



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

FREDERICO INÁCIO COSTA DE OLIVEIRA

**CULTURA DE TECIDOS E CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS VISANDO
OBTENÇÃO DE HAPLOIDES EM MELOEIRO**

FORTALEZA

2019

FREDERICO INÁCIO COSTA DE OLIVEIRA

CULTURA DE TECIDOS E CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS VISANDO
OBTENÇÃO DE HAPLOIDES EM MELOEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão

Coorientadora: Dra. Ana Cristina Portugal P. de Carvalho

FORTALEZA

2019

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

- O47c Oliveira, Frederico Inácio Costa de.
Cultura de tecidos e cruzamentos interespecíficos visando obtenção de haploides em meloeiro / Frederico Inácio Costa de Oliveira. – 2018.
81 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão.
Coorientação: Profa. Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.
1. Cucumis melo . 2. Dihaploidização . 3. Androgênese . 4. Resgate de embriões . I. Título.
- CDD 630
-

FREDERICO INÁCIO COSTA DE OLIVEIRA

CULTURA DE TECIDOS E CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS VISANDO
OBTENÇÃO DE HAPLOIDES EM MELOEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão (Orientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho (Coorientadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof. Dr. Márcio Cleber de Medeiros Corrêa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Levi de Moura Barros
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Dra. Patricia do Nascimento Bordallo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por Ser.

À minha mãezinha, Cecília Maria da Costa, por ser é a melhor mãe do mundo, indo e voltando. Que Deus me permita ter herdado, pelo menos, 5% das virtudes dessa grande mulher.

Ao meu pai, Mário Sérgio de Oliveira Costa, por ser é o melhor pai do mundo, de um jeito que muito me agrada.

Ao meu amigo e irmão, Felipe Costa de Oliveira, por ser meu exemplo de proatividade e criatividade. É também minha referência de inteligência.

À minha esposa, Luana Alice Lima Paula Costa, pelo exemplo de responsabilidade; por me dar força, acreditando que sou capaz, quando eu mesmo não acreditava. Mais valiosa que muitíssimos rubis. Entendo o que queria dizer o sábio Salomão. E concordo.

À minha tia, Maria de Fátima da Costa, por todo o incentivo e cuidado. “Vai dar certo, se Deus quiser... e ele há de querer”. Ele quis, Titia!

Ao bom doutor, Fernando Antonio Souza de Aragão, por me tratar como um grande amigo, e pela orientação de “alto level”. É “muito bom demais” trabalhar com o senhor. “Melhor que isso, só arroz com fumo”.

À doutora, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, por me receber com todo carinho do mundo; pelos conselhos durante os experimentos; pelo cuidado e paciência.

À professora Maria Izabel Gallão, pela prontidão em nos ajudar, sempre que precisávamos.

Ao professor Itayguara Ribeiro da Costa, pela orientação e paciência no preparo das lâminas para observação de cromossomos.

Ao professor Marcio Cleber de Medeiros Corrêa, e aos pesquisadores Levi de Moura Barros e Patrícia do Nascimento Bordallo, por aceitarem participar da banca, e por todas as contribuições, na forma de sugestões e críticas construtivas.

Ao “grande” amigo, Gérffeson Thiago Mota de Almeida Silva, por toda ajuda, até nos fins de semana e feriados. Pelos inúmeros momentos de descontração, mesmo quando “o bicho pegava”. Pelos “calma, mah, vai dar certo!”, “Venha! Chegue, que eu ajudo”, “qlqr coisa só dizer”. Pelo exemplo de mansidão e generosidade.

À Alexya Vitoria Felix Carvalho, pela ajuda em todos os experimentos.

Ao Higor Ximenes e ao Caique Duarte, que, juntamente comigo e com o Gérffeson, aguentaram o sufoco dos experimentos na casa de vegetação, com seus agradáveis 40 e

poucos graus. Hoje é difícil de acreditar como a gente conseguia rir depois de 3 horas naquela sauna.

Aos colegas dos Laboratórios de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais (Embrapa), Cultura de Tecidos Vegetais (Embrapa), Citogenética (UFC) e Biologia Celular Vegetal (UFC), pela ajuda valiosa em cada etapa desenvolvida.

Aos colegas de doutorado, pelo convívio agradável durante as disciplinas.

Que Deus abençoe a todos com as mais ricas bênçãos espirituais.

"Quem pensa conhecer alguma coisa, ainda
não conhece como deveria"

I Coríntios 8:2

RESUMO

Para o melão, a técnica de obtenção de haploides é pouco acessível, pois necessita de equipamentos muito caros, utiliza fontes de radiação seriamente nocivas aos organismos vivos e demanda doses extremamente altas. Por outro lado, é possível obter indivíduos haploides por métodos alternativos, como cultivo *in vitro* de anteras ou de óvulos e cruzamentos interespecíficos. Simultaneamente, é necessário definir um protocolo eficiente de multiplicação dos indivíduos haploides e di-haploides, evitando a perda prematura de genótipos promissores. Nesse contexto, buscou-se: I - determinar um protocolo eficiente para estabelecer o cultivo *in vitro* de meloeiro, definindo o explante mais recomendado, tanto para micropropagação quanto para a androgênese da cultura; II - avaliar a eficiência de anteras na haploidização e de gavinhas multiplicação *in vitro* por meio de organogênese e embriogênese indiretas, respectivamente; III - definir uma espécie de cucurbitácea capaz de induzir a formação de haploides nas três variedades botânicas de meloeiro comercialmente cultivadas. O protocolo mais adequado para a fase inicial de estabelecimento do cultivo *in vitro* foi o que usa gavinha como explante, desinfestada com etanol 70% (1 min) + hipoclorito de sódio (NaClO) e 0,1% de cloro ativo (7,5 min), seguida de três enxagues em água destilada autoclavada, por um minuto, cada. As flores coletadas em pré-antese mostraram maior potencial para a androgênese da cultura, por resultarem em baixos níveis de contaminação e evitarem a perda dos grãos de pólen durante o processo de desinfestação. A calogênese a partir de gavinha e anteras de meloeiro amarelo mostrou ser influenciada de forma distinta pelos reguladores de crescimento tanto na organogênese quanto na embriogênese somática tendo os calos obtidos a partir de anteras com potencial para formação de embriões somáticos. Quantos aos cruzamentos interespecíficos, das 11 cucurbitáceas avaliadas apenas os pólenes de abobrinha e melão-de-são-caetano conseguiram estimular a formação de frutos de melão, e apenas nos cruzamentos entre abobrinha e as variedades *inodorus* e *reticulatus* houve a formação de embriões com características haploides. Já quando o pólen da cucurbitácea foi misturado ao pólen da planta receptora, a formação de frutos ocorreu em todos os tratamentos, todavia, não houve a formação de sementes haploides. Abobrinha e melão-de-são-caetano são capazes de formar frutos partenocárpicos em meloeiro. No entanto, apenas nos cruzamentos com abobrinha foram produzidas sementes com características típicas de haploide.

Palavras-chave: *Cucumis melo*. Dihaploidização. Androgênese. Resgate de embriões.

ABSTRACT

For melons, a haploid selection technique is somewhat affordable, as a very long power source uses energy sources that are seriously harmful to living organisms and extremely high dose doses. On the other hand, it is able to detect haploids by alternative methods, such as in vitro culture of anthers or ova and interspecific crosses. Simultaneously, it is an efficient protocol for the multiplication of haploid and dihaploid individuals, avoiding a premature loss of promising genotypes. In this context, we sought to: I - determine a protocol to establish the in vitro culture of melon, defining the most recommended explant, both for micropropagation and for a culture androgenesis; II - to evaluate the efficiency of haploidization anthers and drawers in vitro by means of indirect organogenesis and embryogenesis, respectively; III - define a cucurbit species capable of inducing a haploid formation in the three commercially cultivated botanical varieties of melon. The most probabilistic for the initial phase of the in vitro culture was the one that the tendon took as explant, disinfected with ethanol 70% (1 min) + sodium hypochlorite (NaClO) and 0.1% active chlorine (7.5 min) , followed by three rinses in autoclaved distilled water for one minute each. The flowers collected in pre-anthesis should have greater potential for an androgenesis of the crop, through different levels of contamination and loss of pollen grains during the disinfestation process. Calogenesis from germination and anthers of yellow melon was influenced by the distinct form of growth regulators in both organogenesis and somatic embryogenesis with calli obtained from anthers with potential for the formation of somatic embryos. As for interspecific crosses, of the 11 cucurbits evaluated only the pollen of zucchini and melon-de-são-caetano were able to stimulate a formation of melon fruits, and only in the crossbreeding between the zucchini and the *inodorus* and *reticulatus* varieties there was a formation of embryos with haploid characteristics When the pollen from the cucurbit was mixed with the pollen of the recipient plant, a new fruit of all treatments, however, there was no formation of haploid seeds. Zucchini and melon-de-são-caetano are able to form parthenocarpic fruits in melon. However, only in the crosses with soybean seeds with typical haploid characteristics.

Keywords: *Cucumis melo*. Dihaploidization. Androgenesis. Rescue of embryos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Tipos de explantes diploides de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex utilizados: folha jovem (esquerda), gemas apicais (centro) e segmento de gavinha (direita), com aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Barra = 1,0 cm. 32
- Figura 2- Flor masculina de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em estágio de pré-antese (A) e de antese (B). 33
- Figura 3- Anteras de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex oriundas de flores em antese. Antes da desinfestação, com os grãos de pólen aderidos à teca (A), e após a desinfestação, sem a presença dos grãos de pólen (B). 38
- Figura 4- Explante de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex. Características avaliadas: A) ausência de calogênese; B) presença de calo de coloração verde; C) calo de coloração bege; D) presença de raiz; E) oxidação média; e, F) medição da área do calo. Barra = 10 mm. 43
- Figura 5- Aspecto dos explantes de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA). Barra = 10 mm. 51
- Figura 6- Aspecto dos explantes de antera de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA). Barra = 10 mm. 51
- Figura 7- Aspecto dos explantes de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D). Barra = 10 mm. 52
- Figura 8- Aspecto dos explantes de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), 52

ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D).

Barra = 10 mm.

- Figura 9- Croqui do Experimento I na casa de vegetação, no segundo semestre de 2017. 56
- Figura 10- Croqui do Experimento II na casa de vegetação, no primeiro semestre de 2018. 56
- Figura 11- Aspecto das sementes de 10 espécies da família cucurbitácea em células de polietileno contendo substrato para germinação. Da esquerda para a direita, em coluna: moranga (*Cucurbita máxima*), pepino (*Cucumis sativus*), melancia (*Citrullus lanatus*), abóbora (*Cucurbita moschata*), maxixe do Norte (*Cucumis anguria*), abobrinha (*Cucurbita pepo*), bucha (*Luffa aegyptiaca*), cabaça (*Lagenaria siceraria*), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*) e melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*). 57
- Figura 12- Etapas da hibridização artificial de meloeiro: A - flor feminina protegida; B - flor masculina protegida com cápsula de gelatina; C - retirada das pétalas da flor feminina; D - retirada das pétalas da flor masculina; E - polinização artificial; F - estigma polinizado; G - flor polinizada, protegida com cápsula de gelatina, e identificada; e, H - fruto obtido e identificado. 58
- Figura 13- A - Fruto identificado; B - pulverização com álcool etílico 96%; C – método *dry burning*; D – extração de sementes em frutos cortados longitudinalmente; E – avaliação de embriões em microscópio estereoscópico; F - semente sem embrião (esquerda), com embrião e endosperma reduzidos (centro) e completamente formada (direita). 59
- Figura 14- Estruturas reprodutivas de cinco espécies de cucurbitáceas. Antera, estigma e estigma polinizado de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (A, B e C), abobrinha (*Cucurbita pepo*) (D, E e F), cabaça (*Lagenaria siceraria*) (G, H e I), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*) (J, K e L) e antera e estigma polinizado de bucha (*Luffa aegyptiaca*) (M e N). 62
- Figura 15- Frutos controles das espécies testadas em ambos os experimentos. Melão (A), Melão-de-são-caetano (B), Pepino (C), Maxixe do Norte (D), Maxixe Liso (E), Melancia (F), Bucha (G), Cabaça (H), Maxixe bravo (I), Moranga (J), Abobrinha* (K), Abóbora* (L). *Os experimentos 63

foram encerrados antes do desenvolvimento completo dos frutos de abóbora e abobrinha.

Figura 16- Aspecto morfológico de grãos de pólen de 13 cucurbitáceas em aumento 65
óptico de 200x. Abobrinha (*Cucurbita pepo*) (A), Moranga (*Cucurbita máxima*) (B), Abóbora (*Cucurbita moschata*) (C), Melã-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (D), Bucha (*Luffa aegyptiaca*) (E), Melancia (*Citrullus lanatus*) (F), Melão (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) (G), Melão (*Cucumis melo* var. *inodorus*) (H), Melão (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) (I), Maxixe do Norte (*Cucumis anguria*) (J), Pepino (*Cucumis sativus*) (K), Maxixe Bravo (*Cucumis dipsaceus*) (L), Cabaça (*Lagenaria siceraria*) (M). Barra = 100 µm.

Figura 17- Secção longitudinal de flores femininas de 10 espécies de cucurbitáceas, 66
coletadas em antese, evidenciando as estruturas reprodutivas (estigma, estilete e ovário). Moranga (*Cucurbita máxima*) (A), Melão (*Cucumis melo*) (B), Abobrinha (*Cucurbita pepo*) (C), Maxixe Bravo (*Cucumis dipsaceus*) (D), Maxixe do Norte (*Cucumis anguria*) (E), Melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (F), Melancia (*Citrullus lanatus*) (G), Cabaça (*Lagenaria siceraria*) (H), Pepino (*Cucumis sativus*) (I), Bucha (*Luffa aegyptiaca*) (J). Barra = 1 cm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Genótipos/cultivares e procedimentos utilizados na desinfestação de sementes de meloeiro, visando o estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> .	29
Tabela 2-	Porcentagens de contaminação e de oxidação de gemas apicais, folhas jovens e gavinhas de meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L. var <i>inodorus</i>) amarelo híbrido Goldex, em quatro procedimentos de desinfestação dos explantes, aos 60 dias de inoculação <i>in vitro</i> .	35
Tabela 3-	Análise de correlação entre contaminação e oxidação em explantes de meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L. var <i>inodorus</i>) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação <i>in vitro</i> .	36
Tabela 4-	Percentual de contaminação dos explantes de antera obtidos de flores em antese e pré-antese de meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L. var <i>inodorus</i>) amarelo híbrido Goldex, nos quatro procedimentos de desinfestação, 30 dias após a inoculação.	37
Tabela 5-	Porcentagem de indução de calos organogênicos e médias da área e massa fresca dos calos de gavinha e antera de meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L. var <i>inodorus</i>) amarelo híbrido Goldex em meio MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA), aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . IC = índice de calogenese.	48
Tabela 6-	Estatística descritiva de aparência, textura e presença de raízes em calos obtidos por organogênese de gavinha e antera de meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L. var <i>inodorus</i>) amarelo híbrido Goldex, em meios de cultura MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA), aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	48
Tabela 7-	Porcentagem de indução de calos embriogênicos e médias da área e massa fresca dos calos de gavinha e antera de meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L. var <i>inodorus</i>) amarelo híbrido Goldex em meio MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D), aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . IC = índice de calogenese.	49
Tabela 8-	Estatística descritiva de aparência, textura e presença de raízes em calos	49

obtidos por embriogênese somática de gavinha e antera de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em meios de cultura MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D), aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

- Tabela 9- Correlação e regressão linear entre a área (A) e a massa (M) dos calos de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, para ambos os explantes, nos dois experimentos. 50
- Tabela 10- Cruzamentos interespecíficos realizados entre duas variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus* e var *reticulatus*) e seis cucurbitáceas, como doadoras de pólen. 61
- Tabela 11- Número de cromossomos das 11 espécies de cucurbitáceas ($2n = 2x$) utilizadas nos dois experimentos de cruzamentos interespecíficos. 64
- Tabela 12- Morfometria de grãos de pólen e aparelho reprodutor feminino de três variedades botânicas de melão e outras dez espécies de cucurbitáceas. Foram mensurados 40 grãos de pólen e 35 flores femininas de cada espécie. 67
- Tabela 13- Quantidade de frutos obtidos por cruzamentos realizados para cada cruzamento interespecífico, com mistura (cm) ou sem mistura (sm) de pólen da respectiva variedade botânica de meloeiro. 67

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolilacético
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-benzilaminopurina
CaOCl ₂	Hipoclorito de cálcio
etc	Et cetera = e outro(a)s
g	Gramma
ha	Hectare
HCl	Ácido clorídrico
HgCl ₂	Cloreto de mercúrio
IC	Índice de calogênese
KIN	Cinetina
L	Litro
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
NaClO	Hipoclorito de sódio
s	Segundo
US\$	Dólar dos Estados Unidos
var	Variedade botânica
µmol	Micromol

SUMÁRIO

1 ESTADO DA ARTE	17
2 CAPÍTULO 1 ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE MELOEIRO AMARELO	23
3 CAPÍTULO 2 CALOGÊNESE EM ANTERAS E GAVINHAS DE MELOEIRO AMARELO.....	39
4 CAPÍTULO 3 INDUÇÃO DE HAPLOIDES DE MELOEIRO POR MEIO DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS COM OUTRAS CUCURBITÁCEAS	53
5 CONCLUSÃO GERAL	70
REFERÊNCIAS	71

1 ESTADO DA ARTE

Aspectos econômicos

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma das hortaliças de maior relevância no mundo, atingindo, em 2017, uma produção de quase 32 milhões de toneladas, em mais de 1,22 milhões de hectares colhidos (FAO, 2018). China, Turquia, Irã, Egito e Índia, os maiores produtores, responderam por mais de 68% do total produzido nesse ano. Nesse mesmo ano, o Brasil ocupou a 11ª posição, contribuindo com quase 2% da produção mundial (FAO, 2018). Em 2017, a produção brasileira superou 540 mil toneladas do fruto, em uma área de 23,4 mil ha colhidos, e, embora todas as regiões do Brasil produzam melão, o Nordeste forneceu mais de 95% da produção nacional (IBGE, 2018).

Os Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte destacam-se como os principais produtores nacionais de melão, contribuindo com 76% do percentual regional (IBGE, 2018). No âmbito das exportações, nesse mesmo ano, mais de 37% (224,6 toneladas) do total produzido foi destinado ao mercado externo, o que movimentou quase 150 milhões de dólares. Vale ressaltar que o melão vem sendo o principal produto da pauta de exportação agrícola de ambos os Estados. Os principais destinos da fruta foram Holanda (95,8 mil toneladas/US\$64 milhões), Reino Unido (58,8 mil toneladas/US\$42,4 milhões) e Espanha (48,8 mil toneladas/28,9 milhões). No primeiro bimestre de 2018, as exportações tiveram aumento de mais de 30%, em relação ao mesmo período de 2016 (MDIC, 2018).

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.), Abóbora (*Cucurbita pepo* L.) e abóbora de verão (*Cucurbita pepo* L.), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), abóbora de inverno (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) e outras espécies, cultivadas em todo o mundo, pelas mais diferentes etnias (DONG *et al.*, 2016). Dentre essas, *Cucumis melo* L., destaca-se como uma das principais cucurbitáceas economicamente cultivadas no Brasil (LOPES; CARVALHO; PESSOAL, 2003).

Segundo a classificação de PITRAT; HANELT; HAMMER (2000), a espécie *Cucumis melo* é subdividida em dezesseis variedades botânicas, cinco das quais foram atribuídas à

subespécie *agrestis* (*conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *momordica* e *acidulus*) e 11 à subespécie *melo* (*cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chafe*, *tibish*, *dudaim* e *chito*). Posteriormente, a variedade *tibish* foi reenquadrada para a subespécie *agrestis* (PITRAT, 2013).

Grande 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, muitas vezes pontudo na região do pedúnculo, coloração da casca branca, amarela ou verde escura, coloração uniforme ou com manchas, muitas vezes enrugado, com ou sem costelas, polpa de coloração branca e doce, amadurecimento tardio, sem aroma (*inodorus*), não climatéricos, com longa vida útil, e sementes grandes (PITRAT *et al.*, 2000; PITRAT, 2008; PITRAT, 2013); (2) *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin - geralmente são plantas andromonóicas, sendo as demais monóicas. Com frutos doces, aromáticos e climatéricos, com baixa resistência ao transporte e reduzida vida pós-colheita, que se desprendem do pedúnculo quando maduros. 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 - andromonóicas, com frutos climatéricos e aromáticos, de sabor doce, com 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) e sementes amarelas de tamanho médio (PITRAT *et al.*, 2000; PITRAT, 2008; PITRAT, 2013).

Comercialmente, os grupos são divididos em tipos. Por tipo deve ser entendido um grupo de cultivares ou de híbridos que apresentam uma ou mais características semelhantes, identificáveis facilmente e diferenciadas dos demais, tal como o aspecto da casca – cor quando maduro, presença ou ausência de suturas, cicatrizes, reticulação ou rendilhamento, cor da polpa, formato do fruto, etc (MENEZES *et al.*, 2000). Os tipos mais comercializados no mercado brasileiro são: Amarelo, Pele de Sapo e Honey Dew (pertencentes à variedade *inodorus*) e Cantaloupe, Gália (pertencentes à variedade *reticulatus*) e Charentais (pertencentes à variedade *cantaloupensis*).

Melhoramento genético

As cucurbitáceas são espécies de reprodução mista, e dada sua estrutura populacional, devem ter desenvolvido um balanço homozigótico, não apresentando depressão quando

submetidas à endogamia (ALLARD, 1996). Portanto, o meloeiro pode ser considerado tanto de polinização cruzada quanto de autofecundação, podendo ser submetida a métodos de melhoramento apropriados para ambos os tipos de planta.

O uso de sementes híbridas é restrito a espécies cujos aumentos nos custos de produção são suplantados pela superioridade dos híbridos, em função do vigor híbrido e/ou uniformidade na qualidade, em relação às cultivares de polinização aberta (FORSBERG; SMITH, 1980). A cultura do melão se enquadra nesse contexto, pois possui uma estrutura genética que suporta autofecundações sucessivas e sua produção de sementes híbridas tem preço acessível, além de permitir o controle genético de pragas e doenças importantes por meio da incorporação de alelos de resistência em pelo menos uma das linhagens parentais dos híbridos (McCREIGHT *et al.*, 1993).

Segundo Fehr (1987) essa estratégia de desenvolvimento de híbridos inclui as seguintes fases: (1) formação de uma população segregante; (2) endogamia de indivíduos da população até um nível estável de homozigose; (3) avaliação do desempenho das linhagens *per se*; (4) avaliação da capacidade geral e específica das combinações das linhagens; (5) avaliação dos híbridos potenciais e (6) produção de sementes híbridas.

