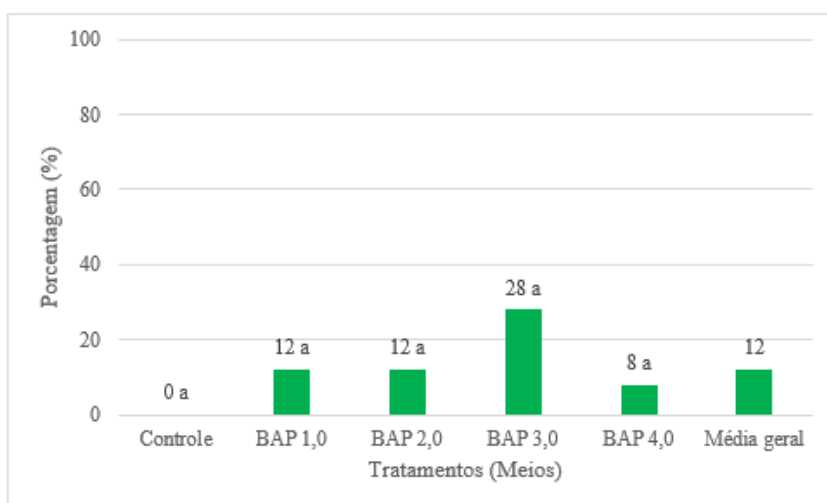


\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

\*\*Legenda - Controle: MS sem reguladores de crescimento; BAP 1,0: MS com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 2,0: MS com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 3,0: MS com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 4,0: MS com  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Porcentagem de formação de gemas adventícias do tipo de meloeiro Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

