



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

KARLA NASCIMENTO DE SOUZA

**HAPLOIDIZAÇÃO EM MELOEIRO POR MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* DE
ANTERAS E MICRÓSPOROS E DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS**

FORTALEZA

2024

KARLA NASCIMENTO DE SOUZA

HAPLOIDIZAÇÃO EM MELOEIRO POR MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS
E MICRÓSPOROS E DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia / Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão

Coorientadora: Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S238h Souza, Karla Nascimento de.
Haploidização em meloeiro por meio de cultivo in vitro de anteras e micrósporos e de cruzamentos interespecíficos / Karla Nascimento de Souza. – 2024.
79 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão.
Coorientação: Profa. Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.
1. Cucumis melo. 2. Cucurbitáceas. 3. Androgênese. 4. Cruzamentos interespecíficos. 5. Haploide. I.
Título.

CDD 630

KARLA NASCIMENTO DE SOUZA

HAPLOIDIZAÇÃO EM MELOEIRO POR MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS
E MICRÓSPOROS E DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia / Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovado em: 16/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão (Orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)

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

Dra. Gabrielen de Maria Gomes Dias
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Elaine Facco Celin
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

Dra. Arlene Santisteban Campos
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)

Ao meu irmão, Milton Santos da Silva Júnior
(*in memoriam*), e à minha amiga e companheira
nessa grande aventura que foi o doutorado,
Luma Rayane de Lima Nunes (*in memoriam*).

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, que nunca me desamparou e me deu forças para enfrentar todos os obstáculos dessa trajetória. À Nossa Senhora de Aparecida e ao Santo Antônio por toda a proteção.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia (PPGAF), pela oportunidade de cursar o doutorado.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por toda a estrutura e apoio para a execução desse trabalho.

À minha mãe, Regia Maria Ferreira do Nascimento, obrigada por sempre acreditar e investir em mim, por todo amor e cuidado.

À minha irmã, Kátia Nascimento de Souza, por todo amor, apoio e incentivo.

Ao meu companheiro, Rodolfo de Oliveira Alves, por todas as vezes que foi regar as plantas dos experimentos comigo. Obrigada por sempre me apoiar e incentivar, por todo amor e dedicação.

Ao meu orientador, Dr. Fernando Aragão, pela oportunidade, orientação e confiança. Por todas as vezes que me acolheu e compreendeu quando passei por momentos difíceis, obrigada pelas conversas e conselhos.

A Dra. Ana Cristina, por todos os ensinamentos, pela paciência e confiança. Foi muito gratificante trabalhar com a senhora.

Ao Dr. Frederico Inácio, pelas diversas vezes que me ajudou, esclarecendo minhas dúvidas.

Aos membros da banca, Dra. Ana Cristina, Dra. Gabrielen, Dra. Arlene, Dra. Elaine e Dr. Fernando, obrigada pela participação, correções e por todas as contribuições.

Aos amigos que muito ajudaram nos experimentos, Claudio, Jordana, Lorena, Juliana e Davi. Obrigada por todas as risadas, e pelo companheirismo até nas reclamações. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês.

Aos meus companheiros do Laboratório de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais, Luma (*in memoriam*), Elaine, Fred, Ariana, Renata, Roberta, Gefferson, Rafael, Claudio, Luiz, Ítalo, Matheus, Arthur, Marcelo, Nicole e Vitor.

Aos meus bons e velhos amigos, Camila, Raissa, Lucas, Thycyanne e Bruna, obrigada por todos os ótimos momentos e as muitas risadas ao longo desses anos.

Aos funcionários da Embrapa Agroindústria Tropical, que por muitas vezes me ajudaram a resolver contratempos e problemas nos laboratórios e nos telados.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muitíssimo obrigada.

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

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

Em cucurbitáceas várias técnicas são utilizadas para obtenção de plantas haploides. Na cultura do melão (*Cucumis melo* L), a técnica mais utilizada é a partenogênese induzida por polinização com pólen irradiado, com raios X e, sobretudo, gama. Porém, esta é uma técnica pouco acessível para os programas de melhoramento genético de meloeiro, pois necessita de equipamentos de custo elevado e utiliza fontes de radiação consideradas nocivas aos organismos vivos. Apesar de ser a técnica mais bem-sucedida, o percentual de plantas haploides obtidas ainda é baixo. Portanto, é importante desenvolver ou otimizar protocolos alternativos ao uso da radiação para obtenção de planta de meloeiro haploides, ampliando assim o acesso ao uso de dihaploides para obtenção de linhagens parentais em homozigose. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi otimizar protocolos para obtenção de plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos e de cruzamentos interespecíficos. Para tanto, foram conduzidos experimentos na casa de vegetação do laboratório de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais e no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, ambos localizados na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. No capítulo I, foram avaliados os efeitos de diferentes pré-tratamentos térmicos e meios de cultivo na calogênese de anteras e micrósporos de meloeiro. Para isto, foram realizados três experimentos, utilizando quatro genótipos, dois da variedade botânica *reticulatus* e dois da *inodorus*. No cultivo *in vitro* de micrósporos, não ocorreu a formação de calos em nenhum dos tratamentos utilizados. No cultivo *in vitro* de anteras, observou-se que o meio utilizado para indução de calos foi eficiente em todos os tratamentos com exceção pré-tratamento térmico calor antes de inocular. Os genótipos *reticulatus* apresentaram médias superiores ao *inodorus* em todas as variáveis. Para *reticulatus*, em ambos os experimentos, o pré-tratamento frio após a inoculação *in vitro* das anteras, foi eficiente. Os genótipos *inodorus* apresentaram respostas diferentes nos dois experimentos. Não ocorreu a regeneração de embrião e parte aérea em nenhum dos tratamentos testados. Os resultados dos experimentos confirmam que em meloeiro androgêneses a partir de anteras é genótipo-dependente. No capítulo II, foi avaliada a produção de sementes haploides de meloeiro por meio do cruzamento interespecífico entre o meloeiro e quatro espécies de cucurbitáceas diferentes. Para o experimento foi utilizada a linhagem de meloeiro G5-4B (variedade botânica *reticulatus*), e como cucurbitáceas doadoras de pólen foram utilizadas: pepino (*Cucumis sativus*), maxixe (*Cucumis anguria* L.), abobrinha (*Cucurbita pepo*) e melão-de-são-caetano

(*Momordica charantia*). Os cruzamentos foram realizados somente com o pólen da cucurbitácea doadora ou com mistura do pólen da cucurbitácea com o da própria planta de meloeiro. Os cruzamentos realizados utilizando somente o pólen das cucurbitáceas doadoras não geraram nenhum fruto. Com a mistura de pólen ocorreu o pegamento de fruto nos cruzamentos com todas as espécies doadoras. As sementes de todos os frutos gerados foram analisadas individualmente, porém, não foram identificadas sementes com embriões com características haploides em nenhum dos cruzamentos.

Palavras-chave: *Cucumis melo*; cucurbitáceas; androgênese; cruzamentos interespecíficos; haploide.

ABSTRACT

In cucurbits, several techniques are used to obtain haploid plants. In melon (*Cucumis melo* L) cultivation, the most used technique is parthenogenesis induced by pollination with irradiated pollen, with X-rays and, above all, gamma. However, this is an inaccessible technique for melon genetic improvement programs, as it requires high-cost equipment and uses radiation sources considered harmful to living organisms. Despite being the most successful technique, the percentage of haploid plants obtained is still low. Therefore, it is important to develop or optimize alternative protocols to the use of radiation to obtain haploid melon plants, thus expanding access to the use of dihaploids to obtain homozygous parental lines. In this context, the objective of this work was to optimize protocols for obtaining haploid melon plants through *in vitro* cultivation of anthers and microspores and interspecific crossings. To this end, experiments were conducted in the greenhouse of the Plant Genetic Resources and Improvement laboratory and in the Plant Tissue Culture laboratory, both located at Embrapa Agroindústria Tropical, in Fortaleza, Ceará. In chapter I, the effects of different thermal pre-treatments and cultivation media on the callogenesis of melon anthers and microspores were evaluated. For this, three experiments were carried out, using four genotypes, two from the botanical variety *reticulatus* and two from *inodorus*. In the *in vitro* cultivation of microspores, callus formation did not occur in any of the treatments used. In the *in vitro* cultivation of anthers, it was observed that the medium used for callus induction was efficient in all treatments with the exception of heat pre-treatment before inoculating. The *reticulatus* genotypes presented higher means than *inodorus* in all variables. For *reticulatus*, in both experiments, cold pretreatment after *in vitro* inoculation of the anthers was efficient. The *inodorus* genotypes showed different responses in the two experiments. No embryo and aerial part regeneration occurred in any of the treatments tested. The results of the experiments confirm that androgenesis from anthers in melons is genotype-dependent. In chapter II, the production of haploid melon seeds was evaluated through interspecific crossing between the melon tree and four different cucurbit species. For the experiment, the melon line G5-4B (botanical variety *reticulatus*) was used, and the following cucurbits were used as pollen donors: cucumber (*Cucumis sativus*), gherkin (*Cucumis anguria* L.), zucchini (*Cucurbita pepo*) and melon-são-caetano (*Momordica charantia*). The crosses were carried out only with the pollen of the donor cucurbit or with a mixture of pollen from the cucurbit and that of the melon plant itself. Crosses

carried out using only pollen from donor cucurbits did not generate any fruit. With the mixture of pollen, fruit set occurred in crosses with all donor species. The seeds of all the fruits generated were analyzed individually, however, no seeds with embryos with haploid characteristics were identified in any of the crosses.