A aplicação de métodos de melhoramento em paralelo, promovendo o acúmulo de alelos favoráveis em linhagens-elite, permite o uso de híbridos de meloeiro F₁ com resistência múltipla, alta qualidade de frutos e adaptadas às áreas-alvo de produção (McCREIGHT *et al.*, 1993). Ademais, produtores de melão, sobretudo os que utilizam níveis elevados de tecnologia, têm preferência por cultivares híbridas, devido à alta produtividade, resistências a pragas e doenças importantes, qualidade dos frutos e uniformidade de colheita (NUNES *et al.*, 2016).

Dihaploidização

Como mencionado, uma das etapas iniciais dos programas de melhoramento é a obtenção de linhas homozigotas puras para posterior transferência dos genes de interesse. No melão, a obtenção dessas linhas, por meio do melhoramento clássico, requer uma quantidade considerável de tempo e recursos para gerar esse alto grau de homozigose, devido aos sucessivos ciclos de autofecundação e seleção. Em locais onde a cultura só avança um ciclo por ano, essa fase pode durar mais de 10 anos. 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 gargalo é a obtenção de di-haploides. A fim de obter um di-haploide, dois passos principais devem ser considerados: a indução do desenvolvimento de haploides (monoploides) e a indução da duplicação dos cromossomos desses indivíduos haploides (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008).

Obtenção de plantas de meloeiro haploides

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

A eliminação somática de cromossomos, por meio, principalmente, de cruzamentos interespecíficos, seguida do resgate dos embriões, é um método satisfatório nos gêneros *Nicotiana* (BURK *et al.*, 1979), *Portulaca* (OKURA, 1933), *Solanum* (MAINE, 2003) e *Hordeum* (DEVAUX; PICKERING, 2005). No entanto, essa eliminação cromossômica também ocorre em muitos casos de hibridização intergenérica ou entre categorias taxonômicas mais abrangentes, como: *Pyrus pyrifolia* x pólen irradiado de *Malus x domestica* (INOUE *et al.*, 2004), *Avena sativa* x *Zea mays* (KYNAST *et al.*, 2012), *A. sativa* x *Triticeae species* (ISHII *et al.*, 2010), *Triticum aestivum* x *Imperata cylindrica* (TAYENG; CHAUDHARY; KISHORE, 2012; CHAUDHARY *et al.*, 2013), *T. aestivum* x *Coix lacrymajobi* (PRATAP; CHAUDHARY, 2012), *T. aestivum* x *Zea mays* (GUPTA, *et al.*, 2016).

A probabilidade de plantas monoploides serem geradas *in vivo*, sem que ocorra fusão dos gametas, é muito baixa, variando de acordo com a espécie. Em melão a taxa gira em torno de 2% (LOFTI *et al.*, 2003) e em algumas espécies de brássicas pode chegar até 35% (FOISSET *et al.*, 1997).

A escolha do método para a produção dos haploides depende em grande parte da resposta específica da espécie para cada método. Dong *et al.* (2016) relatam, pelo menos, cinco fatores que afetam diretamente a ginogênese *in vitro*, a saber: genótipo da planta doadora, pré-tratamentos (baixas e altas temperaturas), estágio de desenvolvimento do

gametófilo feminino, reguladores de crescimento (tipo e concentração no meio de cultura), e componentes do meio base. Outros fatores, como: fonte de radiação, dose de radiação e protocolo de polinização podem influenciar o grau de sucesso alcançado na partenogênese haploide, via polinização com pólen irradiado.

Em melão, a técnica de fertilização do óvulo por meio de polinização com pólen irradiado é a mais bem-sucedida e já vem sendo usada pelo menos desde 1987. Consiste em submeter os grãos de pólen à uma dosagem de radiação capaz de alterar a taxa de fertilização, após a germinação do pólen no estigma e o crescimento do tubo polínico dentro do estilo (SAUTON; DUMAS de VAULX, 1987; MUROVEC; BOHANEK, 2012). Entretanto, a obtenção de plantas haploides por meio desta técnica não é uma prática viável em alguns laboratórios de pesquisa, devido à indisponibilidade de instalações específicas de radiação gama. Sendo assim, a realização de cruzamentos interespecíficos e a cultura *in vitro* de ovário e antera são alternativas viáveis.

Embora a técnica seja mais simples, barata e acessível que a pseudofertilização com pólen irradiado, para o meloeiro, a literatura possui poucos relatos de cruzamentos interespecíficos para a produção de haploides.

Segundo Guis *et al.* (1998), o primeiro relato da obtenção de plantas haploides em meloeiro, a partir de cruzamento interespecífico, foi o de Dumas de Vaulx, em 1979, entre *Cucumis melo* ($2n = 4x = 24$) polinizado com a espécie tetraploide *Cucumis ficifolius* A. Rich ($2n = 4x = 48$). Entretanto, a produção de plantas haploides foi muito baixa, apenas três plantas foram obtidas de um total de mil sementes, e os resultados foram de difícil reprodução.

As espécies que vêm sendo empregadas na realização de cruzamentos interespecíficos com *C. melo* e mencionadas na literatura são: *C. sagittatus*, *C. metuliferus*, *C. sativus* e *C. prophetarum* (CHEN; ADELBERG, 2000).

Em meloeiro, a cultura *in vitro* de ovários não fertilizados foi relatada pela primeira vez por Ficcadenti *et al.* (1999). Diao *et al.* (2009) estudaram vários fatores na obtenção de plantas haploides a partir da cultura *in vitro* de ovários, tais como pré-tratamento com choque térmico, e diferentes concentrações de reguladores de crescimento e nitrato de prata na formação dos embriões. Malik *et al.* (2011) desenvolveram um protocolo para a 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 um protocolo simples para a produção de haploides e duplohaploides para cv. Mudicode.

Já a cultura *in vitro* de anteras tem sido relatada com sendo um método eficiente para produção de haploides em muitas espécies vegetais (FERRIE *et al.*, 1995), inclusive nas cucurbitáceas, com meloeiro (CUNY *et al.*, 1993) e pepino (ASHOK KUMAR; MURTHY; PAEK, 2003; VIZINTIN; BOHANEK, 2004; SUPRUNOVA; SHMYKOVA, 2008; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016). Nesse contexto, a busca por metodologias alternativas à radiação gama, eficientes para a produção de dihaploides em meloeiro, torna-se essencial para reduzir o tempo de obtenção das linhagens puras, nos programas de melhoramento da cultura.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

2 CAPÍTULO 1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MELOEIRO AMARELO

RESUMO

O meloeiro é uma das hortaliças mais relevantes no mundo. Nos programas de melhoramento que visam à obtenção de plantas haploides e di-haploides, é de fundamental importância que sejam desenvolvidos métodos eficientes de regeneração *in vitro* de plantas por meio da cultura de tecidos. Na literatura estão disponíveis protocolos para a regeneração de plantas de meloeiro, entretanto, poucos são aqueles que tratam da utilização de explantes obtidos a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação. Além disso, não existem relatos de trabalhos utilizando gavinha como explante. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi definir o tipo de explante e o procedimento de desinfestação mais adequados para o estabelecimento *in vitro* da cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, a partir de explantes oriundos de tecidos diploide e haploide. Para as fontes de explantes diploides, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 4), sendo três tipos de explantes (gema apical, folha jovem e gavinha) e quatro desinfestações (I. etanol 70% (1 min) + hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,1% de cloro ativo; II. etanol 70% (2 min) + NaClO com 0,2% de cloro ativo; III. etanol 70% (3 min) + NaClO com 0,3% de cloro ativo e IV. etanol 70% (4 min) + NaClO com 0,4% de cloro ativo). Os 12 tratamentos foram distribuídos em seis repetições de cinco tubos, contendo um explante cada. Para a fonte de explante haploide (antera), o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 4), sendo dois estádios de desenvolvimento da flor masculina (pré-antese e antese) e quatro desinfestações (procedimentos equivalentes aos utilizados nos explantes diploides), totalizando oito tratamentos, com seis repetições de cinco tubos contendo um explante cada, por tratamento. O percentual de oxidação e de contaminação por microrganismos foi avaliado 60 dias após a introdução dos explantes diploides, e 30 dias após a inoculação dos explantes haploides, ambos *in vitro*. Foi estimada a correlação entre as porcentagens de contaminação e oxidação, considerando os tipos de explante estudado. O explante gavinha apresentou o menor índice de contaminação, quando submetido à desinfestação I. O aumento da concentração de cloro na solução de desinfestação propiciou maior índice de oxidação dos explantes. De modo geral, o percentual de contaminação foi inversamente proporcional ao percentual de oxidação. Considerando cada explante, essa correlação foi significativa apenas para gema apical e folha jovem, mas não para gavinha. Portanto, o explante gavinha e a desinfestação em solução 0,1% de cloro ativo é a combinação

mais adequada para o estabelecimento da cultura *in vitro* do meloeiro amarelo. Em relação ao explante haploide, não foi observada oxidação em nenhum tratamento. As anteras oriundas de flores em estágio de pré-antese, além de apresentarem menor contaminação (3%) do que as em antese (25%), não registraram diferença significativa entre os tratamentos. Por outro lado, nas flores em antese, embora os tratamentos com hipoclorito de sódio mais concentrado e com maiores intervalos de tempo em etanol induzissem baixos níveis de contaminação, após a desinfestação os grãos de pólen se desprenderam das anteras. Desse modo, conclui-se que explantes oriundos de flores em estágio de pré-antese são mais adequados e o protocolo de desinfestação I é recomendado tanto para gavinha quanto para anteras em estágio de pré-antese, do híbrido de meloeiro amarelo Goldex.

Termos para indexação: *Cucumis melo*. Explantes. Contaminação.

ABSTRACT

The melon is one of the most relevant vegetables in the world. In breeding programs aimed at obtaining haploid and dihaploid plants, it is of fundamental importance that efficient methods of in vitro plant regeneration through tissue culture are developed. In the literature protocols are available for the regeneration of melon plants, however, few are those that deal with the use of explants obtained from plants grown in greenhouse. In addition, there are no reports of work using tendril as an explant. Therefore, the objective of this work was to define the type of explant and the most adequate disinfection procedure for the in vitro establishment of Goldex yellow hybrid melon (*Cucumis melo* L. var *inodorus*), from explants originating from diploid and haploid. For the sources of diploid explants, the experimental design was completely randomized, in a factorial scheme (3 x 4), three types of explants (apical bud, young leaf and tendril) and four disinfections (I. ethanol 70% (1 min) + sodium hypochlorite (NaClO) with 0.1% active chlorine, 70% ethanol (2 min) + NaClO with 0.2% active chlorine, 70% ethanol (3 min) + NaClO, 3% active chlorine and 70% ethanol (4 min) + NaClO with 0.4% active chlorine). The 12 treatments were distributed in six replicates of five tubes, containing one explant each. For the haploid explant source (anther), the experimental design was completely randomized, in a factorial scheme (2 x 4), two stages of male flower development (pre-anthesis and anthesis) and four disinfections (procedures equivalent to those used in the diploid explants), totaling eight treatments, with six replicates of five tubes containing one explant each, per treatment. The percentage of oxidation and contamination by microorganisms was evaluated 60 days after the introduction of the diploid explants, and 30 days after the inoculation of the haploid explants, both in vitro. The correlation between the percentages of contamination and oxidation was estimated, considering the types of explant studied. The explant tendon showed the lowest contamination index when submitted to disinfection I. The increase of chlorine concentration in the disinfection solution provided a higher oxidation index of the explants. In general, the percentage of contamination was inversely proportional to the percentage of oxidation. Considering each explant, this correlation was significant only for apical bud and young leaf, but not for tendril. Therefore, the apical bud explant and disinfection in 0.1% active chlorine solution is the most appropriate combination for establishing the in vitro culture of yellow melon. Regarding the haploid explant, no oxidation was observed in any treatment. Anthers from pre-anthesis flowers, in addition to presenting lower contamination (3%) than those in anthesis (25%), did not present a significant difference between the treatments. On the other hand, in flowers in anthesis,

although the treatments with sodium hypochlorite more concentrated and with longer intervals in ethanol induced low levels of contamination, after the disinfestation the pollen grains were detached from the anthers. Thus, it is concluded that explants from flowers in the pre-anthesis stage are more adequate and the protocol of disinfestation I is recommended for both tendrils and anthers in the pre-anther stage of the Goldex yellow melon hybrid.

Index terms: *Cucumis melo*. Explants. Contamination.

INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma das hortaliças mais relevantes no mundo. Em 2016, foram colhidos aproximadamente 1,25 milhões de hectares com essa cultura, atingindo uma produção de 29,5 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2018). O Brasil, no ano de 2017, produziu mais de 540 mil toneladas de frutos, em 23.377 ha plantados (IBGE, 2018). A região Nordeste foi responsável por mais de 95% dessa produção nacional, sendo os Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte os principais produtores, contribuindo com 80% do total regional (IBGE, 2018).

Nos últimos vinte anos, a cultura incrementou sua participação nas exportações do país, passando de 45,7 mil toneladas, em 1997, para mais de 233,7 mil toneladas, em 2017, sendo uma fruta brasileira genuinamente de exportação, onde mais de 40% da produção é exportada (BRASIL, 2018). Praticamente toda exportação é feita pelo polo de produção do RN/CE, que é formado pelos agropólos de Mossoró/Açu (RN) e Baixo Jaguaribe (CE), que, em 2017, absorveu mais de 98% de exportações nacionais de melão (BRASIL, 2018).

No Brasil, as principais cultivares de meloeiro plantadas são de *Cucumis melo* var. *inodorus*. Dentre estes, o mais utilizado pelos produtores é o híbrido Goldex, que apresenta produtividade acima de 20 t/ha e frutos com polpa branca e casca levemente rugosa com cor amarelo-ouro. São frutos com alto teor de sólidos solúveis (acima de 12° Brix), ideais para exportação (COSTA, 2010).

Segundo Dong *et al.* (2016) são utilizados três processos diferentes de obtenção de plantas haploides e homozigotas dihaploides nos programas contemporâneos de melhoramento genético de cucurbitáceas: partenogênese haploide *in situ* (induzida principalmente por polinização com pólen irradiado); ginogênese *in vitro* (cultivo *in vitro* de ovários e de óvulos) e androgênese *in vitro* (cultivo *in vitro* de anteras e de micrósporos). Porém, para a aplicação dessas técnicas biotecnológicas, Pereira *et al.* (1999) ressaltam que é de fundamental importância que se obtenham métodos eficientes de regeneração de plantas por meio da cultura de tecidos.

Para meloeiro, têm sido descritos protocolos de indução e de regeneração pela via tanto organogênica quanto embriogênica. A regeneração de plantas tem sido obtida por meio de explantes oriundos de tecidos diploides, tais como: cotilédone (MOLINA; NUEZ, 1995; GUIZ *et al.*, 2000; YALÇIN MENDI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014), hipocótilo (MOLINA; NUEZ, 1995), folha (MOLINA; NUEZ, 1995; GUIZ *et al.*, 2000), gema apical (NADERI *et al.*, 2016), pecíolo (NADERI *et al.*, 2016), raiz (KATHAL *et al.*, 1994),

segmento nodal (EZURA *et al.*, 1992) e embrião zigótico (FICCADENTI; ROTINO, 1995; RHIMI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2014). Considerando tecidos gaméticos, poucos são os trabalhos desenvolvidos para a cultura, visando à produção de haploides, como os que usam óvulos, anteras e ovários (DRYANOVSKA; ILEVA, 1983; DRYANOVSKA, 1985; FICCADENTI *et al.*, 1999; KOLI; MURTHY, 2013; MALIK *et al.*, 2011). O uso de anteras está restrito a dois trabalhos, não sendo relatada, em nenhum deles, a metodologia para o estabelecimento *in vitro* do explante (DRYANOVSKA; ILEVA, 1983; DRYANOVSKA, 1985). Além disso, uma análise conjunta de todos esses estudos revela uma grande variação nas respostas morfogênicas, indicando que diversos fatores podem afetar a eficiência dos protocolos, tais como genótipo, fonte de explante, condições de cultivo e fatores físicos.

Cid e Teixeira (2010) mencionam que a escolha do tipo de explante a ser introduzido *in vitro* poderá ser influenciada por vários fatores, tais como: disponibilidade de material, nível de contaminação, juvenildade do tecido e estação do ano, e que nem todos os explantes reagem da mesma forma a uma determinada condição *in vitro*.

A maioria dos trabalhos com a cultura de tecidos de meloeiro utilizam explantes obtidos a partir da germinação *in vitro* de sementes, sendo poucos aqueles que fazem uso de explantes excisados de plantas adultas (STIPP *et al.*, 2001). O uso de explantes obtidos a partir da germinação de sementes *in vitro* é uma prática mais empregada, tendo em vista que a desinfestação é feita na própria semente, e não diretamente nos explantes a serem introduzidos *in vitro* (Tabela 1). Porém, quando se faz uso de explantes excisados de material mantido no campo ou em casa de vegetação, a desinfestação, ou seja, a remoção de contaminantes existentes na superfície do próprio explante é um passo inevitável na cultura *in vitro* (CID; TEIXEIRA, 2010).

O processo de desinfestação, primeira etapa para o estabelecimento de uma cultura *in vitro*, implica na eliminação dos microrganismos superficiais do explante, a fim de evitar contaminações extremamente prejudiciais na introdução, incubação e manipulação do material. Os microrganismos contaminantes são geralmente bactérias e fungos (SOUZA *et al.*, 2006a). Segundo esses autores, as contaminações fúngicas são mais fáceis de controlar do que as bacterianas, além de ocorrerem com menor frequência. Já as contaminações bacterianas são realmente mais drásticas e trazem como consequências perda de tempo e recursos financeiros ou genéticos, para eliminação dos frascos contaminados, e riscos de distribuição de plantas contaminadas.

1 Tabela 1- Genótipos/cultivares e procedimentos utilizados na desinfestação de sementes de meloeiro, visando o estabelecimento da cultura *in vitro*.

Genótipo/Cultivar	Remoção do tegumento antes da desinfestação	Procedimento de desinfestação das sementes				Observação	Referência bibliográfica
		Etanol 70%	NaClO (concentração - tempo)	Detergente na solução de NaClO	Enxágues em água destilada autoclavada		
Galia, Piel de Sapo, Blanco e BGV-130 (Charentais)	Sim	Não	1,0 % - 20 minutos	Não	6	Após a desinfestação, armazenado em água autoclavada durante a noite a 26°C	García-Almodóvar <i>et al.</i> , 2017
Mashhadi e Eivanaki	Sim	Não	5,0 % - 30 minutos	Não	4	Água de enxágue a 50 °C	Raji <i>et al.</i> , 2017
Gogarab	Sim	Dois minutos	1,5 % - 20 minutos	2 gotas de Tween-20 por 100 mL de solução	4	-	Naderi <i>et al.</i> , 2016
'Charentais-T', 'Vedrantais', 'Isabelle' e linhagens DH (NAD, DH-L2 e DH-L6)	Sim	De 30 a 60 segundos	1,5 % - 30 minutos	Não	3 ou 4	-	Sebastiani & Ficcadenti, 2016
Cantaloup Charentais	Sim	Não	5,0 % - 30 minutos	2 gotas de 7X-0-matic	Três (5, 10 e 15 minutos)	Remoção do tegumento por meio da imersão em solução de HCl (10%)	Peraita, 2016
CM-23 (linhagem andromonoica)	Sim	30 segundos	Não*	Não	1	*Solução de HgCl ₂ a 0,1% por 10 minutos	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Honeydew	Não	Não	3,0 % - 30 minutos	1 gota de Tween-20	3	Imersão em água autoclavada por 4 a 8 horas para retirada do tegumento	Ren <i>et al.</i> , 2013
Hasanbey e Cinikiz	Sim	10 minutos	20,0 % - 10 minutos	2 gotas de Tween-20 por 100 mL	3	-	Tekdal & Centiner, 2013
Geumrang, Geumssaragi, Geumguan, Geumdong, Gohyang and Geumnodajieunchun	Não	Não	0,6 % - 20 minutos	3 gotas de Tween-20 por 50 mL	3	-	Choi <i>et al.</i> , 2012
Linhagens F39 e 141 (<i>reticulatus</i>) e TMS (<i>inodorus</i>)	Não	Não	3,0 % - 30 minutos	1 gota de Tween-20	3	Imersão em água autoclavada por 4 a 8 horas para retirada do tegumento	Ren <i>et al.</i> , 2012
Khatooni	Sim	Dois minutos	1,5 % - 20 minutos	2 gotas de Tween-20	4	Enxague em água autoclavada depois da imersão em etanol 70%	Naderi <i>et al.</i> , 2011
Gaúcho	Sim	Não	2,0 % - 20 minutos	1 gota de detergente	3	-	Pinho <i>et al.</i> , 2010
<i>Cucumis melo</i> var. <i>flexuosus</i>	Sim	10 minutos	1,0 % - 20 minutos	Não	6	-	Yalçin Mendi <i>et al.</i> , 2010
Genótipos OSO-1, OSO-2, OSO-3, PQRG-1, PQRG-2, PQRG-3 e EM-1	Sim	10 minutos	4,5 % - 20 minutos	8 gotas de Tween-20	3	Imersão em solução de Benomyl (100 mg/L) por 5 minutos pré-enxágue	Melara & Arias, 2009

A desinfestação dos explantes é frequentemente realizada por meio de alvejantes comerciais à base de cloro, embora diferentes substâncias possam ser utilizadas para essa finalidade. O teor de cloro ativo desses alvejantes varia de 2,0 % a 2,5% e, geralmente, sua fonte é o hipoclorito de sódio (NaClO), sem especificar sua concentração, o que é uma limitação (CID; TEIXEIRA, 2010).

Nos procedimentos citados na literatura para a desinfestação de sementes de meloeiro o alvejante mais empregado é o hipoclorito de sódio (FICCADENTI; ROTINO, 1995; KINTZIOS *et al.*, 2004; YALÇIN MENDI *et al.*, 2010; MORADIMAND *et al.* 2011; NADERI *et al.*, 2016), sendo que a concentração varia de 0,1 % (KINTZIOS *et al.*, 2004) a 20 % (TEKDELA; CENTINER, 2013). Outra formulação comercial usada para a assepsia das sementes de meloeiro é o hipoclorito de cálcio (CaOCl₂), nas concentrações de 2,5 % (GUIS *et al.*, 2000) e 5,0 % (RHIMI *et al.*, 2006). Além dessas substâncias são citadas etanol 70 % (FICCADENTI; ROTINO, 1995; YALÇIN MENDI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014; NADERI *et al.*, 2016), cloreto de mercúrio (HgCl₂) de 0,1% a 0,6% (ZHANG *et al.*, 2014) e o detergente Tween 20 (TEKDEAL; CENTINER, 2013; NADERI *et al.*, 2016).