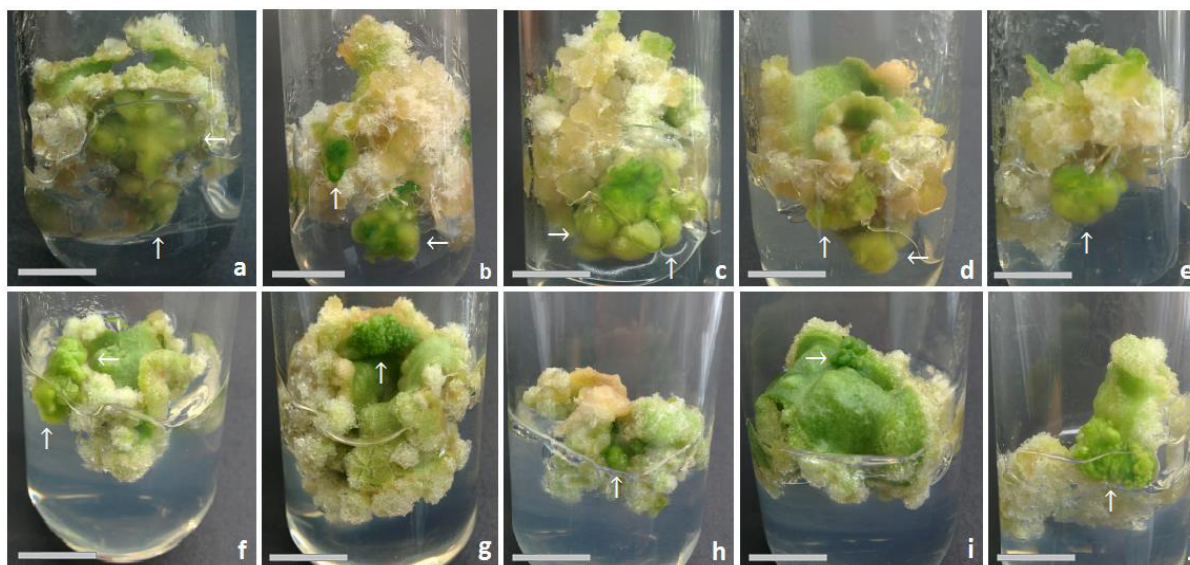


\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

\*\*Legenda - Controle: MS sem reguladores de crescimento; BAP 1,0: MS com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 2,0: MS com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 3,0: MS com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; BAP 4,0: MS com  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15 – Calos formados aos 38 dias, após a inoculação *in vitro* de explantes de cotilédone de meloeiro tipos Cantaloupe e Pele de Sapo, apresentando desenvolvimento de gemas adventícias (setas). a, b, e. Calos do tipo Cantaloupe em meio MS com BAP 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. c, d. Calos de Cantaloupe em meio MS com BAP 3,0 mg L<sup>-1</sup>. f, g, j. Calos do tipo Pele de Sapo em meio MS com BAP 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. h, i. Calos de Pele de Sapo em meio MS com BAP 3,0 mg L<sup>-1</sup>. Barras: 1 cm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A indução de gemas adventícias em explantes cotiledonares de meloeiro de cultivares comerciais, também foi relatada na variedade *reticulatus* cultivar híbrido Muskmelon por Rhaman e colaboradores (2012) em meio MS contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP com 88,12% de taxa de indução. A pequena diferença na porcentagem de indução de gemas adventícias, de 88,12 para 80%, e a grande variação da concentração de BAP, de 1,0 para 3,0 mg L<sup>-1</sup>, observadas nesse estudo e nos resultados obtidos no presente trabalho indicam que a variável genotípica está relacionada com a indução da organogênese, levando em conta que as culturas foram mantidas sob as mesmas condições, temperatura, 25 ± 1 °C, fotoperíodo, 8/16 horas (escuro/luz), e intensidade luminosa, 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, nos dois trabalhos. O efeito de BAP como uma potente citocinina na indução de gemas adventícias, sem haver a necessidade da adição de auxinas no meio, é relatado em vários outros estudos com cucurbitáceas (NTUI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013; GROZEVA & VELKOV, 2014), o que é condizente com os resultados observados neste trabalho.

#### 4.2.4.2 Número de gemas e brotos adventícios por calo

O meloeiro Cantaloupe apresentou um máximo de 3,8 gemas por explante no meio contendo BAP 2,0 mg L<sup>-1</sup>, mas sem diferença significativa entre as outras concentrações de BAP testadas. Quanto ao número de brotos por explante só foi significativo nos tratamentos com concentrações de BAP a partir de 2,0 mg L<sup>-1</sup> com no máximo 1,3 brotos por calo (Tabela 6). Com exceção dos brotos com folhas visíveis a olho nu, os menores brotos formados de Cantaloupe puderam ser visualizados com o auxílio de microscópico estereoscópico, sendo feita a identificação visual de folhas, dessa forma foi então confirmado que essas estruturas também se tratavam de brotos (Figura 17). Mesmo os brotos sendo o próximo estágio de desenvolvimentos das gemas, poucas gemas chegaram a desenvolver-se em brotos (Figura 16), e as gemas restantes apenas expandiram em tamanho.

Tabela 6 – Número médio de gemas e brotos adventícios do tipo de meloeiro Cantaloupe em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

Tratamentos	Número de gemas por calo	Número de brotos por calo
	Médias	
MS sem regulador de crescimento (controle)	0,0 b	0,0 b
MS + BAP 1,0 mg/L	2,7 a	0,4 b
MS + BAP 2,0 mg/L	3,8 a	1,3 a
MS + BAP 3,0 mg/L	2,6 a	1,1 a
MS + BAP 4,0 mg/L	3,2 a	1,0 a
<b>Média geral</b>	<b>2,5</b>	<b>0,8</b>