Keywords: *Cucumis melo*; cucurbits; androgenesis; interspecific crosses; haploid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Experimento em casa de vegetação com plantas de meloeiro das variedades botânicas *reticulatus* e *inodorus*..... 37
- Figura 2 - Flores masculinas de *Cucumis melo* coletadas em pré-antese..... 38
- Figura 3 - Procedimento de desinfestação dos botões florais em capela de fluxo. Na sequência da esquerda para direita: solução de álcool 70%, solução de 100 mL de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%), água destilada autoclavada nos três últimos recipientes..... 39
- Figura 4 - Procedimento para inoculação da solução com os micrósporos em suspensão..... 40
- Figura 5 - Concentração de micrósporos observada com auxílio do microscópio estereoscópico em três gotas da solução com os micrósporos em suspensão..... 40
- Figura 6 - Meio antera de meloeiro, cortada transversalmente para inoculação *in vitro*..... 41
- Figura 7 - Fase de indução do desenvolvimento da parte aérea: A) calo obtido ao final da fase de maturação contendo pontuações bem desenvolvidas e alongadas; B) pontuação excisada e inoculada em meio para indução do desenvolvimento da parte aérea. Barra = 1,0 cm 44
- Figura 8 - Variações nas cores observadas durante avaliação dos calos: A) bege; B) metade bege com metade verde claro; C) verde claro; e, D) metade verde claro com metade verde escuro; e, E) verde escuro. Barra = 1,0 cm..... 48
- Figura 9 - Classificação utilizada na avaliação do tamanho dos calos: A) pequeno (até 0,5cm de diâmetro); B) médio (de 0,5 cm até 1,0 cm de diâmetro); e, C) grande (maior que 1,0 cm de diâmetro). Barra = 1,0 cm..... 48
- Figura 10 - Variações nas quantidades de pontuações observadas durante avaliação dos calos: A) nenhuma; B) pouca; C) intermediária; e, D) muita. Barra = 1,0 cm..... 49
- Figura 11 - Polinização em meloeiro com pólen da cucurbitácea doadora: A) Flor feminina do meloeiro em antese protegida com cápsula de gelatina; B) 61

Retirada das pétalas da flor feminina; C) Polinização da flor feminina de meloeiro com o pólen da flor masculina de melão-de-são-caetano; D) Estigma polinizado; E) Flor após a polinização, protegida com cápsula de gelatina e identificada.

- Figura 12 - Cruzamentos interespecíficos. A – Cruzamento entre a flor feminina do meloeiro e a flor masculina da cucurbitácea doadora (sem a mistura de grãos de pólen), foram realizadas três tentativas de polinização por plantas. B - Cruzamento entre a flor feminina do meloeiro e a flor masculina da cucurbitácea doadora e do meloeiro..... 62
- Figura 13 - Frutos controles para comprovar a viabilidade do pólen das cucurbitáceas: A) pepino (*Cucumis sativus*); B) maxixe (*Cucumis anguria* L.); C) abobrinha (*Cucurbita pepo*); D) melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) 63
- Figura 14 - Cruzamentos interespecíficos: A) dois dias após a polinização; B) fruto formado sem semente haploide; C) fruto que não vingou..... 63
- Figura 15 - Semente completamente formada (esquerda), e semente sem embrião (direita)..... 66
- Figura 16 - Sementes com embriões haploides de meloeiro..... 66

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Pré-tratamento térmico a 4° C aplicado em espécies de cucurbitáceas com diferentes tempos de exposição..... | 29 |
| Tabela 2 - Classificação utilizada na avaliação dos calos duas semanas após o início da fase de maturação. No qual para cor os calos foram classificados de 1 a 5; para tamanho de 1 a 3; para pontuações de 1 a 4. | 42 |
| Tabela 3 - Porcentagem de calos formados no meio de cultivo MS + 1,0 µM de BAP + 2,0 µM de 2,4D em diferentes pré-tratamentos térmicos, aos 35 dias após a inoculação <i>in vitro</i> | 46 |
| Tabela 4 - Médias apresentadas pelas variedades botânicas <i>reticulatus</i> e <i>inodorus</i> na fase de maturação de calos, para as variáveis cor, tamanho e presença de pontuações, aos 50 dias após a inoculação <i>in vitro</i> das anteras..... | 50 |
| Tabela 5 - Porcentagem de calos formados, utilizando o meio de cultivo MS +1,0 µM de BAP + 2,0 µM de 2,4D em diferentes pré-tratamentos térmicos, aos 35 dias após a inoculação <i>in vitro</i> | 51 |
| Tabela 6 - Características de calos das variedades botânicas <i>C. melo</i> var <i>reticulatus</i> (G5-4B) e <i>C. melo</i> var <i>inodorus</i> (EHMEL 200910) na fase de maturação, quanto a cor, tamanho e presença de pontuações..... | 52 |
| Tabela 7 - Número de cruzamentos interespecíficos realizados entre a linhagem de meloeiro Gália G5-4B e quatro espécies de cucurbitáceas, considerando o número de flores polinizadas, o número de flores fertilizadas e o número de frutos gerados..... | 64 |
| Tabela 8 - Número de cruzamentos interespecíficos realizados entre a linhagem de meloeiro Gália 'G5-4B' e quatro espécies de Meio antera de meloeiro, cortada transversalmente para inoculação <i>in vitro</i> . cucurbitáceas, com mistura dos grãos de pólen, e a relação em porcentagem entre o número de flores polinizadas e o número de frutos obtidos..... | 65 |
| Tabela 9 - Número de cromossomos das cinco espécies de cucurbitáceas ($2n = 2x$) utilizadas nos cruzamentos interespecíficos..... | 67 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| 1.1 | Hipótese | 19 |
| 1.2 | Objetivos | 20 |
| <i>1.2.1</i> | <i>Objetivo geral</i> | 20 |
| <i>1.2.2</i> | <i>Objetivos específicos</i> | 20 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 2.1 | Cultura do melão | 21 |
| <i>2.1.1</i> | <i>Origem e Morfologia</i> | 21 |
| <i>2.1.2</i> | <i>Aspectos Botânicos</i> | 21 |
| <i>2.1.3</i> | <i>Aspectos econômicos</i> | 22 |
| 2.2 | Melhoramento Genético Vegetal | 23 |
| 2.3 | Duplo haploides | 23 |
| <i>2.3.1</i> | <i>Meloeiro haploides</i> | 24 |
| <i>2.3.2</i> | <i>Técnicas alternativas a partenogênese induzida por polinização com pólen irradiado para obtenção de plantas haploides de meloeiro</i> | 25 |
| <i>2.3.2.1</i> | <i>Cruzamentos interespecíficos</i> | 25 |
| <i>2.3.2.2</i> | <i>Cultivo in vitro de ovários</i> | 26 |
| <i>2.3.2.3</i> | <i>Cultivo in vitro de anteras e micrósporos</i> | 27 |
| <i>2.3.3</i> | <i>Dihaploidização</i> | 30 |
| <i>2.3.4</i> | <i>Identificação da ploidia</i> | 30 |
| | CAPÍTULO I – EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS TÉRMICOS E MEIOS DE CULTIVOS NA CALOGÊNESE DE ANTERAS E MICRÓSPOROS ISOLADOS DE MELOEIRO | 32 |
| 3 | INTRODUÇÃO | 36 |
| 3.1 | Material e Métodos | 37 |
| <i>3.2.1</i> | <i>Plantio, coleta e desinfestação dos botões florais</i> | 37 |
| <i>3.2.2</i> | <i>Experimentos I e II – Cultivo in vitro de micrósporos e anteras</i> | 39 |
| <i>3.2.3</i> | <i>Experimento III – Cultivo in vitro de anteras</i> | 43 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3 | Resultados e Discussão | 45 |
| 3.3.1 | <i>Experimento I – Cultivo in vitro de micrósporos isolados</i> | 45 |
| 3.3.2 | <i>Experimento II – Cultivo in vitro de anteras</i> | 46 |
| 3.3.3 | <i>Experimento III – Cultivo in vitro de anteras</i> | 50 |
| 3.4 | Conclusão | 54 |
| | CAPÍTULO II – OBTENÇÃO DE PLANTAS HAPLOIDES DE MELOEIRO POR MEIO DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS | 55 |
| 4 | | |
| 4.1 | Introdução | 58 |
| 4.2 | Material E Métodos | 60 |
| 4.3 | Resultados E Discussão | 62 |
| 4.4 | Conclusão | 68 |
| 5 | CONCLUSÃO GERAL | 69 |
| | REFERÊNCIAS | 70 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

Entre as diversas espécies pertencentes à família Cucurbitaceae, o melão (*Cucumis melo* L.) destaca-se pela diversidade e importância econômica (KOMALA e KUNI, 2022). A cultura possui considerável destaque no mercado mundial de hortaliças, sendo cultivado em todos os continentes. Em 2022, o Brasil produziu aproximadamente 700 mil toneladas em 27.457 hectares (IBGE, 2023).

Nos plantios comerciais de melão existe preferência pelo uso de híbridos F₁, devido às suas características superiores (ARAGÃO *et al.*, 2019). Para produção de sementes de híbridas, é necessário que as linhagens parentais apresentem alto grau de homozigose. Porém, a obtenção dessas linhagens por meio de técnicas tradicionais de melhoramento é uma das etapas mais demoradas e onerosas de um programa de melhoramento genético (BAKTEMUR *et al.*, 2013).