Em relação ao tempo de exposição dos explantes às soluções desinfestantes, são citados para solução de álcool 70% de 15 segundos (EZURA *et al.*, 1992) até 10 minutos (YALÇIN MENDI *et al.*, 2010; TEKDEAL; CENTINER, 2013), e para a solução de hipoclorito de sódio de 10 minutos (MORADIMAND *et al.*, 2011) a 30 minutos (FICCADENTI; ROTINO, 1995). Em relação ao número de enxagues com água destilada autoclavada, pode variar de um (ZHANG *et al.*, 2014) a seis (YALÇIN MENDI *et al.*, 2010).

Já para a desinfestação de explantes excisados de plantas de meloeiro mantidas em casa de vegetação, Stipp *et al.* (2001) recomendam que as folhas jovens coletadas sejam primeiramente lavadas em água corrente e depois, desinfestadas superficialmente em solução de água sanitária comercial (contendo 0,6% de hipoclorito de sódio) por 15 minutos, seguida de três enxagues com água destilada autoclavada.

A desinfestação deve ser feita em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, o que nem sempre impede que contaminações às vezes ocorram (SOUZA *et al.*, 2006a). Além de problemas graves de contaminação, a oxidação por polifenóis no meio de cultura é outro entrave do cultivo *in vitro* (SOUZA *et al.*, 2006b).

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivos definir os procedimentos de desinfestação e os explante diploide e haploide mais adequados para o estabelecimento *in vitro* da cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE, em 2016.

Sementes de meloeiro Amarelo, híbrido Goldex, foram semeadas em bandejas de 200 células contendo substrato HS Florestal e pó de coco seco na proporção de 1:1. Dez dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de cinco litros contendo areia. Plantas com aproximadamente duas e quatro semanas, depois do transplante, foram usadas como fonte dos explantes diploides e haploides, respectivamente.

O meio de cultura foi preparado de acordo com a formulação de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (Merck®) a 6,5 g L⁻¹, sem a adição de fitorreguladores. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 121°C, por 15 minutos. Em capela de fluxo laminar, os explantes (folhas, gemas apicais e segmentos de gavinha) foram introduzidos, após desinfestação, nos tubos de ensaio (tamanho 25 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento), contendo 10,0 mL de meio de cultura e apenas um explante por tubo de ensaio.

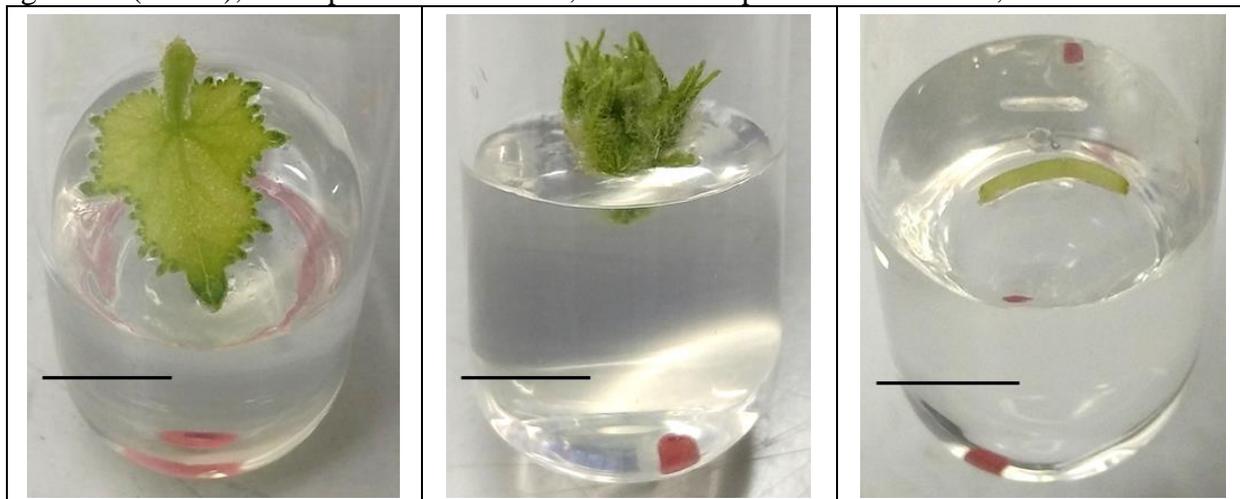
As culturas inicialmente foram mantidas em sala de crescimento, a 25 ± 1°C, no escuro, durante sete dias, sendo posteriormente submetidas à intensidade luminosa próxima de 30 μmol m⁻² s⁻¹, sob fotoperíodo de 16 horas de luz.

Semanalmente as culturas foram avaliadas em relação à oxidação dos explantes e contaminação por microrganismos. Os explantes foram considerados oxidados quando apresentavam um amarelecimento inicial seguido de escurecimento na superfície do tecido, com posterior possibilidade de morte do explante. A avaliação final foi efetuada 60 dias após a introdução dos explantes diploides, e 30 dias após a inoculação dos explantes haploides, ambos *in vitro*, considerando-se o percentual de explantes oxidados e contaminados.

Explantes diploides

Foram utilizados como explantes: folhas jovens (em processo de expansão foliar, localizadas próximas às regiões apicais), gemas apicais (contendo primórdios foliares) e segmentos de ápice de gavinha, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento (Figura 1).

Figura 1- Tipos de explantes diploides de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex utilizados: folha jovem (esquerda), gemas apicais (centro) e segmento de gavinha (direita), com aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Barra = 1,0 cm.



Para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de meloeiro, a partir de explante diploide, foi conduzido um experimento visando definir o método de desinfestação e o tipo de explante mais eficientes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 4), constituído por três tipos de explantes (folha jovem, gema apical e gavinha) e quatro procedimentos de desinfestação: (I. Etanol 70% (1 min) + hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,1% de cloro ativo (7,5 min); II. Etanol 70% (2 min) + NaClO com 0,2% de cloro ativo (7,5 min); III. Etanol 70% (3 min) + NaClO com 0,3% de cloro ativo (7,5 min) e IV. Etanol 70% (4 min) + NaClO com 0,4% de cloro ativo (7,5 min)), todos finalizados com três enxagues com água destilada e autoclavada, totalizando 12 tratamentos, em seis repetições, sendo cada repetição formada por cinco tubos contendo um explante cada.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, para posterior análise de variância e, quando não foi possível ajuste por meio da transformação Box-Cox (1964), os mesmos foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo as médias comparadas pelo teste de Bonferroni em nível de significância de 5%. Também foram estimadas as correlações entre as porcentagens de contaminação e oxidação, de modo geral e para cada tipo de explante, sendo a significância estimada pelo teste t (5%).

Explantes haploides

Como explantes, foram utilizadas flores masculinas em dois estádios de desenvolvimento (pré-antese e antese) (Figura 2).

Figura 2- Flor masculina de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em estágio de pré-antese (A) e de antese (B); detalhe das tecas ainda fechadas, na flor em pré-antese (C) e abertas, expondo os grãos de pólen (D).



O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 4), constituído de dois estádios de desenvolvimento da flor masculina (flores em pré-antese e flores em antese) e quatro procedimentos de desinfestação: (I. Etanol 70% (1 min) + hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,1% de cloro ativo (7,5 min); II. Etanol 70% (2 min) + NaClO com 0,2% de cloro ativo (7,5 min); III. Etanol 70% (3 min) + NaClO com 0,3% de cloro ativo (7,5 min) e IV. Etanol 70% (4 min) + NaClO com 0,4% de cloro ativo (7,5 min)), todos finalizados com três enxagues com água destilada e autoclavada, totalizando 8 tratamentos, em 6 repetições, sendo cada repetição formada por cinco tubos de ensaio contendo um explante cada.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, para posterior análise de variância e, quando não foi possível ajuste por meio da transformação Box-Cox (1964), os mesmos foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo as médias comparadas pelo teste de Bonferroni em nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Explantos diploides

De uma forma geral, os maiores índices de contaminação foram verificados nos explantes de gema apical e de folha jovem submetidos a menor concentração de cloro ativo (0,1%) e menor tempo de imersão em etanol 70%. Esses mesmos tipos de explantes, quando submetidos à desinfestação IV, apresentaram índices menores de contaminação. De fato, espera-se que haja redução da porcentagem de contaminação com o aumento da concentração de cloro ativo na solução desinfetante. Em relação aos tipos de explantes, os de gema apical e de folha jovem, no procedimento I apresentaram os maiores índices de contaminação, 76,67% e 70%, respectivamente, em relação aos de gavinha, 3,33%. Já nos procedimentos II, III e IV, esses valores foram menores do que aqueles registrados no procedimento I, indicando que com os aumentos da concentração de cloro ativo e do tempo de imersão em etanol 70%, ocorreu uma menor contaminação desses explantes (Tabela 2).

As gavinhas apresentaram os menores índices de contaminação no procedimento I, quando comparados os três tipos de explantes. No entanto, diferentemente do que foi observado para os explantes de gema apical e de folha jovem, o aumento da concentração de cloro ativo não resultou em redução da contaminação nos explantes de gavinha. Por ser um tecido com menor superfície de contato e não possuir tricomas, a aderência dos contaminantes é dificultada, o que faz desse tecido um explante adequado para o estabelecimento *in vitro* da cultura, em comparação aos outros dois tipos testados.

É importante ressaltar que a maioria das contaminações presentes nos explantes era de origem bacteriana. Dentre os trabalhos citados anteriormente, apenas dois, o de Molina e Nuez (1995) e de Stipp *et al.* (2001) fazem menção à contaminação. Molina e Nuez (1995) utilizaram explantes de cotilédone, folha jovem e hipocótilo, excisados de embriões zigóticos germinados *in vitro*, constatando que a contaminação bacteriana comprometeu principalmente os explantes de cotilédone e hipocótilo. Já Stipp *et al.* (2001) verificaram menor contaminação nos explantes de cotilédones, obtidos de embriões zigóticos germinados *in vitro*, em comparação com os explantes de folha oriundos de plantas germinadas na casa de vegetação. Entretanto, esses autores não citam o tipo de contaminação presente nos explantes.

Tabela 2- Porcentagens de contaminação e de oxidação de gemas apicais, folhas jovens e gavinhas de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em quatro procedimentos de desinfestação dos explantes, aos 60 dias de inoculação *in vitro*.

Explante	Desinfestação ¹				Média
	I	II	III	IV	
----- Contaminação (%) -----					
Gema apical	76,67 bB ²	55,00 bB	13,33 aA	3,33 aA	37,08
Folha jovem	70,00 cB	20,00 bAB	20,00 bA	0,00 aA	27,50
Gavinha	3,33 aA	10,00 aA	6,67 aA	3,33 aA	5,83
Média	36,67	15,00	13,33	1,67	16,67
----- Oxidação (%) -----					
Gema apical	0,00 aA	5,00 abA	16,67 bA	96,67 cB	29,58
Folha jovem	3,33 aA	4,00 aA	6,67 aA	93,33 bB	26,83
Gavinha	6,67 aA	13,33 aA	66,67 bB	70,00 bA	39,17
Média	5,00	8,67	36,67	81,67	33,00

¹/Procedimentos de desinfestação: I. Etanol 70% (1 min) + hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,1% de cloro ativo (7,5 min); II. Etanol 70% (2 min) + NaClO com 0,2% de cloro ativo (7,5 min); III. Etanol 70% (3 min) + NaClO com 0,3% de cloro ativo (7,5 min) e IV. Etanol 70% (4 min) + NaClO com 0,4% de cloro ativo (7,5 min). Todos os procedimentos foram seguidos por três enxagues em água destilada autoclavada, por um minuto.

²/Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, e mesma letra minúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Quanto à oxidação dos explantes, os maiores valores foram constatados no procedimento IV, no qual o material vegetal foi exposto à concentração mais alta de cloro ativo. De uma forma geral, os dados obtidos indicam que quanto maior a concentração de cloro ativo, na solução desinfestante, maior o índice de oxidação.

Oxidação em cultura de tecidos pode ser definida como o escurecimento de tecidos cortados que resulta da reação de compostos fenólicos, liberados ao meio, com o oxigênio (CARVALHO *et al.*, 2011). Segundo Cid e Teixeira (2010) o corte do explante com bisturi pode desencadear a oxidação fenólica, responsável pela cor marrom do explante.

Dentre os trabalhos citados com a cultura de tecidos de meloeiro, apenas Rhimi *et al.* (2006) se refere à oxidação. Esses autores utilizaram explantes de hipocótilo, cotilédone e embriões zigóticos, obtidos a partir da germinação *in vitro* de sementes, constatando que aqueles mantidos em meio de cultura sem a adição de fitorregulador não exibiram desenvolvimento, e em poucos dias se tornaram marrons e necrosaram.

Foram estimadas correlações negativas significativas entre os percentuais de explantes oxidados e contaminados, indicando que essas variáveis são inversamente proporcionais.

Portanto, o aumento da concentração de cloro na solução de desinfestação, embora tenha sido eficiente na redução da contaminação, proporcionou maior índice de oxidação dos explantes. Entretanto, considerando as correlações para cada tipo de explante, observou-se que não houve correlação significativa para o explante gavinha (Tabela 3). Esse comportamento está diretamente relacionado com sua morfologia, por um lado filiforme e sem pelos, que contribui para o baixo nível de contaminação observado, por outro lado reduzida em volume, permitindo, após o corte dos segmentos de 1 cm de comprimento, contato dos agentes desinfestantes com o conteúdo interno do tecido vegetal. Já para os explantes de gema apical e folha jovem, que possuem superfície irregular e presença de tricomas, houve correlação significativa entre as variáveis. A alta concentração de NACIO e a prolongada exposição ao etanol 70%, capazes de eliminar os contaminantes do tecido, são danosas também aos explantes.

Tabela 3- Análise de correlação entre contaminação e oxidação em explantes de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação *in vitro*.

Explante	r *	Significância estatística
Gavinha	-0,26	p>0,22
Gema apical	-0,66	p<0,01
Folha jovem	-0,60	p<0,01
Geral	-0,54	p<0,01

*r = coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis contaminação e oxidação dos explantes.

Sendo assim, a escolha do procedimento de desinfestação mais adequado deve levar em consideração tanto o índice de contaminação quanto de oxidação. Os procedimentos desejados são aqueles que aliam os menores índices desses dois parâmetros. Portanto, entre os explantes testados, os de gavinha e o procedimento I são os mais adequados para o estabelecimento da cultura *in vitro* do meloeiro do tipo Amarelo.

Explantes haploides

Os procedimentos de desinfestação, o estágio de desenvolvimento das flores, e a interação entre esses fatores foram significativos (Tabela 4). Considerando os tratamentos de desinfestação, os dois menos concentrados (I e II) se mostraram eficientes para desinfestar as anteras oriundas das flores em pré-antese. No entanto, os tratamentos (III e IV) reduzem a

contaminação em ambos os explantes, não sendo verificada contaminação nas anteras submetidas ao tratamento mais concentrado (4).

Tabela 4- Percentual de contaminação dos explantes de antera obtidos de flores em antese e pré-antese de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, nos quatro procedimentos de desinfestação, 30 dias após a inoculação.

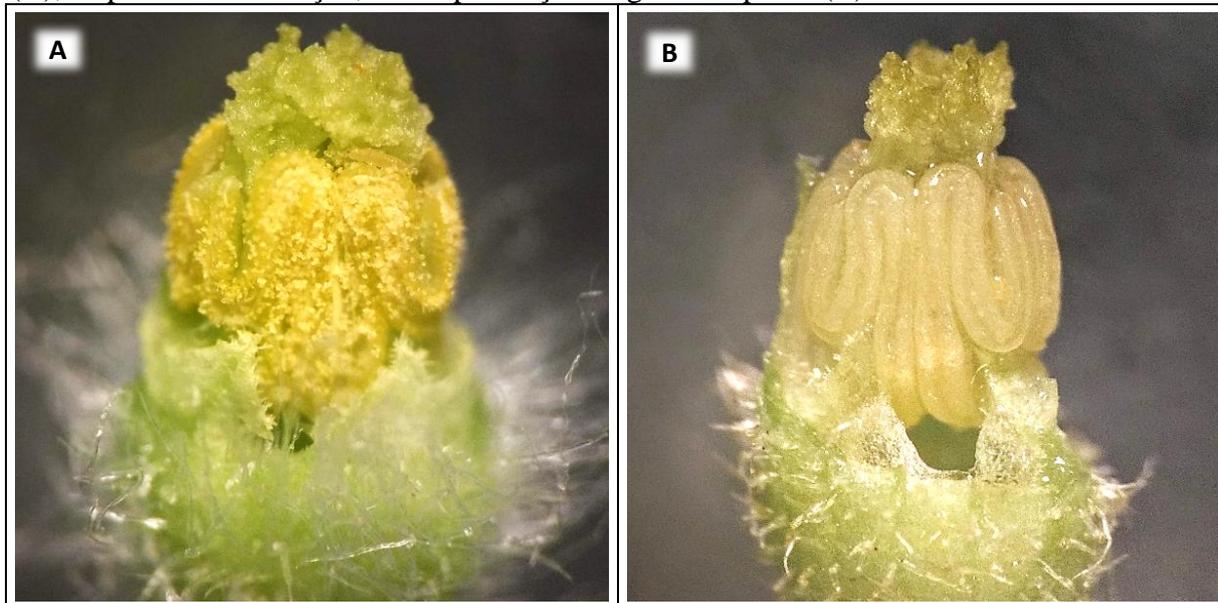
Estádio das flores	Procedimento de desinfestação ¹				Média
	I	II	III	IV	
Antese	53,3 bB ²	36,7 bB	10,0 aA	0,0 aA	25,0
Pré-antese	3,3 aA	6,7 aA	3,3 aA	0,0 aA	3,3
Média	28,3	21,7	6,7	0,00	14,17

¹/Procedimentos de desinfestação: I. Etanol 70% (1 min) + hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,1% de cloro ativo; II. Etanol 70% (2 min) + NaClO com 0,2% de cloro ativo; III. Etanol 70% (3 min) + NaClO com 0,3% de cloro ativo e IV. Etanol 70% (4 min) + NaClO com 0,4% de cloro ativo. Todos os procedimentos foram seguidos por três enxagues em água destilada autoclavada, por um minuto.

²/Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, e mesma letra minúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Comparando-se os diferentes estágios das flores, houve diferença apenas nas desinfestações 1 e 2, com menores índices de contaminação nas anteras oriundas de flores em pré-antese. Esse comportamento é esperado, uma vez que, nas flores em pré-antese, a antera não fica exposta aos agentes contaminantes. Por outro lado, nas flores em antese, além das anteras ficarem em contato com o meio externo, as tecas já se encontram abertas, possibilitando a remoção dos grãos de pólen. Assim, a deiscência das anteras proporcionou, durante o processo de desinfestação das flores em estágio de antese, a perda de praticamente todos os grãos de pólen (Figura 3). Diferente do observado nos explantes diploides, não houve oxidação de nenhuma antera. Vale ressaltar que, embora com intervalo de tempo até a avaliação duas vezes maior, os tecidos somáticos começaram a apresentar oxidação pouco depois da segunda semana. É fácil compreender a falta de oxidação nas flores em pré-antese, onde as anteras estão protegidas pela corola, e o hipoclorito, que é um forte agente oxidante, não entra em contato com o explante. No entanto, até mesmo nas anteras expostas ao agente desinfestante não houve presença de oxidação. Nesses tecidos, os grãos de pólen são lavados após a desinfestação, restando apenas as tecas. Essas estruturas podem ser menos propensas à oxidação, quando comparadas com tecidos mais tenros, como folhas e pontas de gavinha.

Figura 3- Anteras de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex oriundas de flores em antese. Antes da desinfestação, com os grãos de pólen aderidos à teca (A), e após a desinfestação, sem a presença dos grãos de pólen (B).



CONCLUSÃO

Para o estabelecimento da cultura *in vitro* do meloeiro do tipo Amarelo, recomenda-se o uso de explantes de gavinha, para os tecidos diploides, e o uso de anteras oriundas de flores em pré-antese, como explante haploide.

A desinfestação com menor tempo de exposição ao etanol 70% e menor concentração de cloro ativo foi a mais adequada aos explantes selecionados.

3 CAPÍTULO 2 CALOGÊNESE EM ANTERAS E GAVINHAS DE MELOEIRO AMARELO

RESUMO

Nesse trabalho, o primeiro com a indução *in vitro* de calos em gavinhas de meloeiro, o objetivo foi estudar o efeito de auxinas e citocininas na indução de calos, organogênicos e embriogênicos, em explantes de gavinhas e anteras de meloeiro Amarelo híbrido Goldex. Em capela de fluxo laminar, os explantes foram desinfestados e inoculados em meio Murashige and Skoog (MS) com e sem adição de fitoreguladores. Para a indução da calogênese, em gavinhas e anteras, foram testadas diferentes combinações de cinetina (KIN) e ácido indolilacético (AIA) (organogênese), bem como de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (embriogênese). Aos 60 dias após inoculação foram avaliadas as variáveis indução de calogênese, intensidade de oxidação (baixa, média e alta), coloração (verde e bege), textura (compacto e friável), área (mm²), massa fresca (mg) e presença de raiz. Não foi observada formação de brotações em nenhum dos meios de cultivo testados. Foram obtidas estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson e modelos de regressão linear entre as duas variáveis, área e a massa fresca dos calos. Realizou-se análise de variância (ANOVA), seguido do método de agrupamento Scott-Knott. A rizogênese ocorreu exclusivamente com o explante gavinha, quando exposto às auxinas AIA e ANA, isoladamente. O enriquecimento do meio MS com auxinas e citocininas nos explantes de anteras estimulou a desdiferenciação dos micrósporos em calos. A calogênese em antera ocorreu apenas quando havia combinação entre as duas classes de reguladores de crescimento. Para gavinha, o meio MS sem adição de fitoreguladores é suficiente para essa resposta morfogenética. Portanto, a calogênese é influenciada pelos reguladores de crescimento tanto na organogênese quanto na embriogênese somática, em ambos os explantes; os calos obtidos a partir de anteras têm potencial para formação de embriões somáticos; e, há forte associação entre a massa e a área dos calos.

Palavras-chave: *Cucumis melo*. Haploide. Multiplicação *in vitro*.