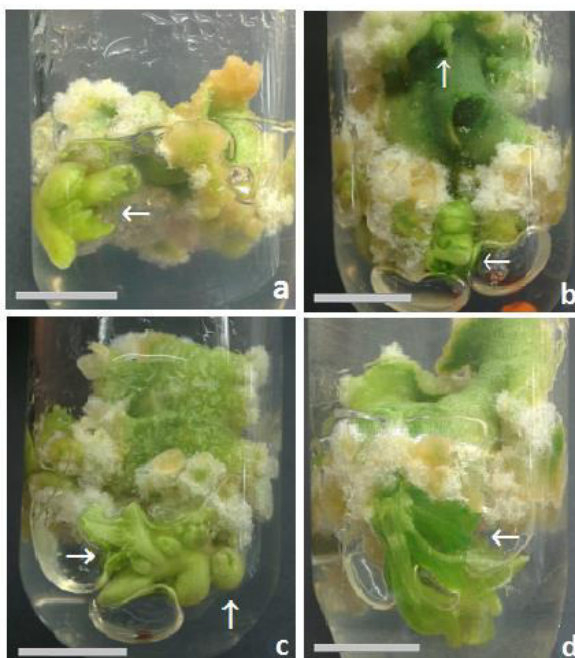
\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o Pele de Sapo não houve diferença significativa no número de gemas formadas por calo em quaisquer tratamentos, apesar disso o número máximo atingido foi de 2,6 gemas por calo no meio suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Tabela 7). Nenhuma das gemas induzidas em todos os tratamentos atingiu o estágio de brotos, aos 38 dias de cultivo *in vitro*. Constatou-se notável diferença no número de gemas e brotos induzidos nos dois tipos de *C. melo* mesmo sob as mesmas condições ambientais, mesmo tipo e idade de explante, sugerindo que o genótipo seja a fonte principal de variabilidade. O efeito da adição, ao meio de cultura, apenas de citocininas na indução de organogênese foi relatado por Stipp e

colaboradores (2001), esses autores registraram os melhores resultados de formação de gemas adventícias, com 7,59 gemas por explante, em cotilédones de meloeiro variedade *inodorus*, cultivares Yellow King e o híbrido AF-522 em meio MS suplementado apenas com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. A diferença entre o número de gemas por explante obtida por Stipp e o número de gemas por explante obtidas pelo Pele de Sapo do presente estudo pode ser resultante da diferença genotípica entre os tipos de *C. melo*.

Figura 16 – Calos formados aos 38 dias, após a inoculação *in vitro* de explantes de cotilédone do tipo Cantaloupe, apresentando desenvolvimento de brotos (setas). a. Calos em meio MS com BAP  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . b. c. Calos em meio MS com BAP  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ . d. Calos em meio MS com BAP  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Barras: 1 cm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Sebastiani e Ficcadenti (2016) obtiveram sucesso na indução da organogênese em seis genótipos diferentes da variedade de meloeiro *cantalupensis*, a partir de explantes de cotilédones inoculados em meios MS contendo BAP na presença de ácido indolacético (AIA). Eles observaram que cada genótipo comportou-se de maneira diferente, tanto na frequência de regeneração quanto no número de brotos formados por explante. Seus resultados mostram que a frequência de regeneração variou de 7,4 a 84,5%, dependendo do genótipo de meloeiro e da formulação nutritiva testada, ratificando assim a dependência do genótipo no sucesso da regeneração de *C. melo*. Kintzios e Taravira (1997) também concluíram que somente seis das catorze cultivares comerciais de *C. melo* responderam

positivamente a diferentes tratamentos de indução da organogênese de brotos, indicando que a habilidade de regeneração é genótipo-dependente.

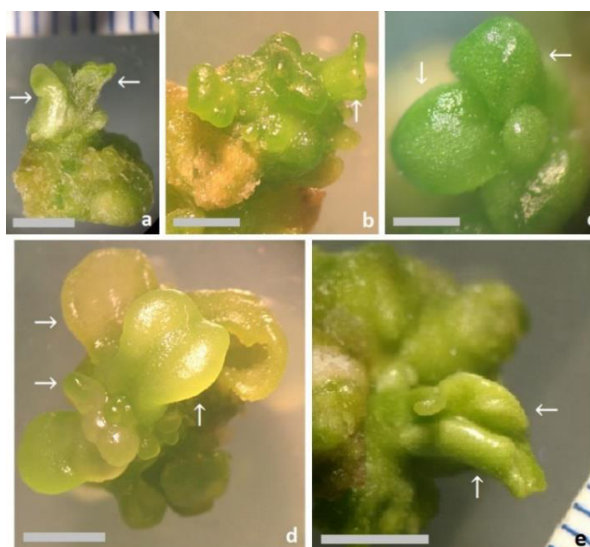
Tabela 7 – Número médio de gemas e brotos adventícios do tipo Pele de Sapo em meios de cultura MS com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 38 dias após a inoculação *in vitro* dos explantes de cotilédones.