Para reduzir o tempo e o custo necessários para obtenção destas linhagens, o uso de dihaploides surge como uma alternativa promissora, na qual é possível a obtenção de linhagens puras em apenas um ciclo. A técnica consiste no desenvolvimento de indivíduos haploides para posterior indução da duplicação do número de cromossomos (CHEN *et al.*, 2014). Para algumas culturas amplamente cultivadas, como milho (COUTO *et al.*, 2015; AZEVEDO *et al.*, 2023) e trigo (SCAGLIUSI, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; PATIAL *et al.*, 2019) as técnicas para obtenção de haploides encontram-se estabelecidas, mas esse avanço não é observado em diversas outras espécies cultivadas, como o melão, onde ainda existe limitação na etapa de obtenção de plantas haploides.

Em Cucurbitáceas observa-se que ao menos três técnicas são utilizadas para obtenção de plantas haploides: partenogênese haploide *in situ*, induzida principalmente por polinização com pólen irradiado (SAUTON e DUMAS VAULX, 1987; DAL *et al.*, 2016; HOOGHVORST *et al.*, 2020; EBRAHIMZADEH *et al.*, 2021), ginogênese *in vitro* a partir da cultura de óvulo e ovário *in vitro* (DOMBLIDES *et al.*, 2019; BAKTEMUR *et al.*, 2022) e androgênese *in vitro* a partir da cultura de antera e micrósporos *in vitro* (ASADI *et al.*, 2018; ASADI e SEGUÍ- SIMARRO, 2021).

Para a cultura do melão, a técnica mais utilizada é a partenogênese induzida por polinização com pólen irradiado, que consiste na inativação do pólen por meio de agentes irradiantes, provocando a alteração da taxa de fertilização (SAUTON e DUMAS de VAULX,

1987; DAL *et al.*, 2016; IVANOVA, 2020). Para a aplicação da irradiação são necessárias instalações específicas e profissionais treinados (OLIVEIRA, 2019). As doses de radiação gama necessárias para provocar a alteração da taxa de fertilização são altas (BAGHERI *et al.*, 2021) quando comparadas à dose considerada letal para os seres humanos (OKUNO, 2013). Apesar de ser a técnica mais bem-sucedida para obtenção de haploides de melão, o percentual de plantas haploides obtidas por meio da técnica é baixo (HOOGHVORST *et al.*, 2020). Com isto, são necessários mais estudos em relação às técnicas alternativas viáveis para o desenvolvimento de plantas haploides, como a partenogênese por meio de cruzamentos interespecíficos e a cultura *in vitro* de ovário, anteras e micrósporos.

Para as técnicas alternativas mencionadas para obtenção de plantas de meloeiro haploides é importante estudar os diversos fatores que influenciam no sucesso de seus protocolos. No cruzamento interespecífico é necessário identificar a espécie mais adequada como doadora de pólen, e estabelecer as condições *in vitro* ideais para a fase de resgate de embrião (REN *et al.*, 2017). Na ginogênese e androgênese *in vitro*, fatores como genótipo e condições fitossanitárias da planta doadora, estágio de desenvolvimento do gametófito inoculado, uso de tratamentos térmicos, reguladores de crescimento e componentes do meio base são fundamentais para a eficiência da geração de plantas haploides (DONG *et al.*, 2016).

Neste contexto, para otimizar protocolos alternativos ao uso da radiação gama para obtenção de plantas de meloeiro haploides é necessário estudar os fatores que influenciam no sucesso das técnicas de cruzamento interespecíficos e cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos. Para isto, no primeiro capítulo, buscou-se determinar os meios de cultivos e os pré-tratamentos térmicos adequados para induzir a calogênese a partir de anteras e micrósporos de meloeiro. No segundo capítulo, procurou-se obter plantas haploides de meloeiro por meio de cruzamentos interepíficos, entre o meloeiro e outras cucurbitáceas.

1.1 Hipótese

A otimização de metodologias alternativas ao uso da radiação gama para obtenção de plantas de meloeiro haploides proporcionará maior acessibilidade à dihaploidização, apresentando-se como uma alternativa vantajosa em relação à etapa de geração de linhas endogâmicas puras, ao promover a otimização do processo de obtenção de cultivares híbridas de meloeiro.

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral desta pesquisa, foi otimizar protocolos alternativas ao uso da radiação para obtenção de plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos e de cruzamentos interespecíficos.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- Determinar o meio de cultivo e os pré-tratamentos térmicos para promover a indução de calos a partir de micrósporos e anteras de meloeiro.
- Determinar o meio de cultivo para promover a maturação de calos obtidos a partir de anteras de meloeiro.
- Obter plantas haploides de meloeiro por meio do cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos.
- Obter plantas haploides de meloeiro por meio de cruzamentos interespecíficos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do melão

2.1.1 Origem e Morfologia

Classificado como uma espécie altamente polimórfica e possivelmente cultivado há mais de 2.000 a.C., o meloeiro tem como possíveis centros de origem as porções central e oriental da África, e a Ásia, mas especificamente na Índia (NUNES *et al.*, 2016). A espécie é uma dicotiledônea, perene quando ocorre na natureza, mas cultivada pelo homem como planta anual. Apresenta sistema radicular pouco profundo e, praticamente sem raízes adventícias. O caule é herbáceo, de crescimento rasteiro ou prostrado, ramificado e com presença de gavinhas. As folhas são simples, de tamanho variável, alternadas, com presença de pelos, limbo orbicular, pentalobadas, reniforme e com margens denteadas (KIRKBRIDE, 1993; McCREIGHT *et al.*, 1993).

As flores são amarelas, apresentando cinco pétalas, existindo flores perfeitas e imperfeitas em diferentes pontos da planta. As flores masculinas são axilares e agrupadas em cacho, enquanto as flores hermafroditas e femininas são produzidas isoladas. As flores masculinas e hermafroditas produzem pólen e néctar, enquanto as flores femininas produzem somente néctar. Observa-se também que as flores masculinas aparecem primeiro e em maior quantidade na planta, já as flores hermafroditas/femininas surgem de 7 a 10 dias após as flores masculinas e em menor quantidade (KIILL *et al.*, 2015).

Classifica-se o fruto do meloeiro como uma baga carnuda, que apresentam características variadas de acordo com as diversas variedades botânicas existentes na espécie. Os frutos podem variar quanto ao sabor, tamanho, peso, à forma, coloração e textura da casca, ao tipo da polpa, à presença/intensidade do rendilhamento, presença/ausência de linhas de sutura na casca e tipo, coloração e ao aroma da polpa (GARCIA-MAS *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2019).

2.1.2 Aspectos Botânicos

A família Cucurbitaceae é conhecida por englobar diversas espécies de grande valor econômico, como melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* var. *Sativus* L.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), moranga (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) e abóbora (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.) (DONG *et al.*, 2016). Dentre essas diversas espécies, o melão destaca-se pela diversidade e importância econômica (CRISOSTOMO e ARAGÃO, 2013; KOMALA e KUNI, 2022). Taxonomicamente, a espécie *Cucumis melo* é subdividida em 16 variedades botânicas, das quais, seis pertencem à subespécie *agrestis* (*acidulus*, *chinensis*, *conomon*, *makuwa*, *momordica* e *tibish*) e 10 à subespécie *melo* (*adana*, *ameri*, *cantalupensis*, *chandalak*, *chate*, *chito*, *dudaim*, *flexuosus*, *inodorus* e *reticulatus*) (PITRAT, 2013).

Para facilitar a comercialização dos frutos em todo o mundo, os melões são divididos em tipos comerciais. O tipo agrupa cultivares que apresentam uma ou mais características semelhantes, que são facilmente identificadas e diferenciadas das demais, tais como cor, textura da casca, formato do fruto, cor da polpa, entre outros (PERPIÑÁ *et al.*, 2016). No Brasil, os tipos mais comercializados são: Amarelo, *Honey Dew* e Pele de Sapo (variedade *inodorus*), Cantaloupe e Gália (pertencentes à variedade *reticulatus*) e Charentais (pertencentes à variedade *cantalupensis*) (CRISOSTOMO e ARAGÃO, 2013).

2.1.3 Aspectos econômicos

A produção comercial de melão ocorre atualmente em mais de 100 países e possui considerável destaque no mercado mundial de hortaliças. Atualmente a China é o maior produtor mundial de melão, sendo responsável por cerca de 53% da produção mundial (FAO, 2023). No Brasil, a produção em 2022 foi de aproximadamente 700 mil toneladas do fruto, cultivadas em 27.457 hectares (IBGE, 2023). Parte da produção brasileira de melão é destinada à exportação, a qual, em 2022, alcançou 222 mil toneladas de fruto, tendo o mercado europeu como o principal destino (MDIC, 2023).

A região Nordeste destaca-se com cerca de 96% da produção, sobretudo nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco (IBGE, 2023). O clima exerce forte influência sobre a qualidade e produtividade da cultura no Semiárido brasileiro. Características como duração e intensidade da luminosidade, temperaturas elevadas e baixa precipitação pluviométrica (OLIVEIRA *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2018) associadas ao uso de tecnologias

de irrigação, insumos de qualidades, tecnologia de pós-colheita e cultivares geneticamente melhoradas garantem a alta produtividade da cultura no Nordeste (CAVALCANTE NETO *et al.*, 2020).

2.2 Melhoramento Genético Vegetal

O melhoramento genético vegetal pode ser definido como a arte e a ciência de aperfeiçoar o padrão genético de plantas em relação ao seu uso econômico (FRITSCHÉ-NETO e BORÉM, 2012). A utilização de métodos de melhoramento vegetal foi responsável pelo incremento na produtividade das principais culturas nos últimos 50 anos, o que ressalta a importância dos programas de melhoramento vegetal (BORÉM e MIRANDA, 2013).