ABSTRACT

In this work, the first one with the *in vitro* induction of calli in melon tendrils, the objective was to study the effect of auxins and cytokinins on the induction of organogenic and embryogenic calluses, on yellow and yellow anther Goldex anthers explants. In laminar flow hoods, the explants were disinfested and inoculated in Murashige and Skoog (MS) medium with and without addition of plant regulators. For induction of calogenesis, in tendrils and anthers, different combinations of kinetin (KIN) and indolylacetic acid (AIA) (organogenesis), as well as 6-benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (ANA) and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (embryogenesis). At 60 days after inoculation, the following variables were evaluated: induction of calogenesis, oxidation intensity (low, medium and high), coloration (green and beige), texture (compact and friable), area of root. No sprouting was observed in any of the culture media tested. Estimates of the Pearson correlation coefficients and linear regression models were obtained between the two variables, area and fresh callus mass. Analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by the Scott-Knott grouping method. The rhizogenesis occurred exclusively with the gavinha explant, when exposed to auxins AIA and ANA, alone. The enrichment of the MS medium with auxins and cytokinins in the anther explants stimulated the dedifferentiation of the microspores in callus. Anther calogenesis occurred only when there was a combination of the two classes of growth regulators. For tendril, the MS medium without addition of phytohormones is sufficient for this morphogenetic response. Therefore, calogens are influenced by growth regulators in both organogenesis and somatic embryogenesis in both explants; calli obtained from anthers have potential for formation of somatic embryos; and there is a strong association between the mass and the callus area.

Key words: *Cucumis melo*. Haploid. *In vitro* multiplication.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cucumis* possui 34 espécies, dentre as quais se destaca a espécie *Cucumis melo* L., que compreende 16 variedades botânicas, das quais três incluem os meloeiros cultivados no Brasil (ZAMBIAZZI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017), possuindo considerável destaque no mercado mundial de hortaliças. Em 2016, sua produção superou 31 milhões de toneladas, em mais de 1,24 milhões de hectares colhidos (FAO, 2018). A maioria das cultivares comerciais de meloeiro é formada por híbridos F₁, portanto, dependente de linhagens parentais, sendo o processo de obtenção dessas linhagens é uma das etapas mais demoradas e onerosas do programa de melhoramento da cultura. Nesse cenário, a cultura de tecidos é uma ferramenta que pode auxiliar o melhoramento genético da espécie, seja pela produção de linhagens dihaploides, seja pela multiplicação *in vitro* da cultura (ALVES *et al.*, 2011; GERMANA, 2011; SEBASTIANI; FICCADENTI, 2016).

Protocolos de cultivo *in vitro* foram estabelecidos para diversas espécies da família Cucurbitaceae, utilizando-se diferentes tipos de explantes (SILVA *et al.*, 2012). No entanto, poucos trabalhos, sem êxito, utilizaram anteras para obtenção de haploides em meloeiro, e nenhum trabalho de propagação da cultura empregou gavinha como explante (DRYANOVSKA; ILEVA, 1983; DRYANOVSKA, 1985). A cultura de anteras permite a obtenção de plantas haploides androgenéticas, possibilitando, após duplicação cromossômica, a obtenção de linhagens homozigóticas em uma única etapa (SILVA *et al.*, 2012). De outro modo, tecidos com alta taxa de multiplicação, como gavinhas, podem ser promissores para a indução de calogênese.

A regeneração de plantas *in vitro* está relacionada principalmente ao equilíbrio entre duas classes principais de fitorreguladores, citocinina e auxina, e à 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, cultivar/variedade, tipo de explante e meio de cultivo (SILVA *et al.*, 2012).

A via organogenética é uma das possibilidades *in vitro* que pode ser empregada na regeneração de plantas, sendo direta, quando não envolve a formação intermediária de calos entre a etapa do cultivo do explante e a de indução das gemas foliares, ou indireta, onde há a necessidade de desdiferenciação do explante, originando calo antes do estabelecimento das células competentes (NUNEZ *et al.*, 2008; BERTOZZO; MACHADO, 2010). Por outro lado, existem genótipos que não respondem à organogênese direta, mesmo sob a influência de diversas concentrações de diferentes reguladores de crescimento (SILVA *et al.*, 2006). Dentre

as auxinas mais conhecidas e mais utilizadas para a indução da embriogênese somática e organogênese estão o 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacético) e o ANA (α -Ácido Naftaleno Acético) (GUO *et al.*, 2011).

Na embriogênese somática, as células somáticas desenvolvem-se, direta ou indiretamente, por meio de diferentes estágios embriogênicos originando uma nova planta sem que ocorra a fusão de gametas (PINHAL *et al.*, 2011). Desse modo, o desenvolvimento de protocolos de regeneração de meloeiro via organogênese/embriogênese indireta auxiliará projetos que visem à obtenção de plantas haploides, a partir do cultivo *in vitro* de pólen ou óvulos, para posterior geração de plantas duplo-haploides.

Nesse contexto, objetivou-se com esse trabalho estudar o efeito de auxinas e citocininas na indução de calos organogênicos e embriogênicos em explantes de gavinha e de antera de meloeiro Amarelo híbrido Goldex.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará, no período de junho a outubro de 2016.

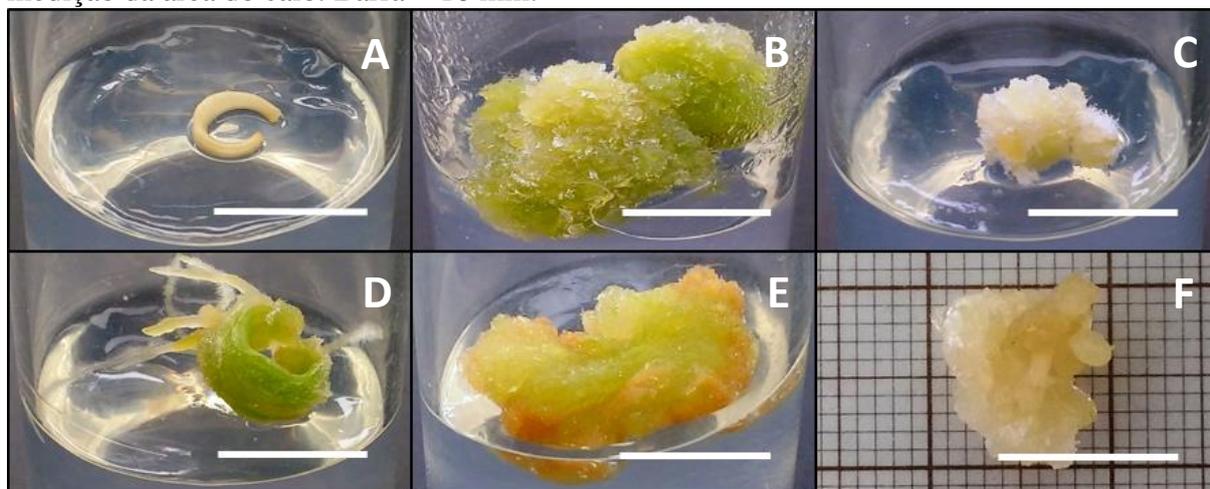
Foram utilizados, como explantes: (I) segmentos com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, de gavinhas; (II) anteras obtidas a partir de botões florais coletados um dia antes da antese, de flores masculinas de meloeiro Amarelo 'Goldex', de plantas cultivadas em casa de vegetação. Em capela de fluxo laminar, os explantes foram desinfestados com solução de álcool 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%) por 7,5 minutos e três enxágues com água destilada autoclavada, um minuto cada. O meio de cultivo básico utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (Gelzan®) a 1,8 g.L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 121°C, por 15 minutos. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com 150 x 25 mm, contendo 10 mL do meio de cultura, e mantidos em sala de crescimento, a 25 ± 1°C, permanecendo no escuro por um período de sete dias. Posteriormente, os explantes foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 25 repetições, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio contendo um explante. Para organogênese, na indução de calogênese em gavinhas e anteras, os tratamentos

corresponderam às combinações entre as concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) (0, 3 e 6 mg.L⁻¹) e de ácido indolacético (AIA) (0, 3 e 6 mg.L⁻¹). E, para embriogênese somática, os tratamentos foram: MS sem regulador de crescimento; MS + 0,2 mg.L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP); MS + 0,2 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA); MS + 0,45 mg L⁻¹ de ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D); MS + 0,2 mg L⁻¹ de BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA; MS + 0,2 mg L⁻¹ de BAP + 0,45 mg L⁻¹ 2,4-D.

Aos 60 dias, foi observada porcentagem de indução de calos. Para aqueles que formaram calos, foram avaliadas as variáveis: intensidade de oxidação (baixa, até um terço da massa calosa oxidada; média, de um terço a dois terços de oxidação; alta, de dois terços a calos completamente oxidados), coloração (verde e bege), textura (compacto e friável), área (mm²), massa fresca (mg) e presença de raiz (Figura 1). A formação de brotações não foi avaliada.

Figura 4- Explante de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex. Características avaliadas: A) ausência de calogênese; B) presença de calo de coloração verde; C) calo de coloração bege; D) presença de raiz; E) oxidação média; e, F) medição da área do calo. Barra = 10 mm.



Em ambos os experimentos, os dados das variáveis área e massa fresca dos calos foram submetidos ao teste de normalidade, efetuando-se, quando necessário, a transformação pelo método de Box-Cox. Realizou-se análise de variância (ANOVA), seguida do método de agrupamento Scott-Knott. Para as variáveis em que não foi possível a transformação, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, foram obtidas as estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as duas variáveis, bem como os modelos de regressão linear. Para as demais variáveis, procedeu-se estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Organogênese em gavinhas

Houve indução de calos em gavinhas para todos os meios testados, indicando possível conteúdo endógeno de auxinas e citocininas no explante. No entanto, esse conteúdo se mostrou insuficiente para promover calogênese na maior parte dos explantes submetidos ao meio de cultivo sem fitorreguladores (Tabela 1).

Quando submetido aos meios de cultura suplementados apenas com a auxina exógena, as gavinhas manifestaram o processo organogênese de raiz em pelo menos 90% dos explantes (Tabela 2). Segundo Taiz e Zeiger (2013), o regulador de crescimento AIA, além de estimular o processo de calogênese em diferentes tecidos vegetais, contribui na constituição de raízes adventícias, embora altas concentrações atuem inibindo o crescimento desse órgão, explicando o comportamento observado nesses meios. A presença de KIN teve um efeito inibitório na formação das raízes.

Por outro lado, a suplementação do meio básico com esse regulador, mesmo na concentração mais baixa, proporcionou a máxima porcentagem de calos formados (Tabela 1). Possivelmente o fornecimento da citocinina no meio de cultivo foi suficiente para balancear o conteúdo endógeno de auxina do explante.

O índice de calogênese variou de 35,29% (MS) a 100% (3-0, 3-3, 6-3, 6-6 mg/L de KIN-AIA) e as maiores áreas e massas dos calos foram obtidas quando os dois reguladores estavam presentes no meio (Tabela 1). O aumento das concentrações desses reguladores não proporcionou acréscimo na indução, na área e na massa dos calos.

A coloração verde foi predominante e os meios que apresentaram as maiores áreas e massas também apresentaram as maiores porcentagens de calos verdes (Figura 2). A taxa de oxidação dos calos cresceu com o aumento da dosagem de cinetina, quando esse regulador era combinado com a auxina. Segundo Cordeiro *et al.* (2007), altas concentrações de citocinina no meio de cultura podem provocar toxidez nos tecidos, fazendo com que não haja absorção dos nutrientes contidos no meio. No entanto, verificou-se que talvez não haja necessidade de adicionar substâncias antioxidantes ao meio de cultivo MS, pois a presença das áreas oxidadas não impediu a produção da massa calosa, uma vez que esses tratamentos mantiveram áreas e massas elevadas. Por outro lado, a taxa de oxidação foi baixa para os meios suplementados com 3 mg.L⁻¹ KIN + 3 mg.L⁻¹ AIA e 3 mg.L⁻¹ KIN + 6 mg.L⁻¹ AIA, que apresentaram,

estatisticamente, as maiores áreas e massas (Tabela 2). Todos os calos apresentaram textura compacta, facilitando a manipulação da estrutura calosa.

Organogênese em anteras

Em anteras, a calogênese só ocorreu nos meios onde ambos os reguladores de crescimento estavam combinados. Esse comportamento é esperado, uma vez que as citocininas costumam induzir, quando combinadas às auxinas, a divisão celular em calos (TAIZ; ZEIGER, 2013). A ausência da calogênese nos meios sem a combinação dos hormônios sugere a falta ou incipiência de auxinas e, ou, citocininas endógenas no explante. A maior porcentagem de indução de calos, bem como a maior área e massa médias, foram alcançadas no meio suplementado com os maiores níveis de ambos os reguladores (6 mg.L^{-1} KIN + 6 mg.L^{-1} AIA).

Ao contrário do ocorrido nas gavinhas, os calos formados a partir das anteras possuíam, quase que exclusivamente, coloração bege (claro) e textura friável (Figura 3). Alguns autores identificam os calos embriogênicos pela coloração e textura. As porções translúcido-brancas ou amareladas com textura friável têm potencial para formação de embriões somáticos (WERNER *et al.*, 2009; IPEKCI; GOZUKIRMIZI, 2005; ARUNYANART; CHAITRAYAGUN, 2005). No presente trabalho, essas características foram identificadas nos explantes de anteras submetidos a reguladores que promovem organogênese. Não foi observado enraizamento em nenhum dos meios testados para organogênese em anteras, e a taxa de oxidação foi menor no meio com maior área e massa (6 mg.L^{-1} KIN + 6 mg.L^{-1} AIA).

Embriogênese somática em gavinhas

Com exceção do meio básico, a calogênese ocorreu em todos os tratamentos (Tabela 3), foi menor no meio suplementado com $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e atingiu valores máximos nos meios onde os reguladores foram combinados. Em relação à área dos calos, não houve diferença significativa entre o meio contendo apenas a citocinina ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP) e os meios acrescidos da combinação desta citocinina com as duas auxinas testadas ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D). No entanto, a maior massa foi alcançada no meio onde BAP foi combinado com ANA. Para Prudente *et al.* (2016), o 2,4-D é a auxina mais utilizada na indução de calogênese, e, segundo Jimenéz (2005), essa auxina é largamente utilizada na indução à embriogênese somática de várias espécies. No presente

trabalho, entretanto, a associação de 2,4-D e BAP gerou calos com menos de 40% da massa média dos cultivados no meio com ANA e BAP. Forket *et al.* (2013) afirmam que as citocininas estimulam a divisão celular na presença de auxinas. Esse comportamento foi observado, uma vez que os menores valores de áreas e massas foram obtidos nos meios acrescidos apenas com as auxinas. No entanto, os valores obtidos quando apenas a citocinina foi adicionada ao meio, indicam da presença de auxina endógena no explante, como na organogênese.

A presença de calos com coloração bege só ocorreu nos meios sem BAP, sendo máxima no meio com 2,4-D (Tabela 4). A oxidação também seguiu essa tendência, e os calos formados nos meios com mistura de reguladores praticamente não apresentaram oxidação (Figura 4). O tratamento apenas com 2,4-D apresentou calos beges e com textura friável e com maior potencial para gerar embriões somáticos, em relação a essas características. A friabilidade também foi acentuada no meio contendo BAP e ANA, mas a coloração dos calos foi exclusivamente verde. Ocorreu rizogênese somente quando ANA foi acrescentada isoladamente ao meio. Esse regulador tem sido muito eficiente na promoção do crescimento de raízes e sua resposta varia com o tipo de tecido, condições fisiológicas da planta e com a concentração da substância no meio de cultivo (XAVIER *et al.*, 2009; FACHINELLO *et al.*, 2005).

Embriogênese somática em anteras

Como na organogênese, o explante só respondeu às doses combinadas dos reguladores, tendo a combinação BAP e 2,4-D proporcionado maior porcentagem de indução de calo e, estatisticamente, as maiores áreas e massas. Além disso, os calos formados nesse meio apresentaram massa semelhante aos calos gerados em 6 mg.L⁻¹ de KIN + 6 mg.L⁻¹ de AIA, que, na organogênese, foi o meio mais eficiente na produção de massa calosa.

A coloração predominante para ambos os meios foi bege e todos os calos apresentavam textura friável (Figura 5), portanto, reúnem características favoráveis à formação de embriões somáticos (WERNER *et al.*, 2009; IPEKCI; GOZUKIRMIZI, 2005; ARUNYANART; CHAITRAYAGUN, 2005). Embora mais de 90% dos calos tenham apresentado nível médio oxidação, o meio contendo BAP e 2,4-D apresentou a menor oxidação.

Como foi constatado no experimento de organogênese, o explante não respondeu às doses de reguladores para formação de raízes. Embora a auxina presente nos grãos de pólen maduros participe do crescimento polarizado do tubo polínico, pouco se sabe acerca do seu

papel durante o desenvolvimento do grão de pólen, fase quando há acúmulo desse hormônio (CHEN; ZHAO, 2008; PAN *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2008; DAL BOSCO *et al.*, 2012). Com esse acúmulo, o tecido pode tornar-se insensível à adição de auxina exógena, o que explicaria, em parte, a inatividade do explante ao tratamento.

Correlação e Regressão linear

Houve correlação significativa positiva entre área e massa, para todos os explantes, tanto no experimento de organogênese quanto de embriogênese somática (Tabela 5). Os modelos de regressão linear gerados foram significativos e apresentaram coeficientes de determinação que variaram de 87 (embriogênese em anteras) a 98% (organogênese em antera), assegurando a confiabilidade das regressões. Portanto, embora os calos sejam estruturas tridimensionais, a análise da área, sobre papel milimetrado, tem estreita associação com sua massa. Para experimentos de calogênese realizados em placas de Petri, o cálculo da área seria uma alternativa adequada à medição da massa, uma vez as áreas podem ser quantificadas com os calos diretamente na placa, evitando o manuseio do explante, sem a sua exposição ao ambiente, mesmo que em condições assépticas.

CONCLUSÕES

Quanto à calogênese a partir de gavinha e anteras de meloeiro amarelo, pode-se concluir que:

É influenciada de forma distinta pelos reguladores de crescimento tanto na organogênese quanto na embriogênese somática, em ambos os explantes;

O enriquecimento do meio MS com auxinas (ANA e 2,4-D) e citocininas (BAP e KIN) estimula a dediferenciação dos grãos de pólen em calos;

Os calos obtidos a partir de anteras têm potencial para formação de embriões somáticos;

Há forte associação entre a massa e a área dos calos.

Tabela 5- Porcentagem de indução de calos organogênicos e médias da área e massa fresca dos calos de gavinha e antera de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex em meio MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA), aos 60 dias de cultivo *in vitro*. %IC = porcentagem de indução de calos.

Meios de cultivo	Gavinha			Antera				
	% IC	Área (mm ²)	Massa (mg)	% IC	Área (mm ²)	Massa (mg)		
MS	35,29	23,27 ± 3,77 c ¹	25,50 ± 4,44 c	0,00	-	-	-	-
0 mg.L ⁻¹ KIN + 3 mg.L ⁻¹ AIA	81,25	79,25 ± 8,87 b	161,88 ± 22,54 b	0,00	-	-	-	-
0 mg.L ⁻¹ KIN + 6 mg.L ⁻¹ AIA	86,21	53,90 ± 5,28 b	117,80 ± 14,77 b	0,00	-	-	-	-
3 mg.L ⁻¹ KIN + 0 mg.L ⁻¹ AIA	100,0	61,96 ± 4,29 b	141,35 ± 24,22 b	0,00	-	-	-	-
3 mg.L ⁻¹ KIN + 3 mg.L ⁻¹ AIA	100,0	185,90 ± 14,55 a	657,34 ± 80,61 a	75,86	32,57 ± 2,93 b		137,44 ± 6,08 c	
3 mg.L ⁻¹ KIN + 6 mg.L ⁻¹ AIA	96,67	192,48 ± 12,95 a	718,61 ± 66,43 a	63,33	35,37 ± 2,95 b		139,90 ± 6,84 c	
6 mg.L ⁻¹ KIN + 0 mg.L ⁻¹ AIA	72,73	69,22 ± 8,05 b	142,20 ± 8,81 b	3,03	-	-	-	-
6 mg.L ⁻¹ KIN + 3 mg.L ⁻¹ AIA	100,0	166,08 ± 12,29 a	636,04 ± 61,48 a	60,00	50,49 ± 5,41 a		175,34 ± 14,72 b	
6 mg.L ⁻¹ KIN + 6 mg.L ⁻¹ AIA	100,0	152,59 ± 16,69 a	572,41 ± 86,49 a	85,19	61,00 ± 4,42 a		200,92 ± 12,53 a	

¹/Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente segundo o teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Tabela 6- Estatística descritiva de aparência, textura e presença de raízes em calos obtidos por organogênese de gavinha e antera de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em meios de cultura MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA), aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Meios de cultivo	Gavinha								Antera								
	Coloração (%)		Intensidade de oxidação (%)			Enraizamento (%)	Textura (%)		Coloração (%)		Intensidade de oxidação (%)			Enraizamento (%)	Textura (%)		
	Bege	Verde	Baixa	Média	Alta		Compacto	Friável	Bege	Verde	Baixa	Média	Alta		Compacto	Friável	
MS	52,94	47,06	29,41	20,59	50,00	3,03	100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 mg.L ⁻¹ KIN + 3 mg.L ⁻¹ AIA	40,63	59,38	62,50	21,88	15,63	93,75	100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 mg.L ⁻¹ KIN + 6 mg.L ⁻¹ AIA	34,48	65,52	82,76	6,90	10,34	89,66	100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 mg.L ⁻¹ KIN + 0 mg.L ⁻¹ AIA	6,90	93,1	65,52	34,48	0,00	0,00	100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 mg.L ⁻¹ KIN + 3 mg.L ⁻¹ AIA	3,45	96,55	75,00	21,43	3,57	0,00	100	0	90,48	9,52	0,00	0,00	100,00	0	15,38	84,62	
3 mg.L ⁻¹ KIN + 6 mg.L ⁻¹ AIA	6,67	93,33	80,00	16,67	3,33	0,00	100	0	90,48	9,52	0,00	23,81	76,19	0	20,00	80,00	
6 mg.L ⁻¹ KIN + 0 mg.L ⁻¹ AIA	59,38	40,63	81,25	3,13	15,63	0,00	100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 mg.L ⁻¹ KIN + 3 mg.L ⁻¹ AIA	3,33	96,67	23,33	76,67	0,00	0,00	100	0	83,33	16,67	0,00	0,00	100,00	0	28,00	72,00	
6 mg.L ⁻¹ KIN + 6 mg.L ⁻¹ AIA	3,70	96,3	44,44	51,85	3,70	0,00	100	0	65,22	34,78	0,00	69,57	30,43	0	8,00	92,00	

Tabela 7- Porcentagem de indução de calos embriogênicos e médias da área e massa fresca dos calos de gavinha e antera de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex em meio MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D), aos 60 dias de cultivo *in vitro*. IC = índice de calogenese.