Tratamentos	Número de gemas por calo	Número de brotos por calo
	Médias	
MS sem regulador de crescimento (controle)	0,0 a	-
MS + BAP 1,0 mg/L	2,6 a	-
MS + BAP 2,0 mg/L	0,4 a	-
MS + BAP 3,0 mg/L	1,5 a	-
MS + BAP 4,0 mg/L	1,0 a	-
<b>Média geral</b>	<b>0,9</b>	<b>-</b>

\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 – Brotos excisados dos calos, obtidos a partir de explantes cotiledonares, do tipo Cantaloupe, visualizados com o auxílio de microscópio estereoscópico, apresentando folhas (setas). a. Broto formado no meio MS contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Barra: 3 mm) b. Broto formado no meio MS contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Barra: 3 mm) c. Broto formado no meio MS contendo 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Barra: 1 mm) d. Broto formado no meio MS contendo 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Barra: 4 mm) e. Broto formado no meio MS contendo 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Barra: 4 mm).

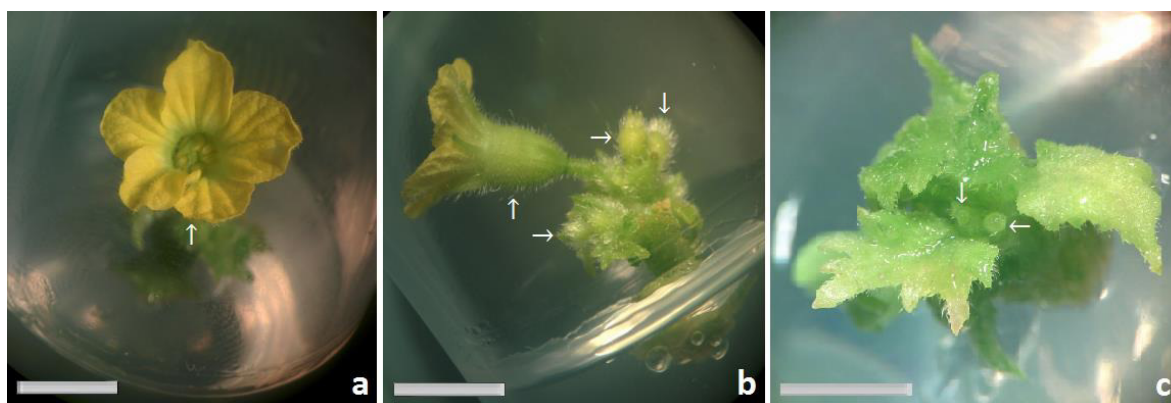


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.4.3 Análise qualitativa do subcultivo de gemas e brotos adventícios

Ao serem repicadas para o meio MS sem fitorreguladores, as gemas inoculadas apenas aumentaram de tamanho, mas sem desenvolvimento de brotos em ambos os meloeiros, Cantaloupe e Pele de Sapo. Já os brotos, apenas do Cantaloupe, continuaram o desenvolvimento de forma bastante lenta, em sua maioria com um aspecto vitrificado e disforme, sem qualquer alongamento. Apenas um broto proveniente do cultivo em MS adicionado de BAP 2,0 mg L<sup>-1</sup>, que não apresentou aspecto vitrificado, desenvolveu-se, mas não alongou. Após 56 dias de subcultivo este mesmo broto apresentou o desenvolvimento de cinco botões florais masculinos, destes apenas um iniciou expansão e com 9 dias a flor abriu (Figura 18 a, b). Após 77 dias mais um broto, dessa vez proveniente do cultivo em MS suplementado com BAP 3,0 mg L<sup>-1</sup>, demonstrou o desenvolvimento de botões florais, mas de aspecto levemente vitrificado (Figura 18 c).

Figura 18 – Brotos do meloeiro do tipo Cantaloupe obtidos a partir de explantes cotiledonares, em subcultivo no meio MS sem fitorreguladores, visualizados com o auxílio de microscópico estereoscópico, apresentando desenvolvimento de flores *in vitro* (setas). a, b. Broto formado no meio contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. c. Broto formado no meio contendo 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Barras: 500 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Até o presente momento a floração *in vitro* de *C. melo* ainda não havia sido reportada. No entanto, a ocorrência de floração *in vitro* dentro do gênero *Cucumis* já havia sido relatada (KIELKOWSKA *et al.*, 2012; ADHIKARI *et al.*, 2012; AMEHA *et al.*, 1998). Sangeetha e Venkatachalam (2014) obtiveram 27,3 flores por broto após 3 semanas de cultivo em meio MS contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP suplementado com sacarose a 6%. Essas flores desenvolveram-se em brotos multiplicados e alongados cultivados primariamente em meio MS contendo diferentes concentrações e combinações de BAP e CIN (Cinetina ou 6-

furfurilaminopurina) a partir de gemas apicais como explantes de plântulas germinadas *in vitro* da espécie *Cucumis sativus*. Esses autores ainda observaram formação de frutos em algumas dessas culturas *in vitro*.