Um dos métodos de melhoramento vegetal utilizado é a hibridização, que se baseia na endogamia para o desenvolvimento de híbridos superiores (GERMANÀ, 2011). O uso de sementes híbridas é viável em espécies cujo os aumentos nos custos de produção são compensados pela superioridade dos híbridos, resultante da heterose (FORSBERG e SMITH, 1980). Grande parte das cultivares comerciais de meloeiro é formada por híbridos F_1 , essa preferência se deve à alta produtividade, resistências a pragas e doenças, qualidade dos frutos e uniformidade de colheita (McCREIGHT *et al.*, 1993; NUNES *et al.*, 2016; ARAGÃO *et al.*, 2019).

Para produção de sementes híbridas, é necessário, do ponto de vista genético, que as linhagens parentais utilizadas no cruzamento sejam puras, ou seja, que apresentem alto grau de homozigose. A obtenção das linhagens parentais puras é uma etapa demorada e onerosa, pois por meio de técnicas tradicionais de melhoramento genético, pode levar aproximadamente dez anos e, mesmo após sucessivos avanços nas gerações, a obtenção de genótipos 100% homozigotos não é garantida (BAKTEMUR *et al.*, 2013). Uma alternativa para reduzir o tempo e o custo necessário para obtenção de linhagens puras e 100% homozigotas é por meio da obtenção de dihaploides (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2008).

2.3 Duplo Haploides

A dihaploidização possibilita a obtenção de linhagens puras e 100% homozigotas, em apenas um ciclo. A técnica consiste na indução do desenvolvimento de haploides para

posterior duplicação do número de cromossomos desses indivíduos (CHEN *et al.*, 2014). Essa tecnologia permite a fixação de genes de forma rápida, por meio do uso da dihaploidização, o que facilita a seleção de genótipos com características de interesse e acelera a obtenção de linhagens puras dos programas de melhoramento de algumas espécies cultivadas (GATAZKA e NIEMIROWICZ-SZCZYTT, 2013).

Em algumas culturas amplamente cultivadas, como milho (COUTO *et al.*, 2015; AZEVEDO *et al.*, 2023) e trigo (SCAGLIUSI, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; PATIAL *et al.*, 2019), as técnicas para obtenção de haploides encontram-se estabelecidas, inclusive em escala comercial.

Na literatura, observa-se que ao menos três técnicas são adotadas para obtenção de plantas haploides em cucurbitáceas: partenogênese haploide *in situ* (induzida principalmente por polinização com pólen irradiado) (SAUTON e DUMAS VAULX, 1987; BAKTEMUR *et al.*, 2014; KOŠMRLJ *et al.*, 2014; GALAZKA e SLOMNICKA, 2015; KOUAKOU *et al.*, 2015), ginogênese *in vitro* (cultivo *in vitro* de óvulo e de ovário) (MALIK *et al.*, 2011; GODBOLE e MURTHY, 2012; KOLI e MURTHY, 2013; LI *et al.*, 2013; PLAPUNG *et al.*, 2014) e androgênese *in vitro* (cultura de antera e grão de pólen *in vitro*) (SUPRUNOVA e SHMYKOVA, 2008; HAMIDVAND *et al.*, 2013; USMAN *et al.*, 2015; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018). No entanto, para cultura do melão a dihaploidização tem sido pouco utilizada devido às limitações na etapa de obtenção de plantas haploides.

2.3.1 Meloeiro haploides

Nos primeiros haploides de melão obtidos a eliminação somática de cromossomos ocorreu por meio do cruzamento interespecífico com *Cucumis ficifolius* (DUMAS DE VAULX, 1979). Em seguida, estudos com a produção *in situ* de embriões haploides foram realizados por meio da polinização com pólen irradiado e resgate *in vitro* de embriões haploides (SAUTON e DUMAS DE VAULX, 1987; SAUTON e DUMAS DE VAULX, 1988).

Para obtenção de plantas haploides deve-se levar em consideração a resposta específica de cada espécie às diferentes técnicas, a resposta também pode variar de acordo com o genótipo utilizado. Como relatado por Hooghvorst *et al.* (2020), em estudo avaliando, entre outros parâmetros, a capacidade partenogênica de sete genótipos de *C. melo* var. *inodorus* “Piel de Sapo” para produção de linhas dihaploides, observou-se que os genótipos apresentaram

diferentes desempenhos em todas as fases para produção do dihaploide, desde a polinização até a duplicação cromossômica. Segundo os autores a capacidade partenogênica do germoplasma do melão “Piel de sapo” avaliado no experimento foi menor do que o apresentado em outros estudos com genótipos das subespécies *chinensis*, *cantalupensis* e *inodorus*. Concluiu-se que a produção embrionária partenogênica está relacionada a variedade botânica utilizada.

Na cultura do melão, a partenogênese induzida por polinização com pólen irradiado ainda é a técnica mais utilizada e consiste na inativação do pólen por meio de agentes irradiantes, provocando alteração na taxa de fertilização (SAUTON e DUMAS de VAULX, 1987; MUROVEC e BOHANEK, 2012; FERRIE, 2017). Para que ocorra a aplicação da radiação são necessários aparelhos e instalações adequados, com profissionais treinados (OLIVEIRA, 2019). As doses de radiação gama necessárias para provocar a alteração da taxa de fertilização são altas, variando entre 200Gy (DAL *et al.*, 2016) e 550Gy (BAGHERI *et al.*, 2021) quando comparadas a dose considerada letal para os seres humanos, que é de 4Gy (OKUNO, 2013).

Apesar de ser a técnica mais bem-sucedida para obtenção de haploides de melão, o percentual de plantas haploides obtidas por meio da técnica é baixo (HOOGHVORST *et al.*, 2020). A otimização de técnicas alternativas ao uso da radiação é necessária para viabilizar o uso de duplo haploides em programas de melhoramento genético de melão.

2.3.2 Técnicas alternativas a partenogênese induzida por polinização com pólen irradiado para obtenção de plantas haploides de meloeiro

Além da partenogênese induzida por polinização com pólen irradiado, outras técnicas são utilizadas em diversas cucurbitáceas para obtenção de plantas haploides, como o uso de cruzamentos interespecíficos, a ginogênese *in vitro* (cultura de óvulo e ovário *in vitro*) e a androgênese *in vitro* (cultura de antera e grão de pólen *in vitro*).

2.3.2.1 Cruzamentos interespecíficos

A técnica de cruzamentos interespecíficos é eficiente em diversas espécies, e consiste na polinização da espécie da qual se deseja obter o haploide a partir do pólen de outra espécie. A planta polinizada é emasculada (caso a flor seja hermafrodita) para em seguida

receber o pólen e, posteriormente faz-se o resgate dos embriões das sementes imaturas (FRITSCHÉ-NETO *et al.*, 2013).

Observa-se que espécies relacionadas filogeneticamente apresentam maior chance de êxito quando utilizadas em hibridações interespecíficas (BRUCKNER E OTONI, 2009). Segundo Oliveira (2019), a técnica de cruzamentos interespecíficos é simples, de baixo custo e eficiente para algumas espécies, contudo, pouco estudada na cultura do melão.

Há relatos sobre a obtenção de plantas haploides de meloeiro resultantes do cruzamento com *Cucumis ficifolius*, em trabalho realizado por Dumas de Vaulx (1979), porém a taxa de plantas haploides obtidas foi inferior a 0,3%.

2.3.2.2 Cultivo *in vitro* de ovários

Os métodos que utilizam a cultura de tecidos vegetais têm os procedimentos baseados no princípio da totipotência celular, no qual pode ser definido como a capacidade de uma única célula se dividir e produzir outros tipos celulares. Com isto, é possível a formação de novo indivíduo por meio da regeneração sucessiva de todos os seus órgãos vegetativos ou pela entrada em uma nova via embriogênica, sendo as células reprodutivas (gametas) as mais adequadas para regenerar indivíduos haploides para programas de melhoramento vegetal (BORÉM e MIRANDA, 2013).

Segundo Dong *et al.* (2016), pelo menos cinco fatores afetam diretamente a ginogênese *in vitro*, os quais são: genótipo da planta doadora, estágio de desenvolvimento do gametófilo feminino, tratamentos térmicos (temperaturas baixas e altas), reguladores de crescimento e componentes do meio base.

Para a cultura do meloeiro, Malik *et al.* (2011) desenvolveram protocolo para indução de embriogênese somática a partir da cultura *in vitro* de ovários não fecundados. Este protocolo, aumentou a eficiência da aplicação da técnica na cultura e diminuiu consideravelmente o tempo necessário para identificação da ploidia das plantas regeneradas.

Protocolos de ginogênese *in vitro* foram testados em cucurbitáceas (ZHU *et al.*, 2018; ZOU *et al.*, 2018; KAUR *et al.*, 2019), mas no geral, essa técnica é utilizada com menos frequência quando comparada a androgênese para a produção de haploides (DWIVEDI *et al.*, 2015).

2.3.2.3 Cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos

A cultura *in vitro* de anteras e micrósporos é uma técnica classificada como eficiente para obtenção de haploides em muitas espécies, inclusive em cucurbitáceas (CALLOHUARI, 2013; KURTAR *et al.*, 2016a; KURTAR *et al.*, 2016b).