Meios de cultivo	Gavinha			Antera		
	% IC	Área ¹ (mm ²)	Massa ¹ (mg)	% IC	Área ¹ (mm ²)	Massa (mg)
MS	0,00	-	-	0,00	-	-
0,2 mg.L ⁻¹ BAP	92,31	299,08 ± 34,41 a ²	1105,23 ± 131,73 b	0,00	-	-
0,2 mg.L ⁻¹ ANA	92,31	69,17 ± 8,81 b	222,81 ± 34,90 c	0,00	-	-
0,45 mg.L ⁻¹ 2,4-D	73,33	108,73 ± 21,75 b	391,33 ± 65,74 c	0,00	-	-
0,2 mg.L ⁻¹ BAP + 0,2 mg.L ⁻¹ ANA	100,00	499,36 ± 83,06 a	2484,89 ± 324,46 a	92,86	40,62 ± 8,89 b	67,47 ± 15,14 b
0,2 mg.L ⁻¹ BAP + 0,45 mg.L ⁻¹ 2,4-D	100,00	206,57 ± 20,90 a	979,79 ± 97,87 b	100,00	93,93 ± 9,72 a	211,70 ± 24,31 a

¹Dados transformados pelo método de Box-Cox. ²Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente segundo o teste de Scott-Knott (P<0,05).

Tabela 8- Estatística descritiva de aparência, textura e presença de raízes em calos obtidos por embriogênese somática de gavinha e antera de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em meios de cultura MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D), aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Meios de cultivo	Gavinha							Antera								
	Coloração (%)		Intensidade de oxidação (%)			Textura (%)		Enraizamento (%)	Coloração (%)		Intensidade de oxidação (%)			Textura (%)		Enraizamento (%)
	Bege	Verde	Baixa	Média	Alta	Compacto	Friável		Bege	Verde	Baixa	Média	Alta	Compacto	Friável	
MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,2 mg.L ⁻¹ BAP	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	41,67	58,33	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
0,2 mg.L ⁻¹ ANA	25,0	75,0	92,3	0,0	7,7	100,00	0,00	66,7	-	-	-	-	-	-	-	-
0,45 mg.L ⁻¹ 2,4-D	100,0	0,0	80,0	6,7	13,3	9,09	90,91	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
0,2 mg.L ⁻¹ BAP + 0,2 mg.L ⁻¹ ANA	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	7,14	92,86	0,0	84,6	15,4	7,7	76,9	15,4	0,0	100,0	0,0
0,2 mg.L ⁻¹ BAP + 0,45 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	92,86	7,14	0,0	85,7	14,3	7,1	92,9	0,0	0,0	100,0	0,0

Tabela 9- Correlação e regressão linear entre a área (A) e a massa (M) dos calos de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, para ambos os explantes, nos dois experimentos.

<i>Ensaio / Explante</i>	$r_{(A,M)}^1$	F test	Model ²	R ²
<i>Organogênese</i>				
Antera	0.989**	3.522.237	M = 2.528A + 48.777 **	0.978
Gavinha	0.935**	1.590.870	M = 4.332A - 111.728 **	0.874
<i>Embryogênese</i>				
Antera	0.931**	162.710	M = 2.247A - 11.100 **	0.867
Gavinha	0.945**	506.481	M = 4.354A + 20.178 **	0.893

¹/ correlação de Pearson entre a área e a massa dos calos. ²/ Modelo da regressão linear entre a área e a massa dos calos. **/ significância (P<0,001) para o teste t e para o teste F, da correlação e da análise de variância da regressão entre a área e a massa dos calos, respectivamente.

Figura 5- Aspecto dos explantes de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA). Barra = 10mm.

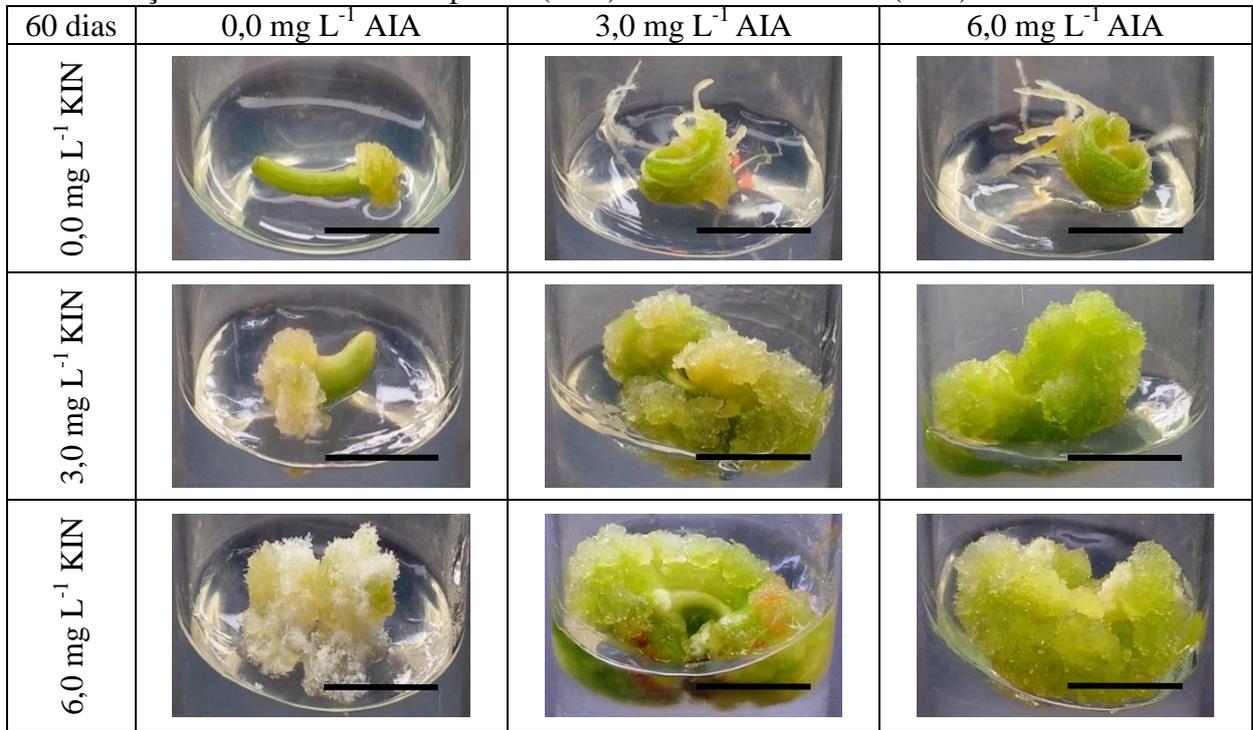


Figura 6- Aspecto dos explantes de antera de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (KIN) e ácido indolacético (AIA). Barra = 10mm.

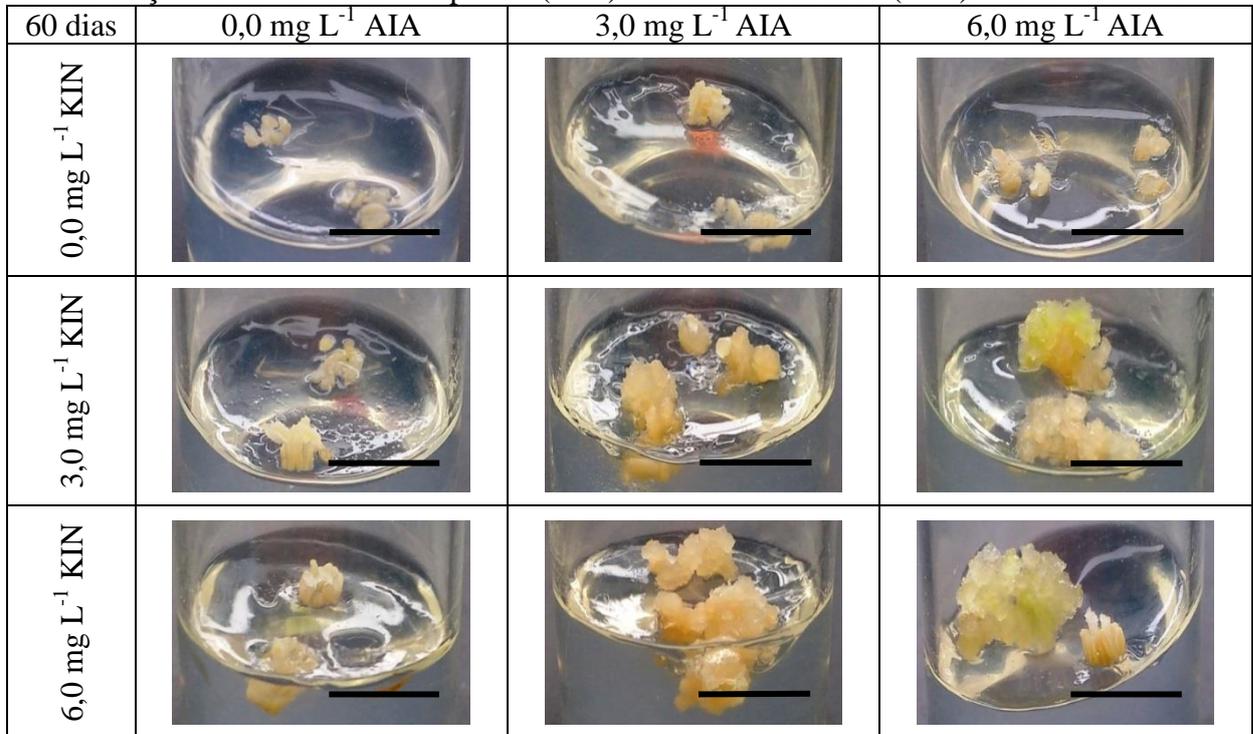


Figura 7- Aspecto dos explantes de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). Barra = 10mm.

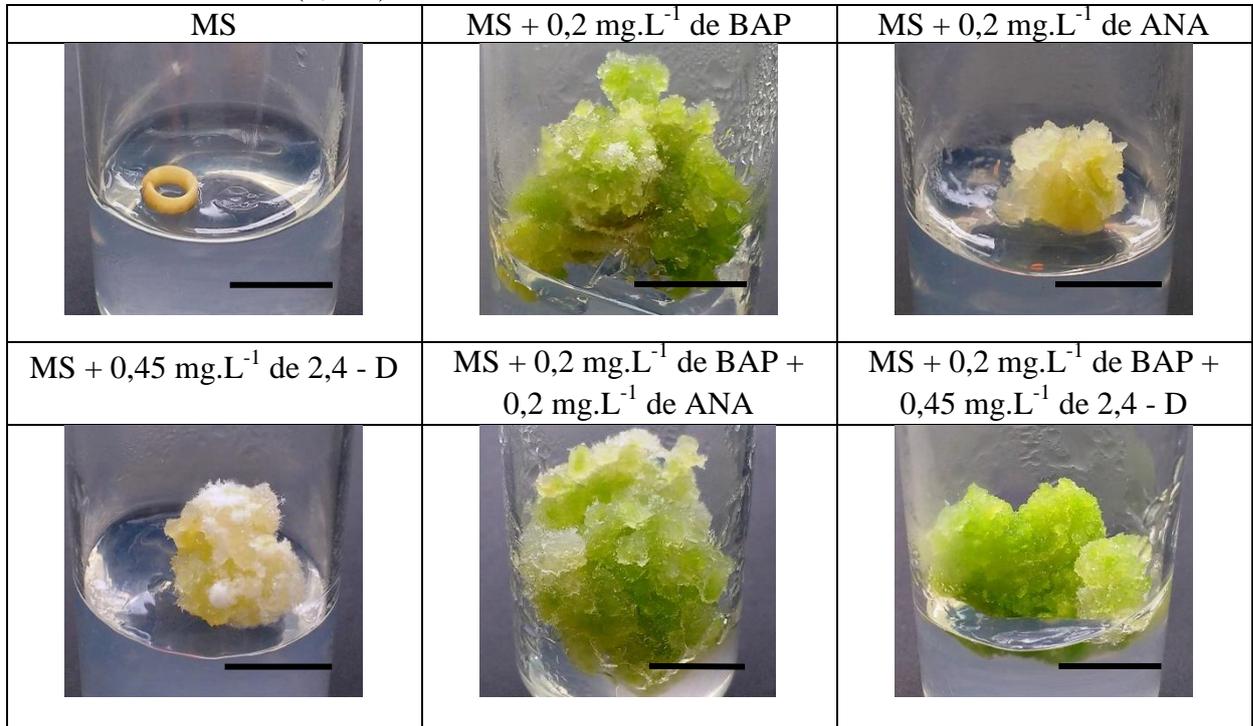
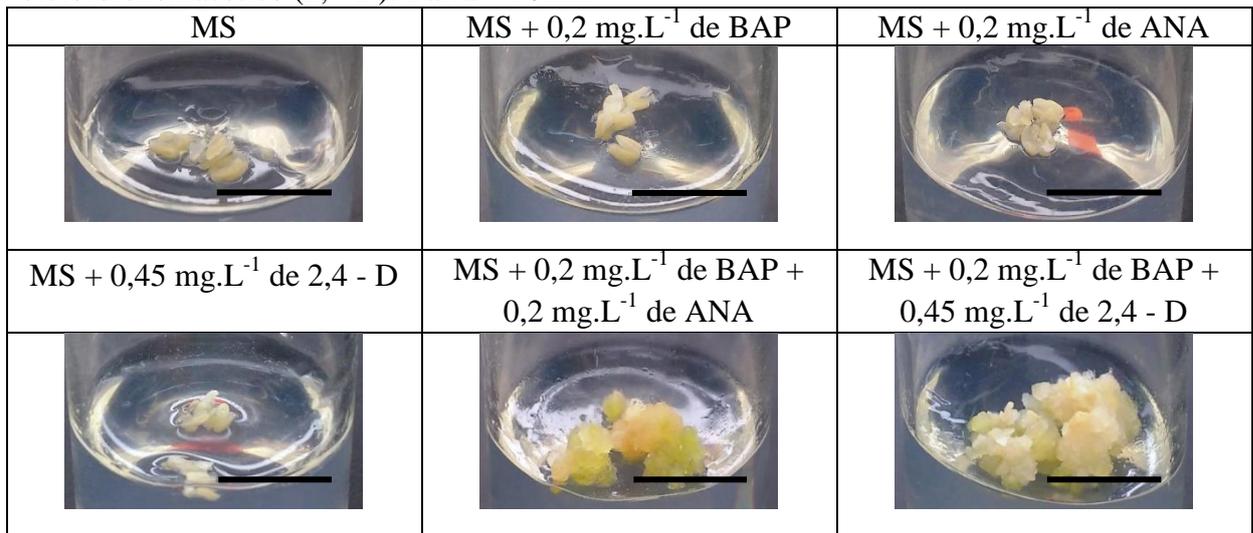


Figura 8- Aspecto dos explantes de gavinha de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 dias após a inoculação em meio MS contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). Barra = 10mm



4 CAPÍTULO 3 INDUÇÃO DE HAPLOIDES DE MELOEIRO POR MEIO DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS COM OUTRAS CUCURBITÁCEAS

RESUMO

Cruzamentos interespecíficos têm sido utilizados em diversas culturas de interesse econômico como uma alternativa viável à obtenção de haploides. No entanto, em meloeiro, nenhum trabalho com essa finalidade envolve o cruzamento entre gêneros da família cucurbitácea. Diante disso, objetivou-se com esse trabalho investigar o potencial de dez espécies de cucurbitáceas como doadoras de pólen em cruzamentos interespecíficos e intergenéricos com três variedades botânicas de melão, visando a produção de haploides para sua integração no programa de melhoramento da cultura. Os cruzamentos foram divididos em dois experimentos. No experimento I, foram semeadas duas variedades botânicas de melão: *inodorus* e *reticulatus*, e, como doadoras de pólen, cinco espécies pertencentes a família cucurbitácea: pepino (*Cucumis sativus*), maxixe (Do Norte e Paulista/Liso) (*Cucumis anguria*), abóbora (*Cucúrbita moschata*), melancia (*Citrullus lanatus*) e moranga (*Cucúrbita máxima*). Considerando os resultados obtidos, para o experimento II duas alterações foram realizadas: foi incluída a variedade botânica *cantalupensis* e foi adicionada a polinização com mistura de pólen. Como doadoras de pólen, foram testadas as cucurbitáceas: bucha (*Luffa aegyptiaca*), cabaça (*Lagenaria siceraria*), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*). Para todas as cucurbitáceas estudadas, foram realizadas a morfometria dos grãos de pólen e do aparelho reprodutor feminino. Não houve formação de embriões haploides em nenhuma das 448 flores polinizadas por meio de cruzamentos no experimento I. Já no experimento II, 23 embriões foram resgatados, por possuírem características típicas de haploide. Foram observadas diferenças entre a morfologia dos grãos de pólen, bem como dos pistilos. Abobrinha e melão-de-são-caetano são capazes de formar frutos partenocárpicos em meloeiro; a formação de frutos a partir da mistura de pólen foi possível em todas as espécies testadas, sendo a eficiência variável entre as variedades de melão testadas; e apenas nos cruzamentos com abobrinha foram produzidas sementes com características típicas de haploide.

Palavras-chave: Polinização. Resgate de embriões. Morfometria.

ABSTRACT

Interspecific crosses have been used in several crops of economic interest as a viable alternative to obtaining haploids. However, in melon, no work with this purpose involves the cross between genders of the cucurbit family. The objective of this work was to investigate the potential of ten species of cucurbits as pollen donors in interspecific and intergeneric crosses with three botanical varieties of melon, aiming at the production of haploids for their integration into the crop breeding program. The crosses were divided into two experiments. In the experiment I, two botanical varieties of melon: inodorus and reticulatus and, as pollen donors, five cucurbitaceous cucumber species (*Cucumis sativus*), maxixe (Do Norte and Paulista / Liso) (*Cucumis anguria* L.), pumpkin (*Cucurbita moschata*), watermelon (*Citrullus lanatus*) and moraine (maximum *Cucurbita*). Considering the results obtained, for the experiment II two alterations were made: the botanical variety was included cantalupensis and the pollination with pollen mixture was added. As pollen donors, the cucurbitaceae (*Luffa aegyptiaca*), gourd (*Lagenaria siceraria*), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*), melon-de-caetano (*Momordica charantia*) and zucchini (*Cucurbita pepo*) were tested. For all cucurbits studied, morphometry of the pollen grains and the female reproductive tract were performed. No haploid embryos were formed in any of the 448 pollinated flowers by means of crosses in Experiment I. In Experiment II, 23 embryos were rescued because they had typical haploid characteristics. Differences were observed between the morphology of the pollen grains as well as the pistils. Zucchini and melon-de-são-caetano are capable of forming parthenocarpic fruits in melon; the formation of fruits from the pollen mixture was possible in all tested species, with variable efficiency among the melon varieties being tested; and only in crosses with zucchini seeds were produced with characteristics typical of haploid.

Key words: Pollination. Embryo rescue. Morphometry.

INTRODUÇÃO

A família Cucurbitaceae inclui diversas hortaliças, como pepino (*Cucumis sativus* L.), melão (*Cucumis melo* L.), abóbora (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.), moranga (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*), bucha (*Luffa aegyptiaca*), cabaça (*Lagenaria siceraria*), maxixe (*Cucumis anguria*), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*) e outras espécies, cultivadas ao redor do mundo, pelas mais diferentes etnias (DONG *et al.*, 2016). Dentre essas, *Cucumis melo* L., destaca-se como uma das principais cucurbitáceas economicamente cultivadas no Brasil e no mundo (VALADARES *et al.*, 2017).

Nos programas de melhoramento, a obtenção de linhas homozigotas, para posterior transferência dos genes de interesse, é uma etapa que pode durar mais de 10 anos, devido aos sucessivos ciclos de autofecundação e seleção, e não resulta em indivíduos 100% homozigotos (BAKTEMUR; TAŞKIN; BÜYÜKALACA, 2013). Uma alternativa para contornar esse entrave é a obtenção de di-haploides, que consiste na indução do desenvolvimento de haploides (monoploides) seguida da duplicação dos cromossomos desses indivíduos haploides (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008).

Dentre as técnicas utilizadas para obtenção de haploides, a eliminação somática de cromossomos por meio de cruzamentos intergenéricos, seguida do resgate dos embriões, embora muito eficiente para algumas espécies, nunca foi estudada em meloeiro (ISHII *et al.*, 2010; TAYENG; CHAUDHARY; KISHORE, 2012; PRATAP; CHAUDHARY, 2012; CHAUDHARY *et al.*, 2013; GUPTA, *et al.*, 2016). Existem relatos sobre a obtenção de haploides por meio de cruzamentos entre membros da família cucurbitácea, como no gênero *cucurbita*, e em melão, quando submetido ao cruzamento interespecífico com uma espécie selvagem tetraploide (*Cucumis ficifolius*), porém em uma taxa inferior a 0,3% (HAYASE, 1954; DUMAS DE VAULX, 1979). Além disso, experimentos visando a obtenção de híbridos interespecíficos foram conduzidos entre *C. melo* e *C. sagittatus*, *C. metuliferus*, *C. sativus* e *C. prophetarum* (CHEN; ADELBERG, 2000). Vale salientar que não há registro na literatura de cruzamentos intergenéricos visando à obtenção de haploides em meloeiro.

Diante disso, objetivou-se com esse trabalho investigar o potencial de dez espécies de cucurbitáceas como doadoras de pólen em cruzamentos interespecíficos e intergenéricos com três variedades botânicas de meloeiro, visando a produção de haploides para sua integração no programa de melhoramento da cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas, como doadoras de pólen, dez espécies da família Cucurbitaceae, sendo metade analisadas no segundo semestre de 2017 (Experimento I), e a outra metade no primeiro semestre de 2018 (Experimento II), ambos em casa de vegetação de 8 m x 20 m, com revestimento de filme plástico, equipada com um sistema de arrefecimento composto por exaustor e colmeia, localizada na Embrapa Agroindústria Tropical, unidade sede em Fortaleza-CE (Figuras 1 e 2).

Figura 9- Croqui do Experimento I na casa de vegetação, no segundo semestre de 2017.