A floração *in vitro* de meloeiro observada neste trabalho não foi expressiva o suficiente para a obtenção de conclusões acerca de sua indução, mas pode-se dizer que ela é possível de ser atingida.

## 5 CONCLUSÕES

Sementes do meloeiro tipo Cantaloupe desinfestadas superficialmente, contendo tegumento e embebidas em água destilada autoclavada por 24 horas, apresentam maior taxa e velocidade de germinação em comparação com as sementes que não foram embebidas. A remoção do tegumento resulta na germinação *in vitro* mais rápida e uniforme das sementes de meloeiro em comparação com as sementes com tegumento, tornando-se assim indispensável em estudos que demandam uniformidade do material vegetal em uma mesma fase de desenvolvimento como fonte de explantes, sendo a melhor forma de germinar sementes de meloeiro Cantaloupe.

Na organogênese, entre os tipos de meloeiro estudados, 'Cantaloupe' regenera o maior número de gemas adventícias por explante cotiledonar e induz a maior formação de calos, quando comparado ao Pele de Sapo. A indução da organogênese como método de regeneração de plantas em meloeiro é uma via que pode ser utilizada na indução de gemas adventícias a partir de explantes cotiledonares. O uso de BAP como citocinina indutora de organogênese permite a formação de calos e a regeneração de gemas adventícias, sendo, 3,0 mg L<sup>-1</sup> a melhor concentração de BAP, para o Cantaloupe e para o Pele de Sapo apenas quanto a formação de calos. O tipo Pele de Sapo não mostrou resultados conclusivos quanto a indução de gemas adventícias. Em meloeiro, a genótipo-dependência exerce grande influência nas respostas morfogenéticas. Entretanto são necessários mais estudos com outros tipos, utilizando um maior espectro de concentrações de BAP e/ou de outras citocininas adicionadas ao meio de cultura, bem como o uso de explantes cotiledonares de diferentes idades, para se alcançar taxas mais elevadas de formação de gemas adventícias.

## REFERÊNCIAS

- ADECE (Agência de Desenvolvimento do Estado do Ceará). 2017. Disponível em: <<http://www.adece.ce.gov.br>> Acesso em: 09 jul. 2017.
- ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. Hormonal control of sex expression of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with the identification of sex linked molecular marker. **Nucleus**, v. 55, n.2, p. 115–122, 2012.
- ALANI, N. K. Propagation of *Sedum adolphii* *in vitro*. **Ibn Al-Haitham Journal For Pure and Applied Science**, v. 22, n. 2, p. 1-6, 2009.
- ALTMAN, A.; LOBERANT, B. Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. **Agricultural Biotechnology**, New York, NY, p. 19–42, 1998.
- ALVES, S. A. O.; LEMOS, O. F.; SANTOS FILHO, B. G.; LOPES DA SILVA, A. L. *In vitro* embryo rescue of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 1-6, 2011.
- AMEHA, M.; SKIRVIN, R. M.; MITIKU, G.; BULLOCK, D.; HOFMANN, P. *In vitro* tendril and flower development in cucumber (*Cucumis sativus*) maybe regulated by gibberellins. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, n. 2, p. 159-163, 1998.
- BARROS, D. I.; DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. S.; ARAÚJO, E. F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 165-171, 2005.
- BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. Production of virus-free plants. **eBook: Plant Tissue Culture: An Introductory Text**. Springer, p. 227-243, 2013.
- CALLIS, J. Auxin action. **Nature**, London, v. 435, p. 436-437, 2005.
- CARVALHO, A. C. P. P.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E. P.; SOUZA, F. V. D.; PETERS, J. A.; LILIA WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2011.