A partir da androgênese é possível obter a regeneração das plantas com base na embriogênese direta ou na organogênese indireta. Na embriogênese direta, os embriões são formados diretamente a partir de células somáticas, sem a formação de estruturas intermediárias, como calos. Na embriogênese indireta, a desdiferenciação celular é geralmente realizada sob condições de estresse, indução hormonal ou modificação da expressão genética. As células então passam por uma série de divisões mitóticas e diferenciações até formarem embriões completos (LONG *et al.*, 2022). Já por meio da organogênese indireta, os micrósporos imaturos diferenciam-se e a partir de sua divisão ocorre a formação de calos, estes podem ser induzidos para a regeneração de parte aérea seguida da regeneração do sistema radicular da planta. A partir disto a planta pode ser aclimatada e transplantada para casa de vegetação (FRITSCH NETO *et al.*, 2014).

São diversos os fatores (exógenos e endógenos) que afetam a resposta androgênica, entre eles: genótipo e condições de cultivo das plantas doadoras, estágio de desenvolvimento do micrósporo (SMITH, 2013; WANG *et al.*, 2018), tratamento térmico das anteras/micrósporos (WARCHOŁ *et al.*, 2019; COSTA, 2019; BILYNSKA, 2020) e composição do meio de cultivo (DIÓGENES NETO, 2019; LOPES, 2019). O estudo desses fatores é fundamental para o desenvolvimento de protocolo para o cultivo *in vitro* de anteras de meloeiro.

- **Genótipo**

O genótipo é um dos fatores que mais afeta a indução embriogênica e organogênica, e na posterior regeneração das plantas (DONG *et al.*, 2016). Em estudo testando duas linhagens de melancia, Silva *et al.* (2021) observaram que as linhagens submetidas as mesmas condições apresentavam resultados diferentes quanto à formação de calos.

Ao analisar a formação de calos a partir de anteras de três genótipos de meloeiro de variedades botânicas diferentes, Lopes (2019) observou que o genótipo da variedade botânica

cantalupensis foi capaz de produzir 18 vezes mais calos que o genótipo da variedade botânica *reticulatus*. Concluindo que o genótipo exerce grande influência na capacidade de indução de calos. Resultados semelhantes foram confirmados em outros estudos (SONG *et al.*, 2007; RAKHA *et al.*, 2012; COSTA, 2019; DIÓGENES NETO, 2019).

- **Estágio de desenvolvimento dos micrósporos**

O estágio de desenvolvimento dos micrósporos é um dos primeiros fatores que deve ser considerado para aplicação da técnica de cultura de anteras/micrósporos em novas culturas. A coleta dos botões florais para inoculação das anteras no estágio de desenvolvimento adequado dos micrósporos é fundamental para induzir a alteração da via gametofítica para esporofítica (GERMANÀ, 2011; NGUYEN *et al.*, 2022).

A via gametofítica é dividida em duas fases: a microsporogenese e a microgametogenese. A embriogênese e organogênese a partir de micrósporos somente podem ser induzidas na microsporogenese, pois no início da microgametogenese ocorre um acúmulo de amido, e isto faz com que o micrósporo seja incapaz de mudar da via gametofítica para esporofítica (NITSCH e NITSCH, 1969).

O estágio de desenvolvimento ideal para a androgênese varia de acordo com a espécie, porém, observa-se que para a maioria das espécies a resposta embriogênica dos micrósporos ocorre entre os estádios vacuolados do micrósporo (precoce, intermediário e tardio) e o estágio precoce bicelular de grãos de pólen (TOURAEV *et al.*, 2001). Em cucurbitáceas observa-se que os estádios vacuolados intermediário e tardio dos micrósporos são os adequados para a cultura *in vitro* de anteras (KUMAR e MURTHY, 2004; Xie *et al.*, 2005; RAKHA *et al.*, 2009; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016).

- **Tratamentos térmicos das anteras/micrósporos**

Os tratamentos térmicos são utilizados para estimular os micrósporos a passarem da via gametofítica para a esporofítica (DONG *et al.*, 2016). Em cucurbitáceas, observa-se que para o pré-tratamento frio a temperatura considerada adequada é de 4 °C, mas a duração da exposição pode diferir entre as espécies (TABELA 1).

Tabela 1. Pré-tratamento térmico a 4° C aplicado em espécies de cucurbitáceas com diferentes tempos de exposição.

| Espécie | Tempo de exposição | Referências |
|---------------------------|--------------------|---|
| <i>Cucumis melo</i> L. | 2 dias | DIÓGENES NETO, 2019; COSTA, 2019 |
| | 7 dias | LOPES, 2019 |
| <i>Cucumis sativus</i> L. | 2 dias | XIE <i>et al.</i> , 2005; SONG <i>et al.</i> , 2007; ABDOLLAHI <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Cucurbita pepo</i> L. | 4 dias | MOHAMED e REFAEI, 2004 |
| | 2 dias | SHALABY, 2006 |

Em trabalhos com meloeiro, Lopes (2019) e Costa (2019) testaram os pré-tratamentos frio a 4 °C e calor a 32° C, com diferentes durações de exposição em genótipos de variedades botânicas diferentes. Em ambos os trabalhos, observou-se que as respostas androgênicas as exposições térmicas variaram entre as variedades botânicas de *Cucumis melo*. Segundo Osolnik *et al.* (1993), o uso de pré-tratamentos térmicos para o estabelecimento *in vitro* das anteras em diversas espécies vegetais é considerado genótipo-dependente.

- **Composição do meio de cultivo**

Os meios de cultivo fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, e são responsáveis por parte do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Além da constituição básica do meio de cultivo, observa-se que a presença de açúcares e reguladores de crescimento são fundamentais para androgênese *in vitro* (ABDALLA *et al.*, 2022).

Para a cultura do melão, Diógenes Neto (2019) estudou o efeito de diferentes concentrações de sacarose no tamanho e na coloração de calos obtidos a partir de anteras. Nesse estudo, observou-se que para um genótipo da variedade botânica *cantalupensis* a concentração de 30g L⁻¹ de sacarose resultou em calos com coloração verde escura. Segundo Kurtar *et al.* (2016), a frequência de calos embriogênicos é maior em calos de coloração esverdeada.

Quanto aos reguladores de crescimento, as classes mais utilizadas na cultura *in vitro* de anteras e micrósoros são auxinas e citocininas (DONG *et al.*, 2016). As auxinas são utilizadas para estimular o início da divisão celular e induzir a formação do calo. Enquanto as

citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações (GEORGE *et al.*, 2008).

2.3.3 Dihaploidização

As plantas monoploides obtidas podem continuar o desenvolvimento *in vitro*, ou serem aclimatizadas e se desenvolver em casas de vegetação. No geral, essas plantas apresentam vigor reduzido e inflorescências com má formação (MUROVEC e BOHANEK, 2012). É necessário que ocorra a duplicação cromossômica para que seja produzido o dihaploide (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2008).

A duplicação cromossômica pode ocorrer de forma espontânea ou induzida, contudo, os mecanismos responsáveis pela duplicação cromossômica espontânea ainda são pouco compreendidos (MUROVEC e BOHANEK, 2012; AHMADI e EBRAHIMZADEH, 2020). No entanto, a indução de poliploidia pode ser realizada utilizando substância antimitóticas, essas substâncias atuam sobre as fibras do fuso acromático durante a divisão celular, o que impede a polimerização ou promove a fragmentação, não permitindo assim a separação dos cromossomos na anáfase. Com isso as células iniciam o ciclo celular seguinte com a quantidade de DNA duplicado (GUERRA, 2008; PEREIRA *et al.*, 2012).

O antimitótico mais utilizado em pesquisa é a colchicina (SHEIKH *et al.* 2013; SILVA, 2018; EBRAHIMZADEH *et al.*, 2018), que é um alcalóide tricíclico altamente tóxico e de difícil descarte (RODRIGUES, 2010). Atualmente, muitas pesquisas são realizadas para testar os efeitos e a eficiência de outros agentes antimitóticos, como oryzalin (EECKHAUT, 2003; CARVALHO *et al.*, 2016; TOMÉ *et al.*, 2016) e trifluralina (FENG *et al.*, 2017; EBRAHIMZADEH *et al.*, 2018).

2.3.4 Identificação da ploidia

Após a obtenção da planta é importante que ocorra a identificação da ploidia para comprovar que o indivíduo é haploide. Entre as técnicas para identificação da ploidia, a citometria de fluxo é recomendada por ser eficiente em distinguir indivíduos dihaploides de indivíduos diploides. Pois, dependendo da técnica utilizada para obtenção da planta é possível a ocorrência de plantas haploides, diploides e dihaploides.

A citometria de fluxo é uma técnica eficiente na triagem e contagem de células, na detecção de biomarcadores e é capaz de estimar o conteúdo de DNA celular para identificar a distribuição do ciclo celular (PELLICER e LEITCH, 2014; HAN *et al.*, 2016; COSTA, 2018). É um método de bastante precisão, que permite a análise de uma grande quantidade de amostras por dia, contudo, apresenta um elevado custo de operação (FRITSCHÉ-NETO *et al.*, 2013).

Nos organismos eucariontes, o crescimento e a divisão celular são processos que ocorrem constantemente, este processo cíclico é dividido em três fases: G1, S e G2 (HOWARD e PELC, 1986). A citometria de fluxo se baseia nesse processo celular (FRITSCHÉ-NETO *et al.*, 2013). Durante a primeira fase (G1) ocorre o período de crescimento celular, onde uma célula diploide apresenta conteúdo de DNA celular igual a 2C, logo, duas cópias de cada cromossomo. Em seguida, na fase S, ocorre a duplicação do genoma nuclear, resultando no conteúdo celular 4C. Em seguida, na fase G2 ocorre o segundo período de crescimento celular, o conteúdo de DNA nuclear é mantido o mesmo da fase S. Logo após estas fases, a célula passa pela mitose (fase M), onde está pronta para dividir-se em duas células filhas, ocorrendo a mitose e possuindo novamente um conteúdo de 2C de DNA (BELICUAS, 2004).