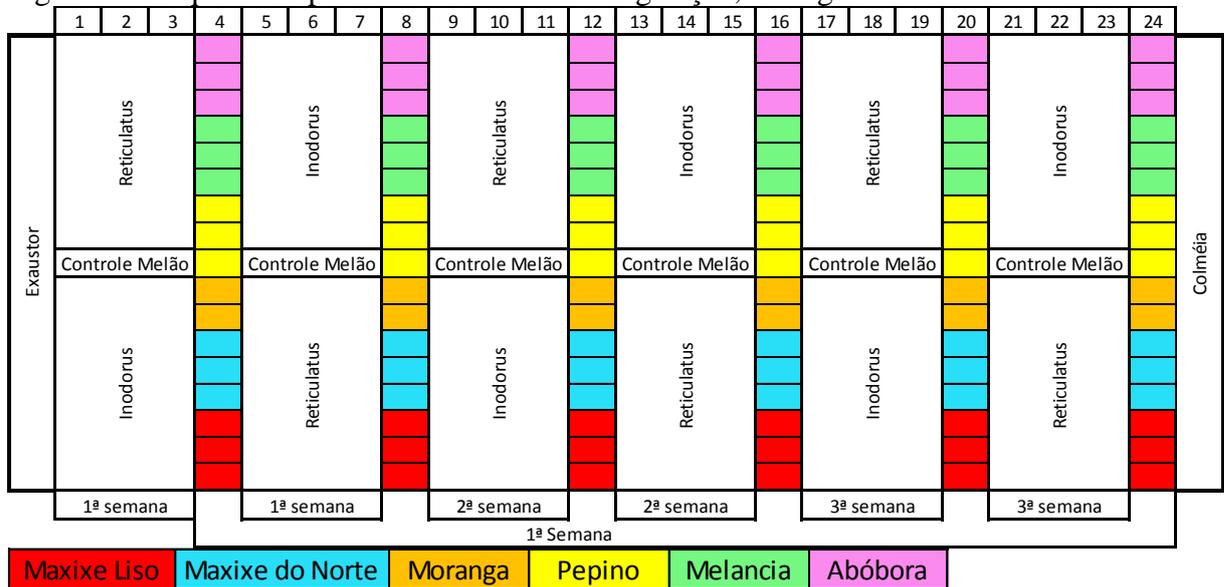
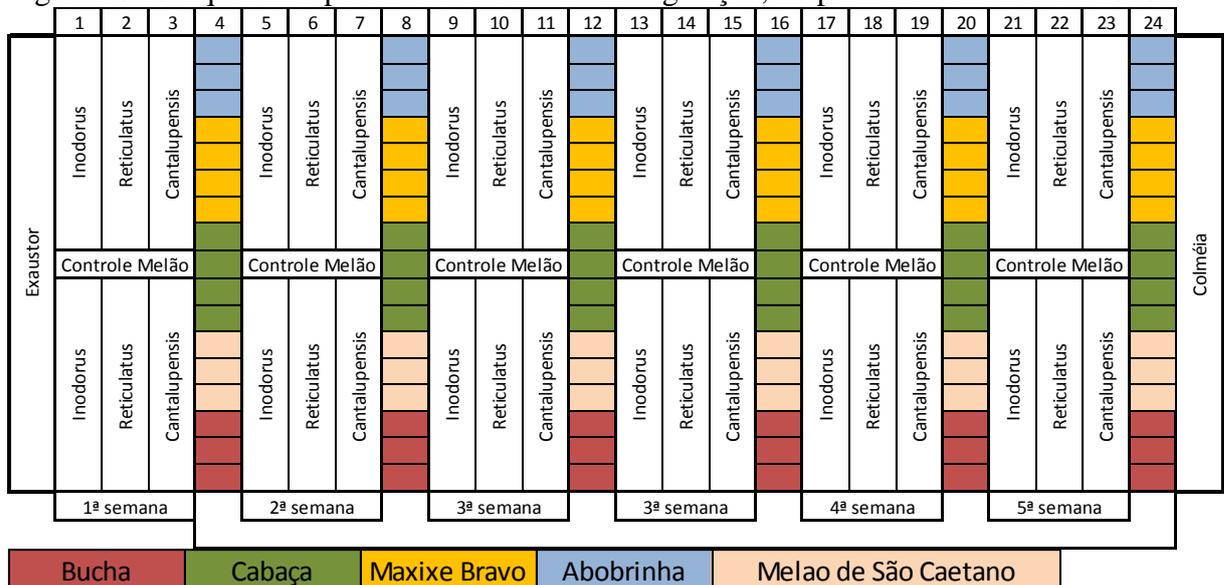
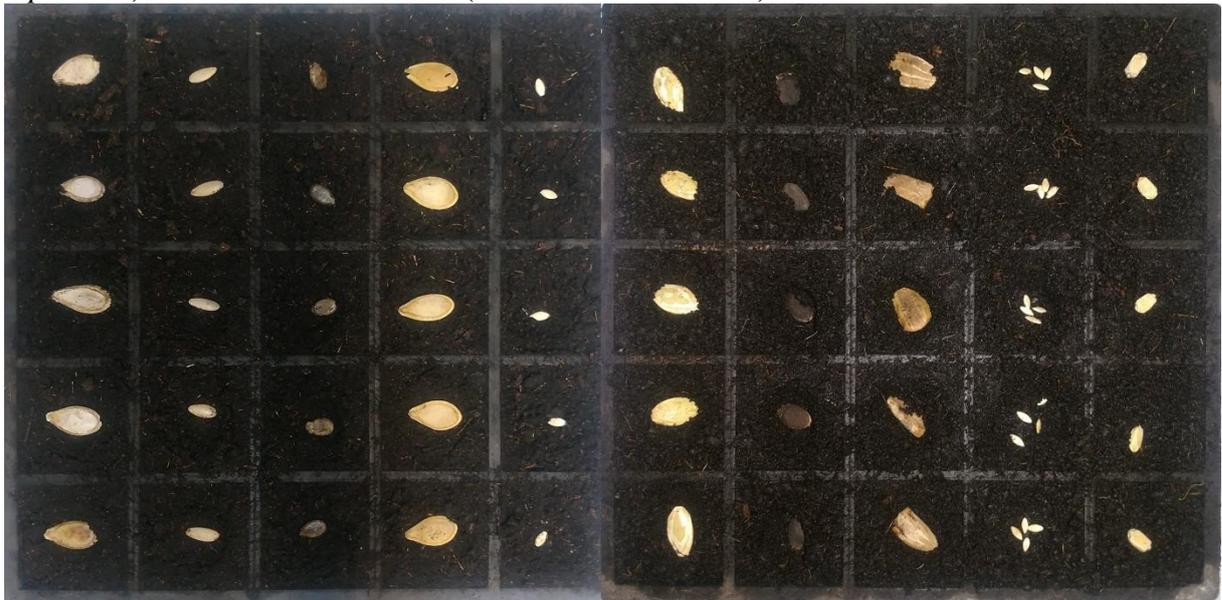


Figura 10- Croqui do Experimento II na casa de vegetação, no primeiro semestre de 2018.



As sementes germinaram em bandejas contendo 200 células de polietileno com comprimento de 547 mm, largura de 287 mm, altura de 50 mm e volume de 12,5mL por célula, preenchidas com uma mistura de 1:1 de volume de pó de fibra de coco e turfa comercial (Figura 3). Passados dez dias do semeio, as mudas foram transplantadas para vasos de polietileno de 5 litros preenchidos com areia. A semeadura do melão foi escalonada, estendendo o período de floração da cultura. Foram realizadas capinas entre e dentro dos vasos, sempre que necessário. As plantas foram fertirrigadas diariamente, sendo fornecida a quantidade de água e nutrientes adequados para cada fase de desenvolvimento da cultura.

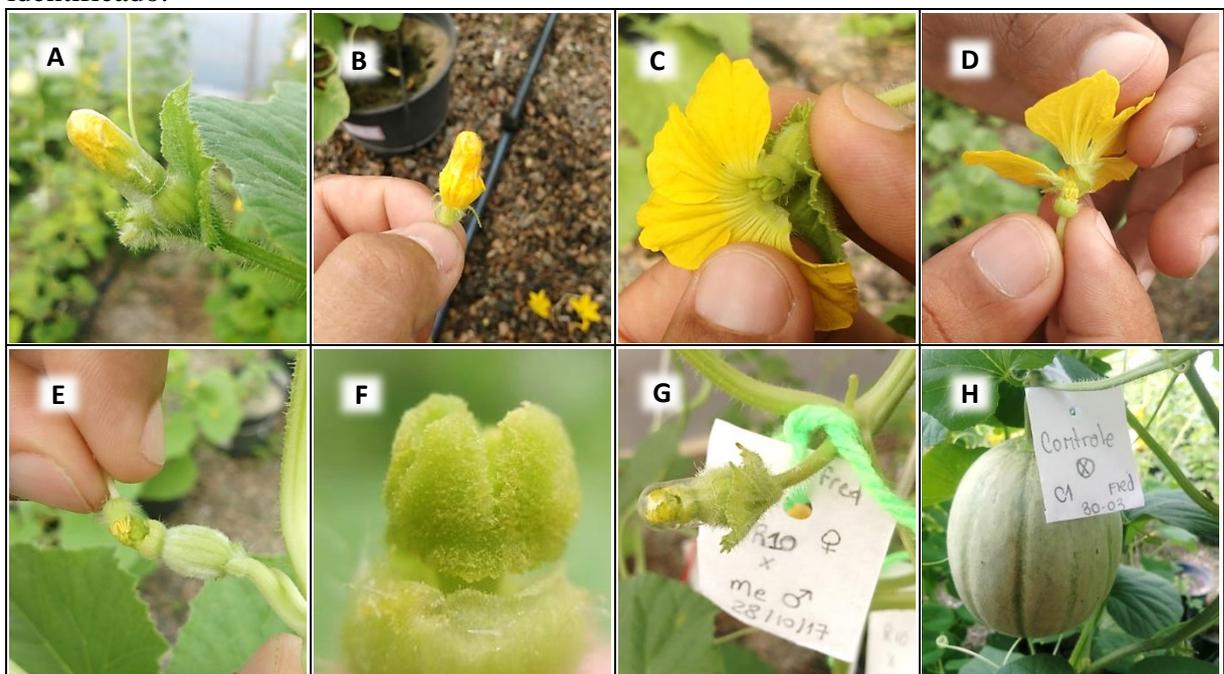
Figura 11- Aspecto das sementes de 10 espécies da família cucurbitácea em células de polietileno contendo substrato para germinação. Da esquerda para a direita, em coluna: moranga (*Cucurbita máxima*), pepino (*Cucumis sativus*), melancia (*Citrullus lanatus*), abóbora (*Cucurbita moschata*), maxixe do Norte (*Cucumis anguria*), abobrinha (*Cucurbita pepo*), bucha (*Luffa aegyptiaca*), cabaça (*Lagenaria siceraria*), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*) e melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*).



No primeiro experimento, foram semeadas duas variedades botânicas de meloeiro: *inodorus* e *reticulatus*, e, como doadoras de pólen, cinco espécies pertencentes a família cucurbitácea: pepino (*Cucumis sativus*), maxixe (Do Norte e Paulista/Liso) (*Cucumis anguria* L.), abóbora (*Cucurbita moschata*), melancia (*Citrullus lanatus*) e moranga (*Cucurbita máxima*). No período de floração, ao final da tarde, as flores com ovário, em pré-antese, eram protegidas usando cápsulas de gelatina. Para as flores hermafroditas, visando evitar a autofecundação, foi realizada, com auxílio de pinça, a emasculação. Nas demais cucurbitáceas, foram realizadas proteções nas flores masculinas, também em pré-antese.

Todos os dias, nas primeiras horas da manhã, estigmas dos meloeiros eram polinizados com o pólen de uma das cinco cucurbitáceas, ambas previamente protegidas (Figura 4). Apenas uma espécie doadora era utilizada em cada planta de meloeiro. Para evitar a competição pelos fotoassimilados, não foram realizadas polinizações nas plantas que possuíssem três flores polinizadas e não abortadas.

Figura 12- Etapas da hibridização artificial de meloeiro: A - flor feminina protegida; B - flor masculina protegida com cápsula de gelatina; C - retirada das pétalas da flor feminina; D - retirada das pétalas da flor masculina; E - polinização artificial; F - estigma polinizado; G - flor polinizada, protegida com cápsula de gelatina, e identificada; e, H - fruto obtido e identificado.

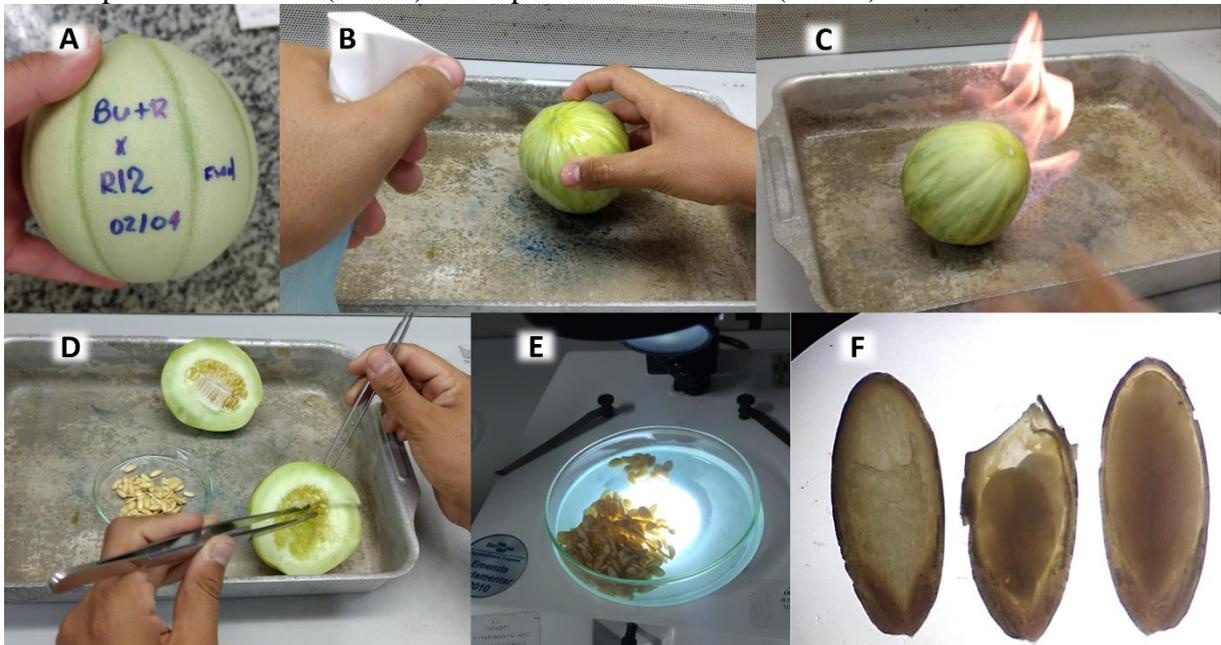


Considerando os resultados obtidos ao final desse ciclo de cruzamentos (Experimento I), duas alterações foram realizadas na implantação do experimento II: foi incluída a variedade botânica *cantalupensis* e uma nova forma de polinização foi adicionada (Experimento II). Além do pólen da cucurbitácea doadora, a flor do meloeiro também foi polinizada com um pouco de pólen da própria planta receptora, com o intuito de estimular a formação dos frutos. Como doadoras de pólen, foram testadas as cucurbitáceas: bucha (*Luffa aegyptiaca*), cabaça (*Lagenaria siceraria*), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*). A mistura dos pólenes era realizada, polinizando-se uma flor de meloeiro com pólen da própria planta, juntamente com pólen de uma das cucurbitáceas, que contribuía com a maior parte do pólen recebido pelo estigma. Para evitar competição por fotoassimilados, as misturas de pólen só aconteciam em

plantas que abortavam, pelo menos três flores previamente polinizadas com pólen de cucurbitácea, sem mistura.

Os frutos gerados foram colhidos entre 21 e 24 dias após a polinização. Procedeu-se lavagem com água corrente e sabão neutro, e secagem, para retirar resíduos sólidos na superfície do fruto. Em seguida, foram levados para capela de fluxo laminar, colocados em bandejas de alumínio e desinfestados em álcool etílico 96% pelo método *dry burning* (DAL; SARI; SOLMAZ, 2016). Com o auxílio de uma faca, realizou-se um corte longitudinal, sendo as sementes extraídas e colocadas em placa de Petri. Com o auxílio de microscópio estereoscópico e luz fluorescente, as sementes foram examinadas, e as que continham embriões menos desenvolvidos foram transferidas para outra placa de Petri, para remoção do tegumento (Figura 5). Os embriões resgatados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Todos os instrumentos usados na capela foram previamente esterilizados.

Figura 13- A - Fruto identificado; B - pulverização com álcool etílico 96%; C – método *dry burning*; D – extração de sementes em frutos cortados longitudinalmente; E – avaliação de embriões em microscópio estereoscópico; F - semente sem embrião (esquerda), com embrião e endosperma reduzidos (centro) e completamente formada (direita).



Como controle, em ambos os experimentos, todas as cucurbitáceas foram autofecundadas, incluindo as variedades botânicas de melão. Assim como nos cruzamentos, as flores eram protegidas no dia anterior à polinização; polinizadas nas primeiras horas da

manhã, do dia seguinte; e novamente protegidas, para evitar contaminação com pólen de outras culturas.

Com o intuito de compreender a morfologia das estruturas reprodutoras das espécies estudadas, procedeu-se a coleta, nas primeiras horas da manhã, de flores masculinas em antese, seguido da deposição dos grãos de pólen diretamente nas lâminas, para visualização em microscópio de luz. Usando o software Olympus Cell[^]B[®], foram realizadas medições equatoriais e polares de 40 grãos de pólen de cada espécie. Para as estruturas reprodutivas femininas, foram efetuadas coletas de flores femininas e hermafroditas, em antese. Cada flor foi seccionada longitudinalmente, de modo a evidenciar estigma, estilete e ovário. Com o auxílio de um paquímetro digital, as estruturas foram mensuradas em uma das secções de, pelo menos, 35 flores de cada espécie.

Em ambos os experimentos, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado. Todas as cucurbitáceas, incluindo as variedades botânicas de melão, foram autofecundadas, como controle experimental.

No experimento I, os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2 x 6), sendo duas variedades botânicas de melão e cinco espécies de cucurbitáceas. Utilizou-se quatro parcelas, de cinco plantas cada, onde eram realizadas, pelo menos, quatro polinizações em flores distintas. Para o experimento II, usou-se esquema fatorial (3 x 5), entre três variedades botânicas de melão e cinco espécies de cucurbitáceas. Cada tratamento era composto de quatro parcelas de cinco plantas. Para o experimento II, os cruzamentos com mistura de pólen só ocorriam quando as plantas já tinham, pelo menos, três flores polinizadas apenas com o pólen da doadora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

Não houve formação de embriões haploides em nenhuma das 448 flores polinizadas por meio de cruzamento interespecífico (Tabela 1). No entanto, os cruzamentos controle foram capazes de gerar frutos com sementes, assegurando a viabilidade do pólen (Figuras 6 e 7). Do mesmo modo, os frutos gerados nas duas variedades botânicas de meloeiro testadas certificam a viabilidade dos óvulos, bem como a receptividade dos estigmas. Era esperado que pelo menos umas das culturas testadas como doadoras de pólen fosse capaz de estimular a produção de frutos contendo sementes haploides, visto que para outras culturas, como o trigo, a frequência de formação de embriões haploides via eliminação somática de cromossomos alcança valores acima de 20% (GUPTA, *et al.*, 2016).

Tabela 10- Cruzamentos interespecíficos realizados entre duas variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus* e var *reticulatus*) e seis cucurbitáceas, como doadoras de pólen.

Receptor	Cruzamentos ¹		Nº de flores		Nº de frutos desenvolvidos
	Doador		Polinizada	Fertilizada	
<i>inodorus</i>	Maxixe Liso (<i>Cucumis anguria</i>)		36	0	0
	Maxixe do Norte (<i>Cucumis anguria</i>)		26	0	0
	Moranga (<i>Cucurbita máxima</i>)		30	0	0
	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)		39	0	0
	Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>)		45	0	0
	Abóbora (<i>Cucurbita moschata</i>)		43	0	0
<i>reticulatus</i>	Maxixe Liso (<i>Cucumis anguria</i>)		37	0	0
	Maxixe do Norte (<i>Cucumis anguria</i>)		39	0	0
	Moranga (<i>Cucurbita máxima</i>)		33	0	0
	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)		43	0	0
	Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>)		45	0	0
	Abóbora (<i>Cucurbita moschata</i>)		32	0	0
	Total		448	-	-

¹/Foram obtidos frutos a partir das autofecundações realizadas visando o controle experimental.

Figura 14- Estruturas reprodutivas de cinco espécies de cucurbitáceas. Antera, estigma e estigma polinizado de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (A, B e C), abobrinha (*Cucurbita pepo*) (D, E e F), cabaça (*Lagenaria siceraria*) (G, H e I), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*) (J, K e L) e antera e estigma polinizado de bucha (*Luffa aegyptiaca*) (M e N).