COOPER G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. Porto alegre: Artmed Editora, p. 712, 2001.

DIAO, W.; JIA, Y.; SONG, H.; ZHANG, X.; LOU, Q.; CHEN, J. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 246-251, 2009.

EMBRAPA. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1ª ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-38, 2010.

EMBRAPA. **Introdução à micropropagação de plantas**. 1ª ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 13-30, 2006.

EMBRAPA. **Produção de melão e mudas climáticas**. 1ª ed. Brasília: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 19-24, 2017.

FLORES, R.; VASCONCELLOS, J. V.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B.; NICOLOSO, F. T. Embriogênese somática e organogênese indireta em *Puffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 993-995, 2007.

GAMBORG, O. L. Callus tissue culture. Biotechnology. Milestones. ***In vitro Cellulas & Developmental Biology-Plant***, v. 38, p. 84-92, 2002.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Plant Cell Cultures 1. Nutrient requirements of cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GROZEVA, S.; VELKOV, N. *In vitro* plant regeneration of two cucumber (*Cucumis sativum* L.) genotypes: effects of explant types and culture medium. **Genetika**, v. 46, n. 2, p. 485-493, 2014.

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

**IBGE** (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2017. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 09 jul. 2017.

JUDD, W. S. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Arned. p. 396-398, 2009.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

KIELKOWSKA, A.; HAVEY, M. J. *In vitro* flowering and production of viable pollen of cucumber. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 109, p. 73–82, 2012.

KINTZIOS, S. E. & TARAVIRA, N. Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Breeding**, v. 116, p. 359–362, 1997.

KIRKBRIDE JUNIOR, J. H. Biosystematics monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons. **North Carolina: Parkways**, p. 159, 1993.

KISS-BÁBA, E.; PÁNCZÉL, S.; VELICH, I.; BISZTRAY, G. D. Influence of genotype and explant source on the *in vitro* regeneration ability of different melon varieties. **Acta Biologica Hungarica**, v. 61, n.4, p. 498–511, 2010.

KNOP, A. Ueber titansäurehaltigen Magneteisenstein. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 123, n. 3, p.348-353, 1862.

KÖGL, F; HAAGEN-SMIT, A. J; ERXLEBEN, H. Uber ein neus auxin ('Hetero-auxin') aus harn. **Zeitschrift fuer Physiologische Chemie**, v. 228, p. 90-103, 1934.

LEE, S. T.; HUANG, W. L. Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation. **Plant Growth Regulation**, v. 73, n. 2, p. 193–204, 2014.

LEUNG, D. W. M. Potential of plant tissue culture research contributing to combating arsenic pollution. **eBook: Arsenic Contamination in the Environment**. Springer, p. 187-194, 2017.

LIU, L. Z.; CHITRAMPALAM, P. R.; ZHAI, W. Q.; CHEN, Y. Y.; ZHU, W. M.; SHI, B. Efficient plant regeneration in three cultivars of Hami melon [*Cucumis melo* L. ssp. *melo* convar. *ameri* (Pang.) Greb] via organogenesis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 415-420, 2013.

LLOYD, G. & MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416, 1981.

MENDI, Y. Y.; COMLEKCIOGLU, N.; IPEK, M.; KOCAMAN, E.; IZGU, T.; TEKDAL, D.; CURUK, P. The effect of different hormone concentrations and dark pretreatment on adventitious shoot regeneration in snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus*). **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 4, p. 5392-5394, 2010.

MILLER, C. O.; SKOOG, F.; SALTZA, M.; STRONG, F. M. Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. **Journal American Chemical Society**, v. 77, p. 1392, 1955.

MLIKI, A., STAUB, J. E., SUN, Z. Y., GHORBEL, A. Genetic diversity in melon (*Cucumis melo* L.): An evaluation of African germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, p. 587-597, 2001.

MOON, J. G.; CHOO, B. K.; DOO, H.; KWON, T. H.; YANG, M. S.; RYU, J. H. Effects of growth regulators on plant regeneration from the cotyledon explant in oriental melon (*Cucumis melo* L.). **Korean Journal Plant Tissue Culture**, v. 27 p. 1-6, 2000.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues cultures. **Journal Plant Physiology**, v.15, p.473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NTUI, V. O.; THIRUKKUMARAN, G.; IIOKA, S.; MII, M. Efficient plant regeneration via organogenesis in “Egusi” melon (*Colocynthis citrullus* L.) **Scientia Horticulturae**, v. 119 p. 397-402, 2009.