Para se determinar o nível de ploidia de uma planta a partir desse método, é necessário a comparação do conteúdo de DNA da planta (núcleos em G1) com o conteúdo de DNA de outra planta da mesma espécie que tenha o nível de ploidia conhecido. No procedimento observa-se a partir do conteúdo de DNA nuclear, a intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA (DOLEZEL, 1997; PELLICER e LEITCH, 2014).

3 CAPÍTULO I – EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS TÉRMICOS E MEIOS DE CULTIVOS NA CALOGÊNESE DE ANTERAS E MICRÓSPOROS ISOLADOS DE MELOEIRO

RESUMO

O cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos é frequentemente a técnica utilizada para produção de dihaploides. Fatores como genótipo, tratamentos térmicos e composição do meio de cultivo influenciam no sucesso da técnica, com isto, é necessário estabelecer as condições adequadas para cada fator. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes pré-tratamentos térmicos e meios de cultivo na formação de calos a partir de anteras e micrósporos isolados de meloeiro. Foram realizados três experimentos utilizando as variedades botânicas *reticulatus* e *inodorus*. Flores masculinas foram coletadas em pré-antese e o meio de cultivo MS + 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de 2,4D foi utilizado para indução de calos. No experimento I, foram utilizados como explantes micrósporos, e nos experimentos II e III, anteras. Nos experimentos I e II, os materiais foram divididos nos pré-tratamentos térmicos: 1) controle; 2) calor antes de inoculação; 3) calor depois da inoculação; 4) frio antes da inoculação; 5) frio depois da inoculação, todos durante 2 dias no escuro. A formação de calos, foi avaliada aos 10, 20 e 30 dias após inoculação. Transcorrido 35 dias da inoculação, ocorreu a transferência dos calos formados para meios para maturação: MS + 0,68 μM de BAP + 30,0 g.L^{-1} (A) e MS + 2,22 μM de BAP + 60,0 g.L^{-1} de sacarose (B). Após 15 dias do início da fase de maturação, os calos foram avaliados quanto à cor, tamanho e ocorrência de pontuações. Nos experimentos I e II, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), analisado em esquema fatorial com cinco pré-tratamentos e dois meios de cultivo, em cada variedade botânica. No experimento III, as anteras inoculadas *in vitro*, foram divididas nos pré-tratamentos térmicos 1, 3 e 5. Transcorridos 35 dias da inoculação, os calos formados foram transferidos para o meio (A). Após 15 dias do início da fase de maturação, os calos foram avaliados quanto à cor, tamanho e ocorrência de pontuações. Nesse experimento foi aplicado um DIC com esquema fatorial de três pré-tratamentos e dois genótipos. Após 20 dias da avaliação, as pontuações protuberantes dos calos foram inoculadas nos meios de cultivo, MS + 4,0 mg.L^{-1} de BAP + 0,05 mg.L^{-1} de ANA + 30,0 g.L^{-1} de sacarose e MS + 0,5 mg.L^{-1} de BAP + 0,05 mg.L^{-1} de ANA + 30,0 g.L^{-1} de sacarose, para induzir o desenvolvimento embriogênico ou organogênico. No experimento I, não ocorreu a formação de calos em nenhum dos tratamentos

nos dois genótipos. Nos experimentos II e III, o meio para indução de calos foi eficiente em todos os tratamentos com exceção do pré-tratamento térmico 3, em ambas as variedades botânicas. Na fase de maturação de calos, para *reticulatus*, em ambos os experimentos, o pré-tratamento frio após inoculação foi eficiente. Os genótipos *inodorus* apresentaram respostas diferentes nos dois experimentos. Não ocorreu o desenvolvimento do embrião e nem de partes aéreas nos meios de cultivo testados. Os resultados dos experimentos confirmam que em meloeiro a resposta androgênica é genótipo-dependente.

Palavras-chave: *Cucumis melo*; haploide; androgênese.

ABSTRACT

The *in vitro* cultivation of anthers and microspores is often the technique used to produce dihaploids. Factors such as genotype, heat treatments and composition of the cultivation medium influence the success of the technique, therefore, it is necessary to establish the appropriate conditions for each factor. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of different thermal pre-treatments and cultivation media on the formation of callus from isolated melon anthers and microspores. Three experiments were carried out using the botanical varieties *reticulatus* and *inodorus*. Male flowers were collected pre-anthesis and MS culture medium + 1.0 μM BAP + 2.0 μM 2,4D was used for callus induction. In experiment I, microspores were used as explants, and in experiments II and III, anthers. In experiments I and II, the materials were divided into thermal pre-treatments: 1) control; 2) heat before inoculation; 3) heat after inoculation; 4) cold before inoculation; 5) cold after inoculation, all for 2 days in the dark. Callus formation was evaluated at 10, 20 and 30 days after inoculation. After 35 days of inoculation, the forming calli were transferred to media for maturation: MS + 0.68 μM BAP + 30.0 g. L⁻¹ (A) and MS + 2.22 μM BAP + 60.0 g.L⁻¹ of sucrose (B). 15 days after the beginning of the maturation phase, the calluses were evaluated for color, size and occurrence of scores. In experiments I and II, the experimental design was completely randomized (DIC), analyzed in a factorial scheme with five pre-treatments and two cultivation media, in each botanical variety. In experiment III, the anthers inoculated *in vitro* were divided into thermal pre-treatments 1, 3 and 5. After 35 days of inoculation, the formed calli were transferred to the medium (A). 15 days after the beginning of the maturation phase, the calluses were evaluated for color, size and occurrence of scores. In this experiment, a DIC was applied with a factorial scheme of three pre-treatments and two genotypes. After 20 days of evaluation, the protruding callus patches were inoculated into the culture media, MS + 4.0 mg. L⁻¹ of BAP + 0.05 mg. L⁻¹ of ANA + 30.0 g.L⁻¹ of sucrose and DM + 0.5 mg. L⁻¹ of BAP + 0.05 mg. L⁻¹ of ANA + 30.0 g. L⁻¹ sucrose, to induce embryogenic or organogenic development. In experiment I, callus formation did not occur in any of the treatments in both genotypes. In experiments II and III, the callus induction medium was efficient in all treatments, with the exception of thermal pre-treatment 3, in both botanical varieties. In the callus maturation phase, for *reticulatus*, in both experiments, cold pre-treatment after inoculation was efficient. The *inodorus* genotypes showed different responses in the two experiments. There was no development of the embryo

or aerial parts in the tested culture media. The results of the experiments confirm that the androgenic response in melon is genotype-dependent.

Keywords: *Cucumis melo*; haploid; androgenesis.

3.1 Introdução

O duplo haploide é uma ferramenta biotecnológica importante para os programas de melhoramento genético vegetal (ELIBY *et al.*, 2022). A técnica consiste no desenvolvimento de indivíduos haploides por meio de linhagens indutoras de haploidia, partenogênese induzida por polinização com pólen irradiado ou por meio de cruzamentos interespecíficos, androgênese *in vitro* e ginogênese *in vitro*, seguida pela indução da duplicação cromossômica dos indivíduos haploides obtidos (ZARGAR *et al.*, 2022).

Essa ferramenta possibilita o desenvolvimento de linhagens em homozigose em apenas uma geração, apresentando uma redução significativa de tempo e custo quando comparadas às técnicas tradicionais de melhoramento genético para obtenção de linhagens puras (BRAUNER *et al.*, 2019).

Na cultura do meloeiro, a técnica mais utilizada para obtenção de plantas haploides é a partenogênese induzida por meio da polinização com pólen irradiado, porém, o uso dessa técnica apresenta diversas limitações, como a necessidade de instalações específicas e profissionais especializados (OLIVEIRA, 2019), o risco à saúde humana devido às altas doses de radiação (OKUNO, 2013) e o baixo percentual de plantas haploides obtidas (BAGHERI *et al.*, 2021). Em algumas espécies de cucurbitáceas, observar-se que a técnica de androgêneses *in vitro* é utilizada para obtenção de haploides (HAMIDVAND *et al.*, 2013; USMAN *et al.*, 2015; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018). A androgênese pode ocorrer por meio da cultura de anteras, cultura de micrósporos e cultura de micrósporos isolados (NIAZIAN e SHARIATPANAHI, 2020).

Para o uso da técnica é importante o desenvolvimento ou ajuste de protocolos, pois a androgênese *in vitro* é afetada por diversos fatores, como o genótipo da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos, os tratamentos térmicos, a composição do meio de cultura, entre outros (NIAZIAN e SHARIATPANAHI, 2020).

Então, para ajustar protocolos de obtenção de plantas haploides de meloeiro através da cultura *in vitro* de anteras e micrósporos é necessário estabelecer as condições corretas para os fatores citados anteriormente. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes pré-tratamentos térmicos e meios de cultivo na calogênese de anteras e micrósporos de diferentes variedades botânicas de meloeiro.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Plantio, coleta e desinfestação dos botões florais

O plantio dos genótipos utilizados como doadores das anteras ocorreu na casa de vegetação do laboratório de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. Foram semeados genótipos pertencentes as variedades botânicas *inodorus* e *reticulatus*. O semeio ocorreu em bandejas de 200 células, preenchidas com uma mistura de pó de fibra de coco e substrato comercial na proporção 1:1, as quais foram mantidas no escuro por 48 horas, e posteriormente levadas para casa de vegetação. Doze dias após a semeadura, as mudas (com pelo menos uma folha verdadeira) foram transplantadas para vasos de polietileno de 5 litros contendo areia. O espaçamento utilizado na casa de vegetação foi de 0,4m entre vasos e 0,8m entre linhas. O tutoramento das plantas foi conduzido por meio de fitilhos (FIGURA 1).