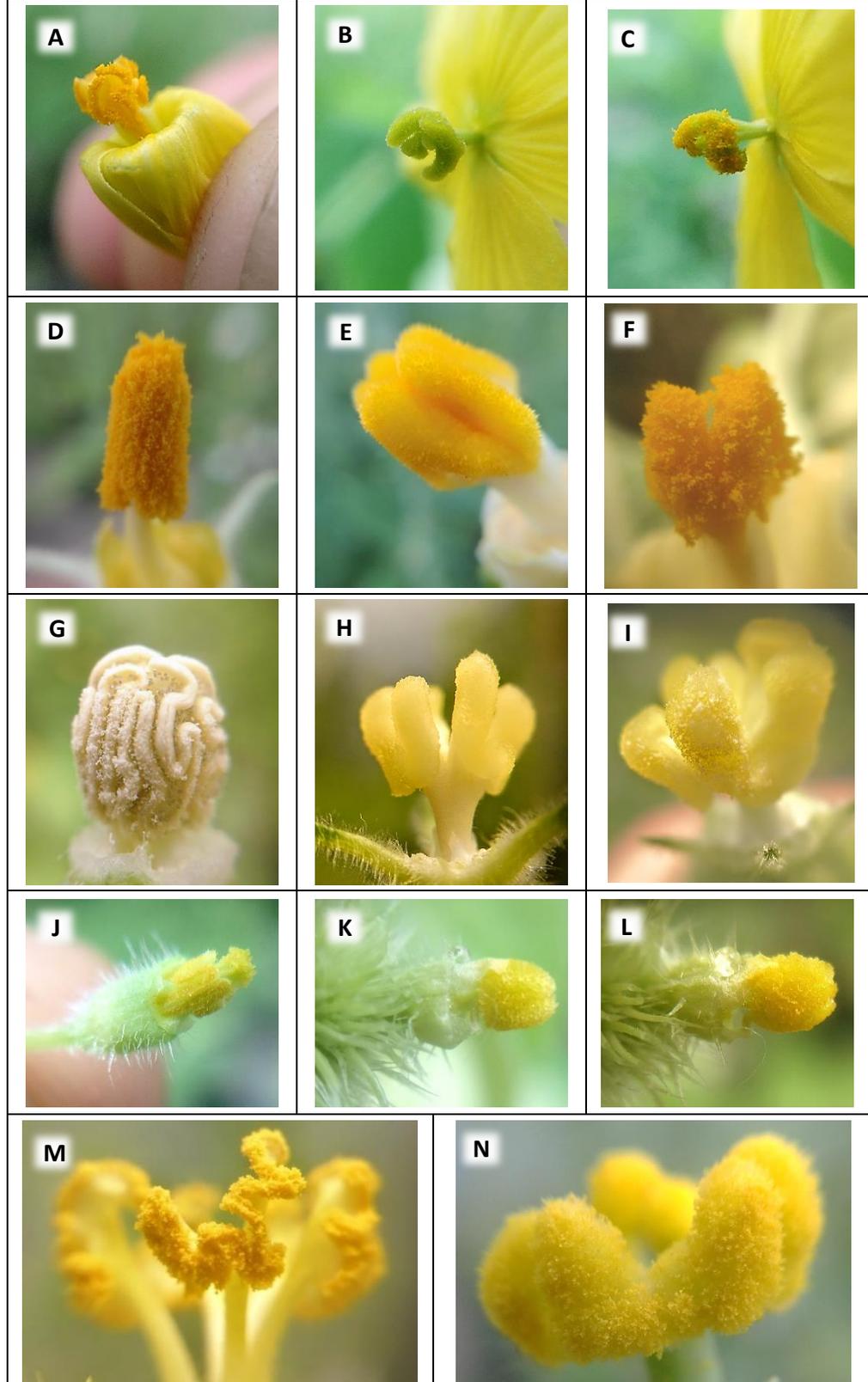
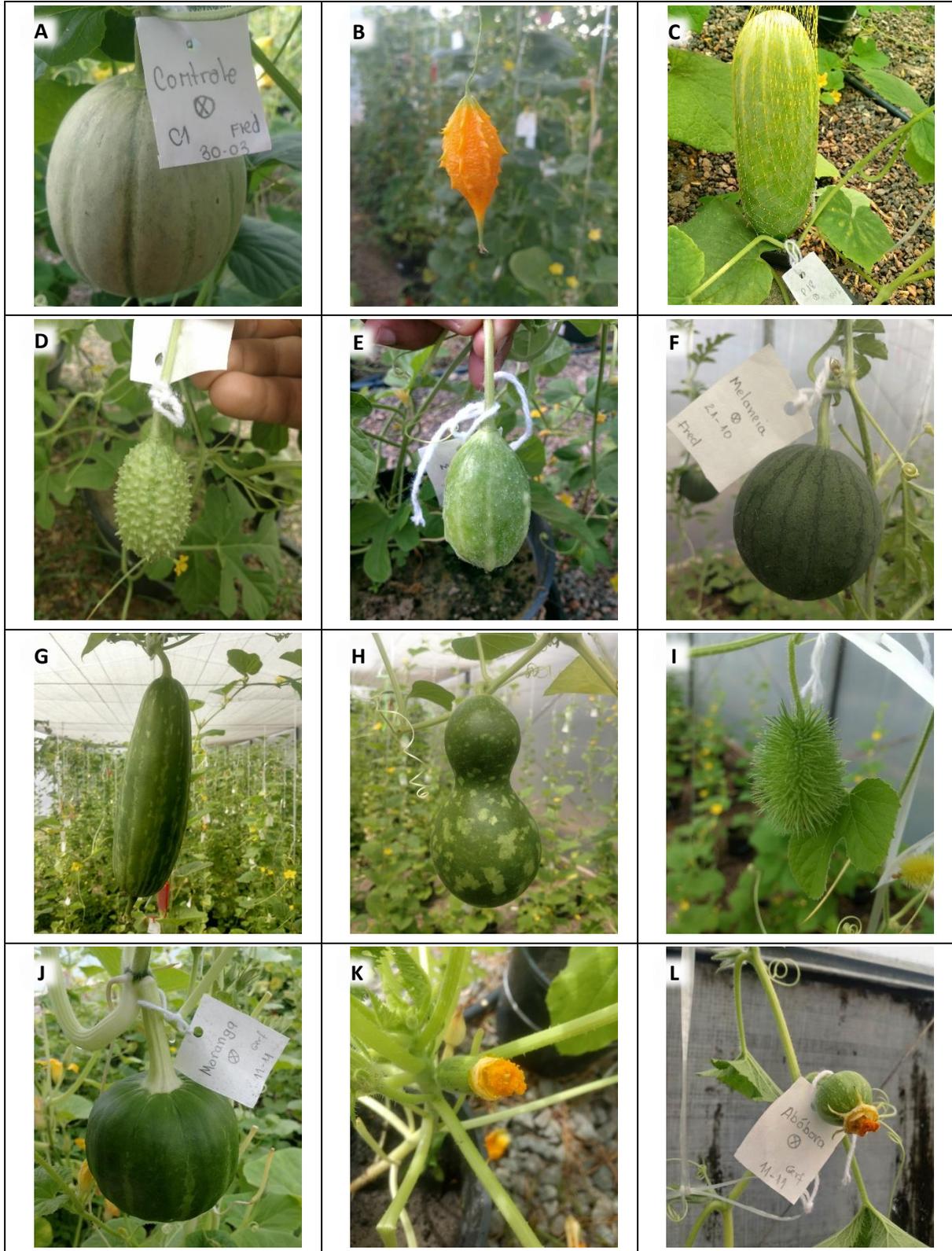


Figura 15- Frutos controles das espécies testadas em ambos os experimentos: melão (A), melão-de-são-caetano (B), pepino (C), maxixe do norte (D), maxixe liso (E), melancia (F), bucha (G), cabaça (H), maxixe bravo (I), moranga (J), abobrinha* (K), abóbora* (L). *Os experimentos foram encerrados antes do desenvolvimento completo dos frutos de abóbora e abobrinha.



Trabalhos similares de cruzamento interespecífico, utilizando o milho como doador de pólen, mostraram resultados satisfatórios para produção de embriões haploides em centeio (*Secale cereale*), cevada (*Hordeum vulgare*) e aveia (*Avena sativa*). Por sofrerem degeneração do endosperma, é necessário proceder o resgate dos embriões e seu posterior cultivo *in vitro* (WEDZONY *et al.*, 2009).

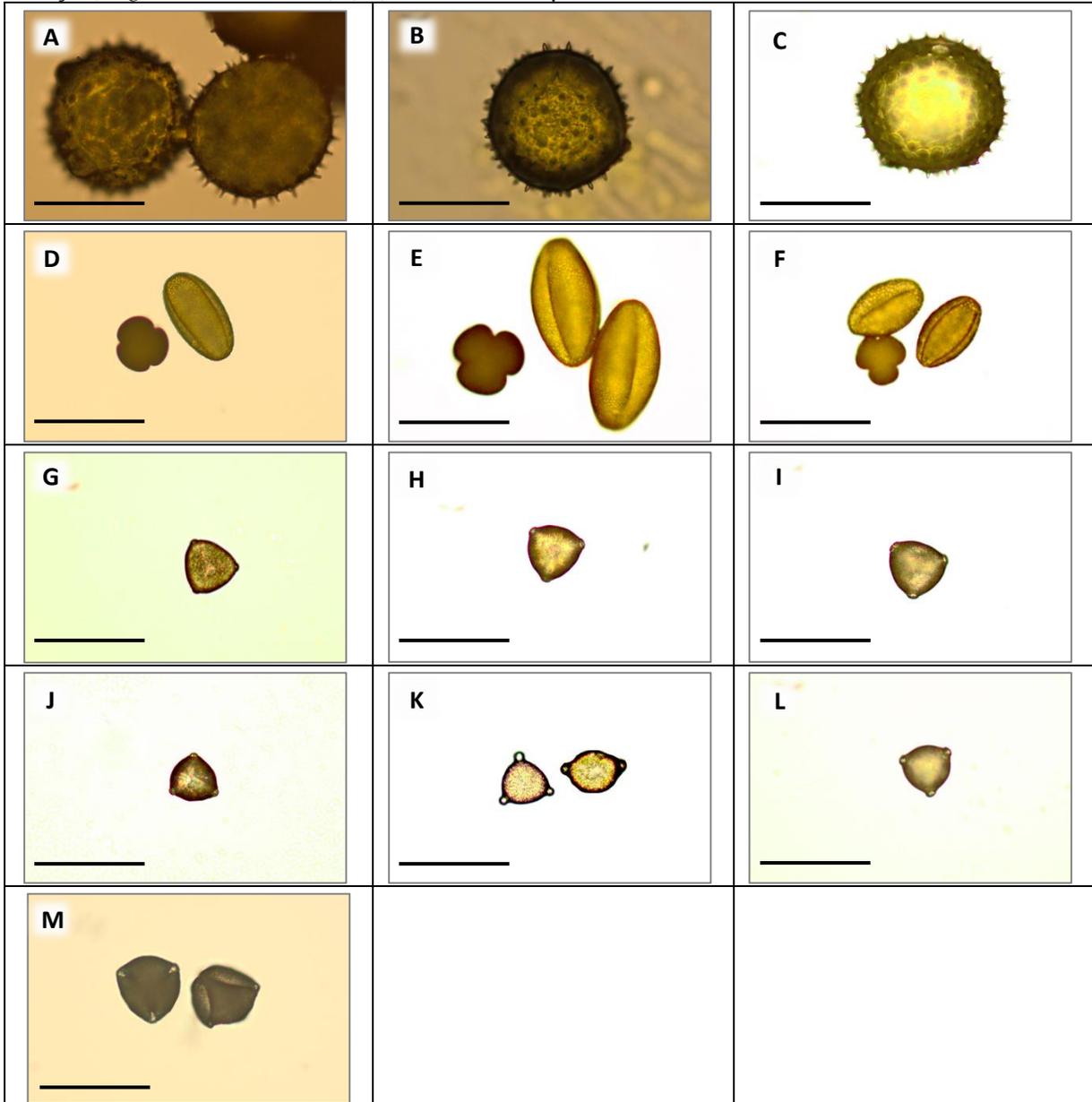
Diversos fatores podem ter influenciado, isolada ou conjuntamente, para o insucesso na produção das sementes haploides, como a incompatibilidade cromossômica e os diferentes níveis de ploidia das espécies avaliadas (ABDOLLAHI *et al.*, 2016; LI, Z *et al.*, 2018; BISOGNIN, 2002; SANDLIN *et al.*, 2012; JAMWAL; SHARMA, 2017; PATEL *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016; MILC, *et al.*, 2016; SAXENA *et al.*, 2015) (Tabela 2).

Tabela 11- Número de cromossomos das 11 espécies de cucurbitáceas ($2n = 2x$) utilizadas nos dois experimentos de cruzamentos interespecíficos.

Experimento	Nome comum	Espécie	Número de Cromossomos
I	Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	14
	Maxixe do Norte	<i>Cucumis anguria</i>	24
	Moranga	<i>Cucurbita máxima</i>	40
	Abóbora	<i>Cucurbita moschata</i>	40
	Melancia	<i>Citrullus lanatus</i>	22
II	Bucha	<i>Luffa aegyptiaca</i>	26
	Cabaça	<i>Lagenaria siceraria</i>	22
	Maxixe Bravo	<i>Cucumis dipsaceus</i>	24
	Abobrinha	<i>Cucurbita pepo</i>	40
	Melão-de-são-caetano	<i>Momordica charantia</i>	22
I e II	Melão	<i>Cucumis melo</i>	24

A morfologia dos grãos de pólen das doadoras é outro fator que pode ter influenciado no resultado dos cruzamentos, haja vista a variedade de formas e tamanhos encontradas nessas estruturas reprodutivas (Figura 8) (Tabela 3). Algumas cucurbitáceas, como abóbora e moranga, apresentam grãos de pólen bem maiores que os encontrados no melão, o que resulta em menos grãos de pólen dessas doadoras na superfície do estigma, e essa desproporção de tamanho, e, conseqüentemente, de concentração, pode ter contribuído para a não formação do fruto.

Figura 16- Aspecto morfológico de grãos de pólen de 13 cucurbitáceas em aumento óptico de 200x: abobrinha (*Cucurbita pepo*) (A), moranga (*Cucurbita máxima*) (B), abóbora (*Cucurbita moschata*) (C), melã-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (D), bucha (*Luffa aegyptiaca*) (E), melancia (*Citrullus lanatus*) (F), melão (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) (G), melão (*Cucumis melo* var. *inodorus*) (H), melão (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) (I), maxixe do norte (*Cucumis anguria*) (J), pepino (*Cucumis sativus*) (K), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*) (L), cabaça (*Lagenaria siceraria*) (M). Barra = 100 μ m.



A morfometria do aparelho reprodutor feminino aponta, indiretamente, quais espécies possuem grãos de pólen capazes de alcançar o óvulo da espécie receptora, uma vez que o comprimento do pistilo indica o tamanho aproximado do tubo polínico da espécie. Todas as doadoras, com exceção da melancia, possuem tamanho de pistilo superior às três variedades botânicas do melão, indicando não ser esse um fator limitante para as culturas doadoras (Figura 9).

Figura 17- Secção longitudinal de flores femininas de 10 espécies de cucurbitáceas, coletadas em antese, evidenciando as estruturas reprodutivas (estigma, estilete e ovário): moranga (*Cucurbita máxima*) (A), melão (*Cucumis melo*) (B), abobrinha (*Cucurbita pepo*) (C), maxixe bravo (*Cucumis dipsaceus*) (D), maxixe do norte (*Cucumis anguria*) (E), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (F), melancia (*Citrullus lanatus*) (G), cabaça (*Lagenaria siceraria*) (H), pepino (*Cucumis sativus*) (I), bucha (*Luffa aegyptiaca*) (J). Barra = 1 cm.

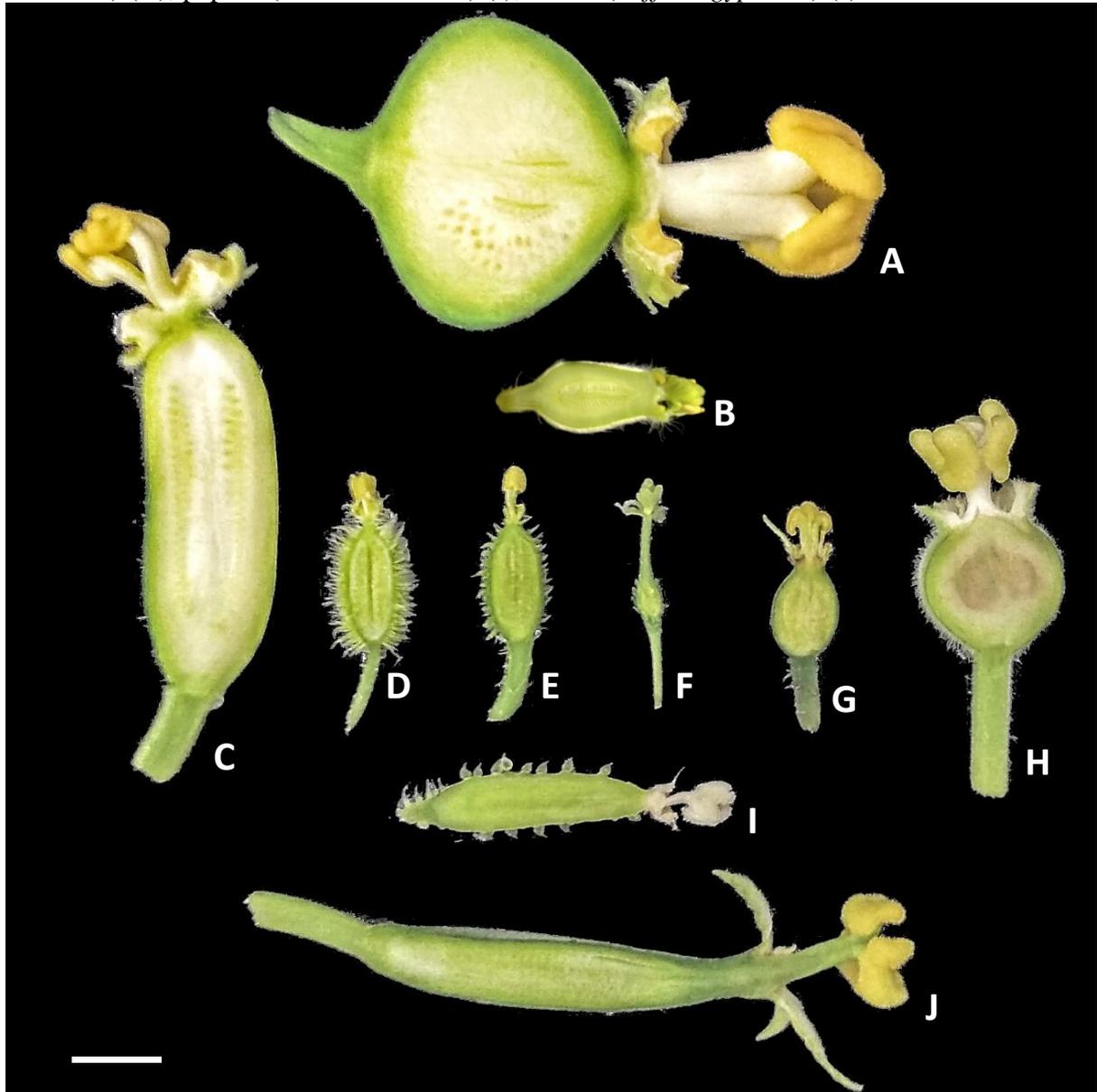


Tabela 12- Morfometria de grãos de pólen e aparelho reprodutor feminino de três variedades botânicas de melão e outras dez espécies de cucurbitáceas. Foram mensurados 40 grãos de pólen e 35 flores femininas de cada espécie.

Espécie	Grão de pólen		Estigma	Flor feminina		
	Equatorial	Polar		Estilete	Ovário	Pistilo ²
	-----Média (µm)-----			-----Média (mm)-----		
<i>var. cantalupensis</i> ¹	50,80	30,40	3,05	4,56	7,70	15,31
<i>var. inodorus</i>	50,10	31,10	2,72	3,76	7,45	13,93
<i>var. reticulatus</i>	49,80	31,20	3,38	4,78	6,72	14,88
Abóbrinha	136,90	134,70	8,39	13,62	34,84	56,85
Moranga	128,10	127,00	10,30	16,54	16,55	43,39
Abóbora	122,90	122,60	10,75	12,72	13,69	37,16
Bucha	60,00	110,50	5,90	22,03	46,95	74,88
Cabaça	59,10	49,60	4,56	7,12	18,22	29,90
Pepino	56,90	42,30	4,22	5,39	14,46	24,07
Melão-de-são-caetano	44,60	84,00	2,08	8,66	5,26	16,00
Maxixe bravo	44,10	29,10	2,63	3,43	9,63	15,69
Maxixe do Norte	43,00	27,80	3,13	4,44	8,58	16,15
Melancia	41,50	71,00	2,35	4,45	6,94	13,74

¹/Variedades botânicas de *Cucumis melo*. ²/Somatório das medidas do estigma, estilete e ovário.

Experimento II

Um total de 1081 flores foram polinizadas, sendo 725 flores polinizadas apenas com o pólen da doadora, e 356 flores polinizadas com mistura entre pólen da doadora e pólen da própria receptora (Tabela 4).

Tabela 13- Quantidade de frutos obtidos por cruzamentos realizados para cada cruzamento interespecífico, com mistura (cm) ou sem mistura (sm) de pólen da respectiva variedade botânica de meloeiro.

Cucurbitáceas ¹	Variedade botânica de <i>Cucumis melo</i>						Total
	<i>cantalupensis</i>		<i>inodorus</i>		<i>reticulatus</i>		
	cm	sm	cm	sm	cm	sm	
Abobrinha	4 / 13	0 / 44	3 / 21	2* / 42	9 / 35	1* / 57	19 / 212
Bucha	5 / 26	0 / 44	5 / 21	0 / 48	16 / 33	0 / 55	26 / 227
Cabaça	2 / 20	0 / 46	1 / 15	0 / 47	9 / 29	0 / 55	12 / 212
Maxixe bravo	7 / 12	0 / 46	8 / 23	0 / 49	17 / 33	0 / 55	32 / 218
Melão-de-são-caetano	3 / 23	0 / 40	9 / 30	1 / 48	11 / 22	0 / 49	24 / 212
Total	21/94	0/220	26/110	3/234	62/152	1/271	113/1081

¹/Foram obtidos frutos a partir das autofecundações realizadas visando o controle experimental. */Sementes contendo embriões com morfologia similar à embriões haploides foram obtidas, germinaram, sendo as plantas cultivadas em telado para confirmação do nível de ploidia.

O maior número de frutos foi obtido usando maxixe bravo como doador de pólen. No entanto, apenas abobrinha e melão-de-são-caetano promoveram a formação de fruto sem a mistura dos pólenes. Dois frutos produziram apenas sementes vazias (abobrinha (♂) x *inodorus* (♀) e melão-de-são-caetano (♂) x *inodorus* (♀)); um fruto produziu um embrião com aspecto haploide típico (abobrinha (♂) x *inodorus* (♀)); e o fruto oriundo do cruzamento entre abobrinha (♂) e *reticulatus* (♀) produziu 22 sementes potencialmente haploides. Além disto, parte das flores polinizadas com mistura de pólenes desenvolveu fruto. No entanto, poucas sementes apresentaram embrião com formato de coração, o que é esperado para um embrião haploide. Após a germinação dessas sementes, folhas jovens foram coletadas em tampão Otto II (OTTO, 1990) de cada uma das plântulas oriundas dos embriões resgatados, para posterior verificação do nível de ploidia. Haploides já foram obtidos em meloeiro, em porcentagem inferior a 0,3%, quando esse foi cruzado com *Cucumis ficifolius*, uma espécie selvagem tetraploide ($2n = 48$), que é tolerante a várias pragas do melão (DUMAS DE VAULX, 1979).

A formação dos frutos sem sementes sugere um crescimento partenocárpico, visto que a auxina foi produzida sem haver a fertilização dos óvulos. Em tomate, o cruzamento entre a espécie comercial, *Solanum lycopersicum*, e espécies selvagens, como *Solanum habrochaites* e *Solanum peruvianum*, produzem frutos partenocárpicos (GORGUET *et al.*, 2008). Semelhantemente ao ocorrido no experimento I, todos os controles formaram frutos com sementes viáveis (Figura 7).