NUNEZ-PALENIUS, H.G.; GOMEZ-LIM, M.; OCHOA-ALEJO, N. Melon fruits: Genetic diversity, physiology, and biotechnology features. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 13-55. 2008.

OBEMBE, O. O.; AWORUNSE, O. S.; BELLO, O. A.; ANI, A. O. Multiple shoots induction from indigenous Nigerian pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). **Annual Research & Review in Biology**, v. 17, n. 5, p. 1-10, 2017.

QUEIRÓZ, M. A. Germoplasma de cucurbitáceas no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, 2011.

REN, Y.; BANG, H.; GOULD, J.; RATHORE, K. S.; PATIL, B. S.; CROSBY, K. M. Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. *inodorus*). **In vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, v. 49, p. 223–229, 2013.

RHAMAN, H.; KARIM, M. R.; HOQUE, M. A.; , HOSSAIN, M. M. Rapid *in vitro* clonal propagation of a hybrid muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivar from seedling explantes. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)**, v. 2, n. 1, p. 47-52, 2012.

ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTERS, D. S. **Evolution and exploration**. Chapter 2. Curcubis. New York: CAB International, p. 35, 1997.

SANGEETHA, P. & VENKATACHALAM, P. Induction of direct shoot organogenesis and *in vitro* flowering from shoot tip explants of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. ‘Green long’). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 2, p. 242–248, 2014.

SEBASTIANI, M. S. & FICCADENTI, N. *In vitro* plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* and genetic stability evaluation using RAPD analysis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 124, p.69–79, 2016.

SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p. 123-126, 2006.

SHUKLA, P. S.; DAS, A. K.; JHA, B.; AGARWAL, P. K. High-frequency *in vitro* shoot regeneration in *Cucumis sativus* by inhibition of endogenous auxin. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 6, p. 729–737, 2014.

SILVA, A. L. L.; BISOGNIN, D. A.; FRANCO, E. T. H.; HORBACK, M. A.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N.; Alves, S. A. O.; BRONDANI, G. E. *In vitro* seed germination and calli induction in seedlings, cotyledons and anthers of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Stand.) – Cucurbitaceae. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 117-126, 2012.

- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.
- SOUZA, R. R.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, R. R.; REIS, M. V.; NERY, F. C.; PAIVA, R. Optimization of jenipapo *in vitro* seed germination process. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40 n. 6, p. 658-664, 2016.
- STEPHENS, P. A.; NICKELL, C. D.; WIDHOLM, J. M. Agronomic evaluation of tissue-culture-derived soybean plants. **Theoretical Application Genetics**, v.82, p. 633, 1991.
- STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J.; PIEDADE S. M. D. S.; RODRIGUEZ, A. P. M. *In vitro* morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p.81-89, 2001.
- TAYLOR, N.; ZAPPI, D. Neotropical Cucurbitaceae. **Neotropikey – Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics**, 2009. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Cucurbitaceae.htm>>. Acesso em: 03 out. 2017.
- THIRUVENGADAM, M.; JEYAKUMAR, J. J.; KAMARAJ, M.; LEE, Y. J.; CHUNG, I. M. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of gherkin (*Cucumis anguria* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v.7, p. 969-977, 2013.
- THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2007.
- UGANDHAR. T; VENKATESHWARRLU, M.; BEGUM. G.; SRILATHA, T.; JAGANMOHANREDDY, K. *In vitro* plant regeneration of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon and hypocotyl explants. **Science Research Reporter**, v. 1, n. 3, p. 164-169, 2011.
- VASUDEVAN, V.; SUBRAMANYAM, K.; ELAYARAJA, D.; KARTHIK, S.; VASUDEVAN, A. Assessment of the efficacy of amino acids and polyamines on regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by SCoT and RAPD markers. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 130, p. 681–687, 2017.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium.  
**Plant Physiology**, v. 9, p. 585-600, 1934.