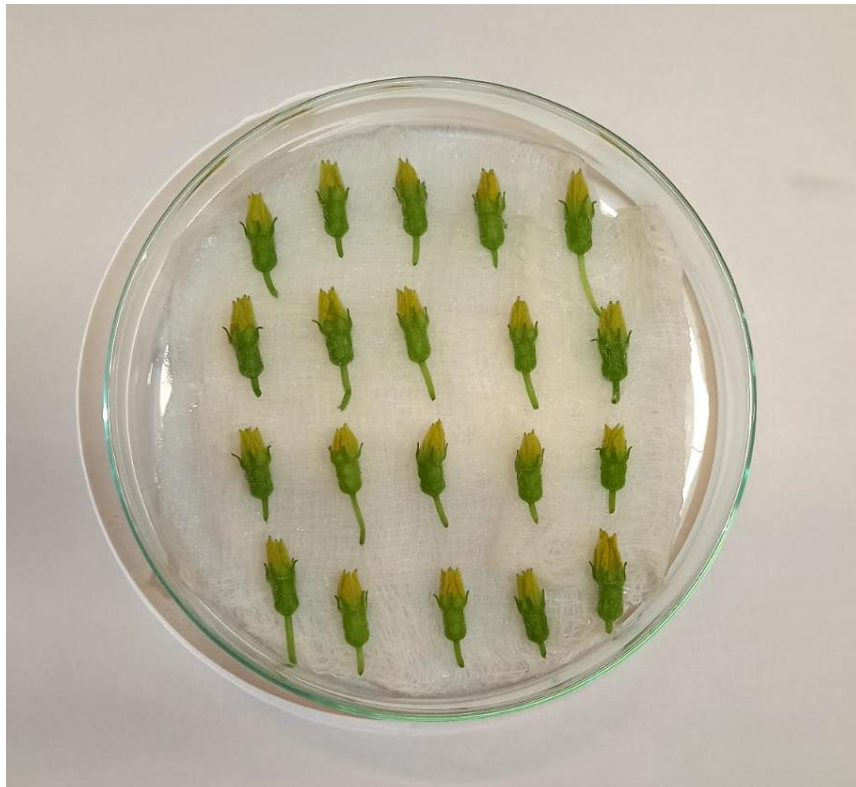
Figura 1. Experimento em casa de vegetação com plantas de meloeiro das variedades botânicas *reticulatus* e *inodorus*.



Fonte: Autor

Os tratamentos culturais, como a capina, dentro dos vasos foram realizados manualmente sempre que necessário, e as plantas fertirrigadas diariamente, sendo fornecido a quantidade de água e nutrientes adequados para cada fase de desenvolvimento da cultura (SOUZA, 2004). O controle fitossanitário foi realizado para Mosca-branca (*Bemisia tabaci*) sempre que necessário. A coleta das flores masculinas ocorreu entre a segunda e quarta semana após o surgimento das primeiras flores masculinas (FIGURA 2).

Figura 2. Flores masculinas de *Cucumis melo* coletadas em pré-antese.



Fonte: Autor

Os botões florais foram coletados em pré- antese, no período da manhã, entre 7h e 8h, e conduzidos em um becker para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais também da Embrapa Agroindústria Tropical, onde ocorreu a desinfestação dos botões florais em capela de fluxo de acordo com o protocolo de Oliveira (2019), utilizando solução de álcool 70% por 1 minuto, seguida por solução de 100 mL de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%), durante 7 minutos e 30 segundos, e, por fim, enxaguados três vezes com água destilada autoclavada, em 1 minuto cada (FIGURA 3). A metodologia de plantio das mudas, coleta e desinfestação dos botões florais foi a mesma para os três experimentos realizados.

Figura 3. Procedimento de desinfestação dos botões florais em capela de fluxo. Na sequência da esquerda para direita: solução de álcool 70%, solução de 100 mL de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%), água destilada autoclavada nos três últimos recipientes.



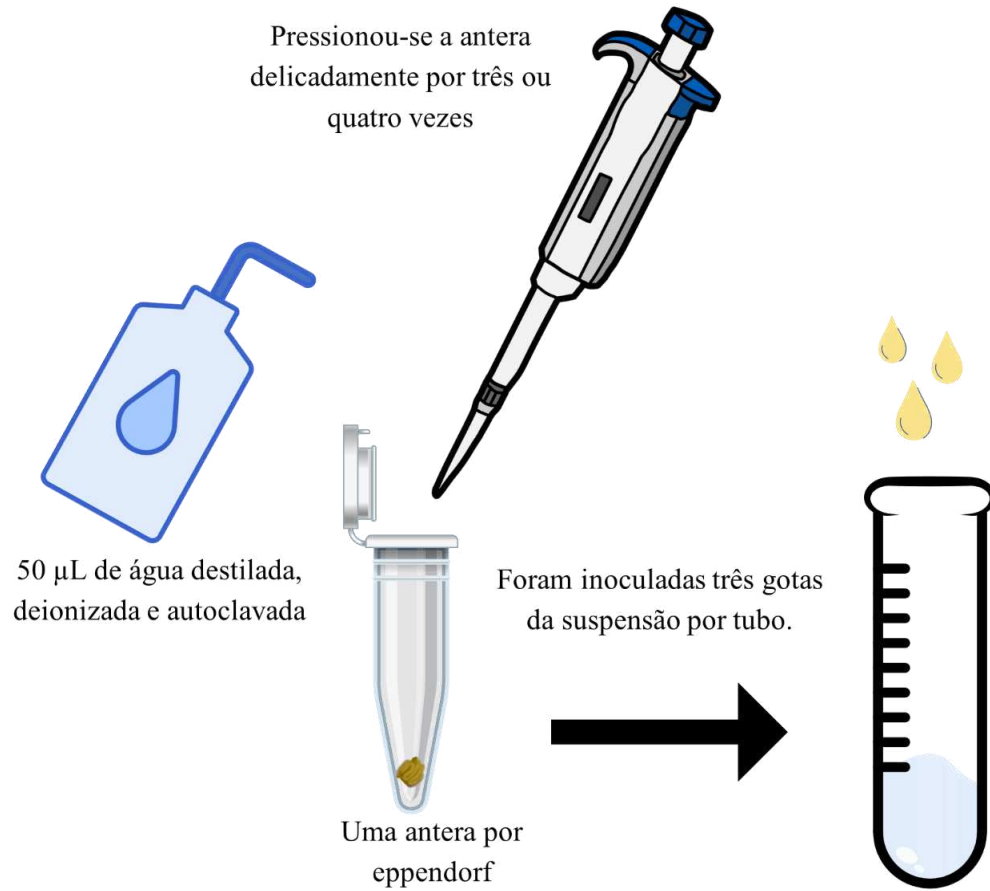
Fonte: Autor

3.2.2 Experimentos I e II – Cultivo *in vitro* de micrósporos e anteras

Os experimentos foram conduzidos de fevereiro a setembro de 2022. Onde foram utilizados os híbridos Grand Prix (*Cucumis melo* var. *inodorus*) e Festival (*Cucumis melo* var. *reticulatus*).

No experimento I, micrósporos foram inoculados *in vitro*, para tanto, após a desinfestação dos botões florais, as anteras foram excisadas com o auxílio de uma pinça e em seguida colocadas em microtubos eppendorf onde foi adicionado 50 μ L de água destilada, deionizada e autoclavada. Com auxílio de uma ponteira de micropipeta pressionou-se o material delicadamente por três ou quatro vezes. A solução com os micrósporos em suspensão foi inoculada em tubos de ensaio com 150 x 25 mm, contendo 10 mL de meio de cultivo, utilizando três gotas da suspensão por tubo (FIGURAS 4 e 5).

Figura 4. Procedimento para inoculação da solução com os micrósoros em suspensão.



Fonte: Autor

Figura 5. Concentração de micrósoros observada com auxílio do microscópio estereoscópico em três gotas da solução com os micrósoros em suspensão.



Fonte: Autor

No experimento II, para inoculação *in vitro* de anteras, as flores foram abertas e as anteras excisadas com o auxílio de pinças e bisturis, partidas transversalmente ao meio e inoculadas horizontalmente em tubos de ensaio de 150 x 25 mm, contendo 10 mL de meio de cultivo, sendo inoculada meia antera por tubo (FIGURA 6).

Figura 6 – Meia antera de meloeiro, cortada transversalmente para inoculação *in vitro*.



Fonte: Autor

Em ambos os experimentos, o meio de cultivo utilizado para a indução de calos foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido com 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de 2,4D + 30 g.L^{-1} de sacarose, de acordo com o protocolo de Kurtar *et al.* (2016) com modificações. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121 $^{\circ}\text{C}$ e 1 atm, por 15 minutos.

Ambos os experimentos foram compostos por cinco pré-tratamentos térmicos: 1) controle, a 25 $^{\circ}\text{C}$; 2) calor em estufa B.O.D, a 32 $^{\circ}\text{C}$ antes de inoculação *in vitro*; 3) calor em estufa B.O.D, a 32 $^{\circ}\text{C}$ depois de inoculação *in vitro*; 4) frio em geladeira, a 4 $^{\circ}\text{C}$ antes de inoculação *in vitro*; 5) frio em geladeira, a 4 $^{\circ}\text{C}$ depois de inoculação *in vitro*, todos durante 2

dias no escuro (ABDOLLAHI et al., 2015; DIÓGENES NETO, 2019; COSTA, 2019). Após esse período, todos os tubos foram transferidos para sala de crescimento a 25 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 35 dias.