Embora todas as espécies testadas tenham desenvolvido frutos, quando adotada a polinização com mistura de pólen, a eficiência na produção desses frutos variou entre as variedades botânicas, sendo a *reticulatus* a mais eficiente, com 41,1% de frutos formados por flores polinizadas, contra 22,3% e 23,6% das variedades *cantalupensis* e *reticulatus*, respectivamente.

CONCLUSÃO

Abobrinha e melão-de-são-caetano são capazes de formar frutos partenocárpicos em meloeiro;

A formação de frutos a partir da mistura de pólen foi possível em todas as variedades botânicas testadas, sendo a eficiência variável entre essas variedades e as doadoras de pólen.

Apenas nos cruzamentos com abobrinha (*Cucurbita pepo*) foram produzidos embriões com características típicas de haploide.

5 CONCLUSÃO GERAL

Gavinhas e anteras mostraram-se adequados para o estabelecimento *in vitro* da cultura, respondendo de forma satisfatória à desinfestação mais rápida e menos concentrada. Esses explantes produziram calos morfológicamente distintos, respondendo de forma específica para as diferentes concentrações de auxina e citocininas testadas.

Dentre as dez espécies utilizadas como doadoras de pólen, abobrinha e melão-de-são-caetano promoveram a formação de frutos partenocárpicos em meloeiro. Apenas abobrinha foi capaz de estimular a produção de frutos de meloeiro contendo embriões com características típicas de haploide.

Estudos complementares deverão ser realizados com o intuito de obter meloeiros haploides, haja vista que os tratamentos alternativos analisados mostraram potencial para gerar esses monoploides.

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**, [s.l.] v. 40, p. 571-579, 2016.
- ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. New York: John Willey, 1996. 485p.
- ALVES, S. A. O. *et al.* *In vitro* embryo rescue of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 1-6, 2011.
- ARUNYANART, S.; CHAITRAYAGUN, M. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 105, n. 3, p. 411-420, 2005.
- ASHOK KUMAR H. G.; MURTHY H. N.; PAEK K. Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 98, p. 213-222, 2003.
- BAKTEMUR, G.; TAŞKIN, H.; BÜYÜKALACA, S. Comparison of Different Methods for Separation of Haploid Embryo Induced through Irradiated Pollen and Their Economic Analysis in Melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*). **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2013, Article ID 529502, 7 p., 2013.
- BAKTEMUR, G.; YÜCEL, N. K.; TAŞKIN, H.; ÇÖMLEKÇİOĞLU, S.; BÜYÜKALACA, S. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash. **Turkish Journal of Biology**, [s.l.], v. 38, p. 318-327. <https://doi.org/10.3906/biy-1309-5>, 2014.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.
- BISOGNIN, D. A. Origin and evolution of cultivated cucurbits. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 715-723, 2002.
- BOX, G. E. P.; COX, D. R. "An Analysis of Transformations". **Journal of the Royal Statistical Society**, [s.l.], ser. B, v. 26, p. 211-252, 1964.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio. Exportação brasileira de melões frescos. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 15 Outubro de 2018.
- BUGGS, R. J. A.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. Biosystematic relationships and the formation of polyploids. **Taxon**, [s.l.], v. 60, p. 324-332, 2011.
- BURK L. G.; GERSTEL D.U.; WERNSMAN E.A. Maternal haploids of *Nicotiana tabacum* L. from seed. **Science**, [s.l.], v. 206, p.585, 1979.

CHAUDHARY H. K.; TAYENG T.; KAILA V.; RATHER S. A. Use of asynchrony in flowering for easy and economical polyhaploid induction in wheat following *Imperata cylindrica* - mediated chromosome elimination approach. **Plant Breeding**, [s.l.] .doi:10.1111/pbr. 12036, 2013.

CHEN D.; ZHAO J. Free IAA in stigmas and styles during pollen germination and pollen tube growth of *Nicotiana tabacum*. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 134, n. 1, p. 202-215, 2008.

CHEN, J. F.; ADELBERG, J. Interspecific hybridization in *Cucumis* – progress, problems, and perspectives. **HortScience**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 11- 15, 2000.

CHOI, Y.; SHIN, J. S.; CHUNG, Y. S.; HYUNG, N. An efficient selection and regeneration protocol for Agrobacterium-mediated transformation of oriental melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa*). **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, [s.l.], v. 110, p. 133-140, 2012.

CID, L. P. B; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B (ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 51-66, 2010.

CORDEIRO, I. M. C. C. *et al.* Indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 35-40, 2007.

COSTA, N. D. (ed.). **Sistema de produção de melão**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 5). Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=4103&p_r_p_-996514994_topicoId=4241

CUNY. F.; GROTTTE, M.; DUMAS DE VAULX, R.; RIEU, A. Effects of gamma irradiation of pollen on parthenogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 301-312, 1993.

DAL BOSCO C.; DOVZHENKO A.; PALME K. Intracellular auxin transport in pollen. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 11, p. 1504-1505, 2012.

DAL, B.; SARI, N.; SOLMAZ, I. Effect of different irradiation sources and doses on haploid embryo induction in Altinbas (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) melons. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, [s.l.], v. 40, p. 552-559, 2016.

DEVAUX P.; PICKERING R.A. Haploids in the improvement of Poaceae. In: Palmer D, Keller W, Kasha KJ (eds) **Haploids in crop improvement II**. Springer, Heidelberg, Germany, p. 215–242, 2005.

DIAO, W. P.; JIA, Y. Y.; SONG, H.; ZHANG, X. Q.; LOU, Q. F.; CHEN, J. F. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 119, p. 246-251, 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**, [s.l.], v. 35, n. 10, p. 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 Cucurbitaceae family. **C R Academie Bulgare Des Sciences**, [s.l.], v. 38, n. 9, p. 1243, 1985.
- DRYANOVSKA, O.A.; ILEVA, I.N. *In vitro* anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **C R Academie Bulgare Des Sciences**, [s.l.], v.36, n. 8, p. 1107-1110, 1983.
- PELIZZA, T. R.; SILVEIRA, F. N.; MUNIZ, J.; GRIMALDI, F.; RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A. A. Estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro: cultivares bluecrop, duke e misty. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.9, n. 1-2, p. 24-29, 2013.
- PINHO, D. A.; REY, M. S.; VIEIRA, A.; DANIELOWSKIL, T.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Regeneração *in vitro* de melão, cv. ‘Gaúcho’. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 40, n. 5, p. 1083-1089, 2010.
- DUMAS DE VAULX, R. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) apres pollinisation par *Cucumis ficifolius* A. Rich. **Comptes Rendus de l’Académie des Sciences – Series III-Vie**, v. 289, p. 875-878, 1979.
- EZURA, H.; AMAGAI, H.; YOSHIOKA, K.; OOSAWA, K. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Science**, [s.l.], v. 85, p. 209-213, 1992.
- FACHINELLO, J. C. *et al.* **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: EMBRAPA informações tecnológica, 2005, 221 p.
- FAO. Faostat – **Statistics Database**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#home> > Acesso em 10 de novembro de 2018.
- FAOSTAT – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS. 2017. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 15 Outubro de 2018.
- FEHR, W.R. **Principles of Cultivar Development - Theory and Technique**. New York: Macmillan Publishing Co, v.1, p. 536, 1987.
- FERRIE, A. M. R.; PALMER, C. E.; KELLER, W. A. Haploid embryogenesis. In: THORPE, T.A., ed. ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 20, p. 309–344, 1995.
- FICCADENTI, N.; ROTINO, G. L. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. **Plan Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 40, p. 293-295, 1995.

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**, [s.l.], v. 53, p.255–257, 1999.

FOISSET, N.; DELOURME, R.; LUCAS, M.O.; RENARD, M. *In vitro* androgenesis and segregation distortion in *Brassica napus* L.: Spontaneous versus colchicine-doubled lines. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v.16, p.464–468, 1997.

FORKET, D. E.; KIEBER, J.; HILL, C. C. Citocininas: Reguladores da Divisão celular. In TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 619-646.

FORSBERG, R. A.; SMITH, R. R. Sources, maintenance, and utilization of parental material. In: FEHR, W. R.; Hadley, H. H. Hybridization of Crop Plants. **American Society of Agronomy: Crop Science Society of America**, [s.l.], p.65-81, 1980.

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**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 81–92, 2015.

GARCÍA-ALMODÓVAR, R. C.; GOSALVEZ, B.; ARANDA, M. A.; BURGOS, L. Production of transgenic diploid *Cucumis melo* plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 130, p. 323-333, 2017.

GERMANA M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], n. 104, p. 3, p. 283–300, 2011.

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

GORGUET, B.; EGGINK, P. M.; OCAÑA, J.; TIWARI, A.; SCHIPPER, D.; FINKERS, R.; VISSER, R. G. F.; VAN HEUSDEN, A. W. Mapping and characterization of novel parthenocarpy QTLs in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 116, n. 6, p. 755–767, Apr. 2008.

GUIS, M.; BEN, A. M.; LATCHE, A.; PECH, J. C.; ROUSTAN, P. A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) leading to a majority of diploid regenerants. **Science Horticultureae**, [s.l.], v. 84, p. 91–99, 2000.

GUIS, M.; ROUSTAN, J.P.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; PECH, J. *C. melon* biotechnology. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, [s.l.], v. 15, p. 289-311. 1998.

GUO, B. *et al.* Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984-9000, 2011.

GUPTA, V.; COUNCIL, I.; KUMAR, S.; COUNCIL, I. Induction of haploids in wheat using Wheat x Maize system of chromosome elimination. **Journal of Wheat Research**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 43-48, 2016.

GUPTA, V.; KUMAR, S.; SINGROHA, G.; MISHRA, C. N.; KUMAR, R.; TIWARI, V. Induction of haploids in wheat using Wheat x Maize system of chromosome elimination. **Journal of Wheat Research**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 43-48, 2016.

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**, [s.l.], v. 5, n. 10, p. 1089-1095, 2013.

HAYASE, H. Occurrence of a haploid twin pair from a F1 progeny of *C. maxima* x *C. moschata*. **Japanese Journal Breeding**, [s.l.], v. 4, p. 55, 1954.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2017. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 15 Outubro de 2018. in cucurbit species. **Plant Cell Report**, [s.l.], v. 35, p. 1991-2019, 2016.

INOUE E.; SAKUMA F.; KASUMI M.; HARA H.; TSUKIHASHI T. Maternal haploidization of Japanese pear through intergeneric hybridization with apple. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 663, p. 815–818, 2004.

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

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 341-345, 2005.

ISHII T.; UEDA T.; TANAKA H.; TSUJIMOTO H. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. **Chromosome Research**, [s.l.], v. 18, n. 821–831, 2010.

JAMWAL, M.; SHARMA, N. Cytological details of *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem. a meiotically disturbed diploid. **Nucleus** 60: 37. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0186-z>, 2017.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v.47, n. 3, p. 91-110, 2005.

KATHAL, R.; BHATNAGAR, S. P.; BHOJWANI, S. S. Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa sharbati. **Plant Science**, [s.l.], v. 96, p. 137-142, 1994.

KINTZIOS, S.; STAVROPOULOU, E. R.; SKAMNELI, S. Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). **Plant Science**, [s.l.], v. 167, p. 655-664, 2004.

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

KOŠMRLJ, K.; KASTELEC, D.; BOHANEC, B. Styrian oil pumpkin pollen germinability at higher irradiation doses: Optimization of the *in vitro* germination protocol and irradiation procedure. **Turkish Journal of Biology**, [s.l.], v. 38, n. 4, p. 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**, [s.l.], v. 9, p. 1779–1789, 2015.

KYNAST R. G.; DAVIS D. W.; PHILLIPS R. L.; RINES H. W. Gamete formation via meiotic nuclear restitution generates fertile amphiploid F₁ (oat × maize) plants. **Sex Plant Reprod.** doi:10.1007/s00497-012-0182-7, 2012.

LI, K.; WANG, H.; WANG, J.; SUN, J.; LI, Z.; HAN, Y. Divergence between *C. melo* and African *Cucumis* Species Identified by Chromosome Painting and rDNA Distribution Pattern. **Cytogenet Genome Res**, [s.l.], v. 150, p. 150-155, 2016.

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**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 164-168, 2013.

LI, Z., BI, Y.; WANG, X.; WANG, Y.; YANG, S.; ZHANG, Z.; CHEN, J.; LOU, Q. Chromosome identification in *Cucumis anguria* revealed by cross-species single-copy gene FISH. **Genome**, [s.l.], v. 61, n. 6, p. 397-404, 2018.

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**, [s.l.], v. 21, p. 1121–1128, 2003.

MAINE M.J. Potato haploid technologies. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants: a manual. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 241–247, 2003.

MAJURE L. C.; PUENTE R.; GRIFFITH M. P.; JUDD W. S.; SOLTIS P.; SOLTIS D. E. Phylogeny of *Opuntia* s.s. (Cactaceae): Clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. **American Journal of Botany**, [s.l.], v. 99, p. 847–864, 2012.

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**, [s.l.], v. 38, n. 1, p. 27–34, 2011.

McCREIGHT, J. D.; NERSON, H.; GRUMET, R. Melon, *Cucumis melo* L. In: KALLOS, G.; BERGH, B.O. (eds) **Genetic improvement of vegetable crops**. Pergamon Press, New York, 1993.

MELARA, M. V.; ARIAS, A. M. G. Effect of bap and IAA on shoot regeneration in cotyledonary explants of Costarican melon genotypes. **Agronomía Costarricense**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 125-131, 2009.

MENEZES, J. B.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MAIA, C. E.; ANDRADE, G.G.; ALMEIDA, J.H.S.; VIANA, F.M.P. Características do melão para exportação. In: ALVES, R.E. (Org.). **Melão: pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA/SPI, p.13-22. (Frutas do Brasil, 10), 2000.

MILC, J.; CAFFAGNI, A.; RONGA, D.; FRANCIÀ, E.; PASQUARIELLO, M.; LAVIANO, L.; MAZZAMURRO, V.; PECCHIONI, N. Evaluation of *Cucurbita pepo* germplasm for staminate flower production and adaptation to the frozen food industry. **Cientia Horticulturae**, [s.l.], v.213, p. 321-330, 2016.

MINISTÉRIO DE DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO - MDIC. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior Via Internet do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior- AliceWeb. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em 8 de julho de 2018

MOLINA, R. V.; NUEZ, F. Correlated response of *in vitro* regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 15, p. 129-132, 1995.

MRÁZ P.; ŠINGLIAROVÁ B.; URFUS T.; KRAHULEC F. CYTOGEOGRAPHY of *Pilosella officinarum* (Compositae): altitudinal and longitudinal differences in ploidy level distribution in the Czech Republic and Slovakia and the general pattern in Europe. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 101, p. 59-71, 2008.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 15, p. 473-497, 1962.

MUROVEC, J.; BOHANEK, B. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding, Plant Breeding, Dr. Ibrokhim Abdurakhmonov (Ed.), ISBN: 978-953-307-932-5, **InTech**, DOI: 10.5772/29982. 2012.

NADERI, D.; ASKARI-KHORASGANI, O.; MAHMOUDI, E. Cefotaxime and benzyladenine improve melon regeneration. **Iranian Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 56-60, 2016.

NADERI, D.; MOUSAVI, A.; HABASHI, A. A.; LOFTI, AM. Optimization of somatic embryogenesis induction in Iranian melon (*Cucumis melo* cv. Khatooni). **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 34, p. 6434-6438, 2011.

NUNES, G. H. S.; ARAGÃO, F. A. S.; NUNES, E. W. L. P.; COSTA, J. M.; RICARTE, A. O. Melhoramento de Melão. In: GOMES, C. N.; OLIVEIRA, A. B. (Org.). **Melhoramento de Hortaliças**. 1ed Viçosa, MG: Editora UFV, [s.l.], v. 1, p. 331-363, 2016.

- NUNEZ-PALENIUS, H. G.; GOMEZ-LIM, M.; OCHOA-ALEJO, N. Melon Fruits: Genetic Diversity, Physiology, and Biotechnology Features. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 13-55, 2008.
- OKURA E. A haploid plant in *Portulacea grandiflora* Hook. **The Japanese Journal of Genetics**, [s.l.], v. 8, p. 251–260, 1933.
- OLIVEIRA, F. I. C. *et al.* A cultura do melão. In: FIGUEIRÊDO, M. C. B. de; GONDIM, R. S.; ARAGÃO, F. A. S. (Org.). **Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, v. 1, p. 17-32, 2017.
- OTTO F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman H, Darzynkiewicz Z, editors. *Methods in cell biology*. New York, NY: **Academic Press**, p. 105–110, 1990.
- OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 401-437, 2000.
- PAN, X., CHEN, J. and YANG, Z. Auxin regulation of cell polarity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 28, p. 144-153, 2015.
- PATEL, A. N.; PARMAR, V. K.; NAYAK, S. R.; PATEL, N. M. Influence of pinching and plant growth regulators on morphological and sex expression of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* L.) **International Journal of Chemical Studies**; [s.l.], v. 5, n. 4, p. 2035-2038, 2017.
- PELIZZA, T. R.; SILVEIRA, F. N.; MUNIZ, J.; GRIMALDI, F.; RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A. A. Estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro: cultivares Bluecrop, PEREIRA, J.E.S.; CITADIN, I.; PETERS, J.A. Efeito de diferentes meios de cultura na regeneração *In vitro* do meloeiro (*Cucumis melo* L.) ‘Gaúcho’ e ‘Hales Best Imperial’. **Ciência & Agrotecnologia**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 540-546, 1999.
- PERAITA, V. A. Sistemas de alto rendimiento en la regeneración *in vitro* de melón y pepino. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 52p. (**Tese mestrado**). 2016.
- PINHAL, H. F. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- PITRAT M. Melon. In: PROHENS J.; NUEZ F. (eds.) **Handbook of plant breeding. Vegetables I**. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopoidicaceae, and Cucurbitaceae, Springer, USA, p. 283–315, 2008.
- PITRAT, M. Phenotypic diversity in wild and cultivated melons (*Cucumis melo*). **Plant Biotechnology**, [s.l.], v. 30, p. 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.). **Acta Horticulturae**, v. 510, p. 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**, v. 9, n. 3, p. 261-269, 2014.

PRATAP A.; CHAUDHARY H.K. Effect of auxins on induction of polyhaploids in triticale and triticale × wheat hybrids through the chromosome elimination technique. **Indian Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 82, p. 66-70, 2012.

PRUDENTE de O. D. *et al.* Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.13-19, 2016.

RAJI, M. R.; LOTFI, M.; TOHIDFAR, M.; ZAHEDI, B.; CARRA, A.; ABBATE, L. CARIMI, F. Somatic embryogenesis of muskmelon (*Cucumis melo* L.) and genetic stability assessment of regenerants using flow cytometry and ISSR markers. **Protoplasma**. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1194-9>.

REN, Y.; BANG, H.; CURTIS, I. S.; GOULD, J.; PATIL, B. S.; CROSBY, K. M. Agrobacterium-mediated transformation and shoot regeneration in elite breeding lines of western shipper cantaloupe and honeydew melons (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, [s.l.], v. 108, p. 147-158, 2012.

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**, [s.l.], v. 49, p. 223–229, 2013.

RHIMI, A.; FADHEL, N. B.; BOUSSAID. M. Plant regeneration via somatic embryogenesis from *in vitro* tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 84, p. 239–243, 2006.

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

SANDLIN, K.; PROTHRO, J.; HEESACKER, A.; KHALILIAN, N.; OKASHAH, R.; XIANG, W.; BACHLAVA, E.; CALDWELL, D. G.; TAYLOR, C. A.; SEYMOUR, D. K.; WHITE, V.; CHAN, E.; TOLLA, G.; WHITE, C.; SAFRAN, D.; GRAHAM, E.; KNAPP, S.; MCGREGOR, C. Comparative mapping in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai]. **Theoretical and applied genetics**, [s.l.], v. 125, n. 8, p. 1603-1618, 2012.

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

SAXENA, S.; SINGH, A.; ARCHAK, S.; BEHERA, T. K.; JOHN, J. K.; MESHARAM, S. U.; Gaikwad, A. B. Development of Novel Simple Sequence Repeat Markers in Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.) Through Enriched Genomic Libraries and Their Utilization in Analysis of Genetic Diversity and Cross-Species Transferability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 175, n. 1, p. 93–118, 2015.

- 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 and Organ Culture**, [s.l.], v. 124, n. 1, p. 69–79, 2016.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Genome Research**, [s.l.], v. 120, n. 3, p. 358-369, 2008.
- SILVA, A. L. L. *et al.* 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**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 117-126, 2012.
- SILVA, A. L. L. *et al.* Organogênese direta de explantes cotiledonares e regeneração de plantas de mogango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 992-995, 2006.
- SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos, JUNGHANS, T. G., SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 11-37, 2006.
- SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 38-52, 2006.
- STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20st and 21st centuries. **Taxon**, [s.l.], v. 49, p. 451-476, 2000.
- 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.
- 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.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2013.
- TAYENG, T.; CHAUDHARY, H. K.; KISHORE, N. Enhancing doubled haploid production efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) by *in vivo* colchicine manipulations in Imperata cylindrical - mediated chromosome elimination approach. **Plant Breeding**. doi:10.1111/j.1439-0523.2012.01986.x, 2012.
- 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.

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

VALADARES, R. N.; MELO, R. A.; SILVA, J. A. S.; ARAÚJO, A. L. R.; SILVA, F. S.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; MENEZES, D. Estimativas de parâmetros genéticos e correlações em acessos de melão do grupo momordica. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 35, p. 557-563, 2017. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620170413>

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

WEDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ZUR, I.; GOLEMIEC, E.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; DUBAS, E.; GOTEŹBIEWSKA, G. *et al.* Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: TOURAEV, A.; JAIN, M.; FORSTER, B. (eds) *Advances in haploid technology in higher plants*. **Spring Science + Business Media B. V.**, USA, p 133, 2009.

WERNER, E. T. *et al.* Controle da calogênese de pau brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

WU, J. Z. *et al.* IAA stimulates pollen tube growth and mediated the modification of its wall composition and structure in *Torenia fournieri*. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 59, n. 9, p. 2529-2543, 2008.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: princípios e técnicas**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2009. 272 p.

YALÇIN MENDİ, Y.; ELDOĞAN, S.; GUTAKEV, R.; İPEK, M.; ÇÜRÜK1, P.; ÇETİNER, S. Regeneration and histological analysis of snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus* (L.) Naudin) by direct organogenesis. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, [s.l.], n. 34, p. 309-371, 2010.

ZAMBIAZZI, E. V. *et al.* Avaliação dos parâmetros de crescimento e desenvolvimento em melões submetidos à enxertia. **Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 137-143, 2012.

ZHANG, H.; GAO, P.; WANG, X.; LUAN, F. An improved method of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of melon (*Cucumis melo* L.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 278-283, 2014.