Para fase de indução de calos a partir de anteras e micrósporos, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com duas variedades botânicas e cinco pré-tratamentos térmicos com 40 repetições cada, totalizando 400 amostras. A formação de calos, foi avaliada aos 10, 20 e 30 dias após inoculação, em ambos os experimentos.

Após 35 dias da fase da calogênese, os calos foram transferidos para dois meios de cultivo para maturação: (A) MS + 0,68 μM de BAP + 30,0 g.L^{-1} de sacarose (ASADI *et al.*, 2018); e, (B) MS + 2,22 μM de BAP + 60,0 g.L^{-1} de sacarose (AMIRIAN *et al.*, 2019). Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições de fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura da fase de calogênese. Após 15 dias do início da fase de maturação, os calos foram avaliados quanto à cor, ao tamanho e à ocorrência de pontuações (TABELA 2). Os parâmetros de classificação utilizados, foram estabelecidos em trabalhos anteriores (DIÓGENES NETO, 2019; LOPES, 2019; COSTA, 2019).

Tabela 2 – Classificação utilizada na avaliação dos calos duas semanas após o início da fase de maturação. No qual para cor os calos foram classificados de 1 a 5; para tamanho de 1 a 3; para pontuações de 1 a 4.

| Cor | Tamanho | Pontuações |
|--|-------------|-------------------|
| 1 – Bege | 1 - Pequeno | 1 - Nenhuma |
| 2 - Metade bege e metade verde claro | 2 - Médio | 2 - Poucas |
| 3 - Verde claro | 3 - Grande | 3 - Intermediária |
| 4 - Metade verde claro e metade verde escuro | | 4 – Muitas |
| 5 - Verde escuro | | |

Para fase de maturação de calos, o delineamento experimental aplicado foi inteiramente casualizado, em ambos os experimentos, analisado esquema fatorial com cinco pré-tratamentos e dois meios de cultivo, dentro de cada variedade botânica, com 50 repetições por tratamento, totalizando 1.000 amostras. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.2.3 Experimento III – Cultivo *in vitro* de anteras

O experimento foi conduzido de novembro de 2022 a abril de 2023. Neste experimento, foram utilizadas as linhagens EHMEL 200910 (*Cucumis melo* var. *inodorus*) e G5-4B (*Cucumis melo* var. *reticulatus*), a mudança de genótipos com relação ao experimento I e II, ocorreu por dois fatores, primeiro, para avaliar a resposta de diferentes genótipos da mesma variedade botânica submetidos as mesmas condições para calogênese, segundo, visando dar continuidade aos experimentos de cultivo *in vitro* de anteras, o uso de linhagens apresenta a vantagem de possibilitar a multiplicação e renovação das sementes. Enquanto no uso de híbridos comerciais, há necessidade da aquisição de novas sementes com frequência.

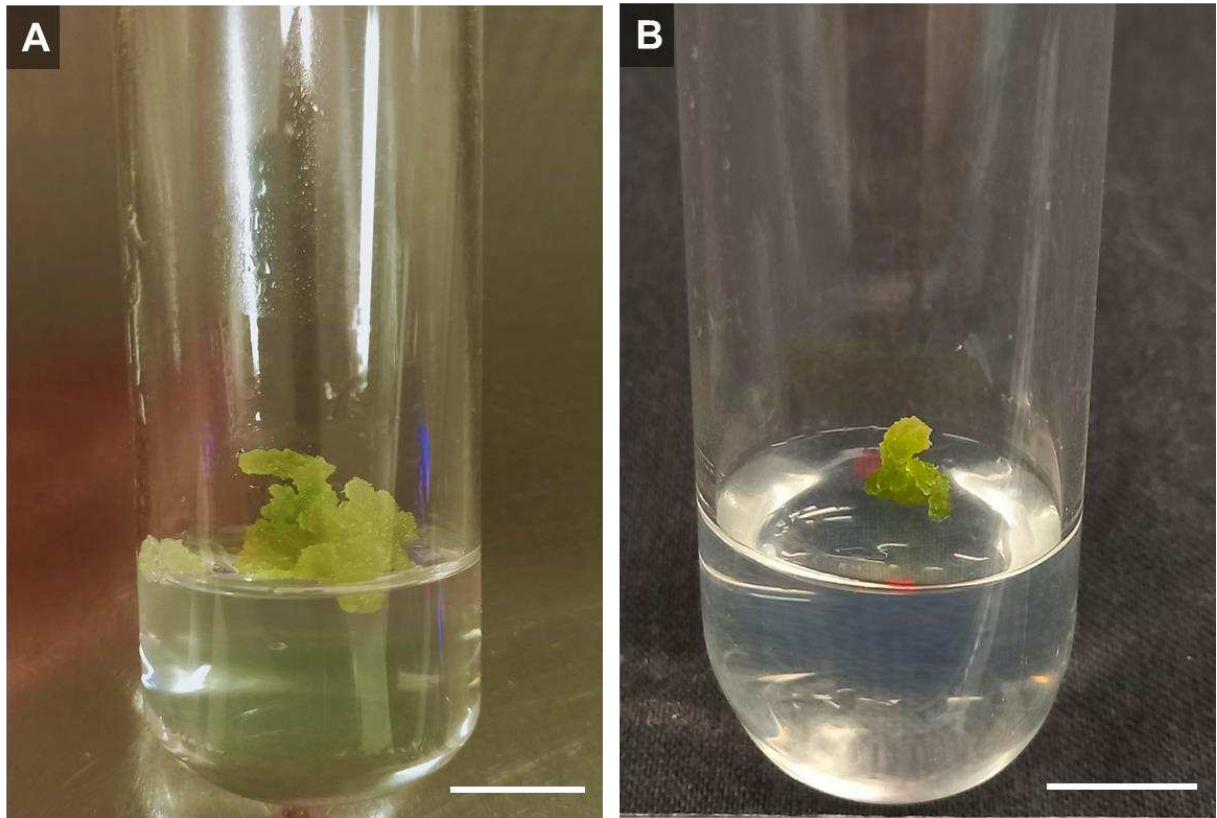
Assim como nos experimentos I e II, o meio de cultivo utilizado para a indução de calos foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido com 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de 2,4D + 30,0g. L^{-1} de sacarose, de acordo com o protocolo de Kurtar *et al.* (2016) com modificações. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121 °C e 1 atm, por 15 minutos.

Com base nos resultados do experimento II, com o cultivo *in vitro* de anteras, neste experimento foram utilizados somente três pré-tratamentos térmicos: 1) controle, a 25 °C; 2) calor em estufa B.O.D, a 32 °C depois da inoculação *in vitro*; 3) frio, a 4 °C depois da inoculação *in vitro*, todos durante 2 dias no escuro (ABDOLLAHI *et al.*, 2015; DIÓGENES NETO, 2019; COSTA, 2019). Em seguida, todos os tubos foram transferidos para sala de crescimento a 25 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 35 dias.

Na fase de indução de calos, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com duas variedades botânicas e três pré-tratamentos térmicos com 50 repetições cada, totalizando 300 amostras, sendo cada repetição composta por um tubo contendo meia antera. Foram avaliados os percentuais de calos formados em cada tratamento.

Após 35 dias da fase da calogênese, os calos foram transferidos para o meio de cultivo (A) MS + 0,68 μM de BAP + 30,0 g. L^{-1} de sacarose (ASADI *et al.*, 2018), para iniciar a fase de maturação. Os tratamentos foram submetidos as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa que na fase de calogênese. Após 15 dias do início da fase de maturação, os calos foram avaliados quanto à cor, ao tamanho e à ocorrência de pontuações (TABELA 2).

Figura 7 – Fase de indução do desenvolvimento da parte aérea: A) calo obtido ao final da fase de maturação contendo pontuações bem desenvolvidas e alongadas; B) pontuação excisada e inoculada em meio para indução do desenvolvimento da parte aérea. Barra = 1,0 cm.



Fonte: Autor

Após 35 dias do início da fase de maturação, foram selecionados calos de todos os tratamentos em que fosse possível observar pontuações bem desenvolvidas (Figura 7). Essas pontuações foram excisadas e inoculadas em meios para induzir o desenvolvimento da parte aérea: (C) MS + 4,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,05 mg L⁻¹ de ANA + 30,0 g L⁻¹ de sacarose; e (D) MS + 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,05 mg L⁻¹ de ANA + 30,0g L⁻¹ de sacarose (KURTAR *et al.*, 2016) cada tubo foi considerado como uma repetição, e cada tratamento foi composto por 10 repetições. Nessa fase, o meio era renovado a cada 10 dias, sendo realizada três trocas de meio no total para cada repetição.

Para a fase de maturação de calos, o delineamento experimental aplicado foi inteiramente casualizado, analisado em esquema fatorial com três pré-tratamentos e duas variedades botânicas, com 50 repetições por tratamento, totalizando 300 amostras. Os dados

obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Experimento I – Cultivo *in vitro* de micrósporos isolados

Os micrósporos inoculados foram avaliados a cada intervalo de 10 dias, durante o período de 30 dias após a inoculação. Esperava-se que o desenvolvimento de calos deste experimento ocorresse de forma paralela ao desenvolvimento dos calos do Experimento II com cultivo de anteras, no qual a presença de calos já era observada em todos os pré-tratamentos térmicos, 10 dias após a inoculação. Contudo, no Experimento I não foi constatada a formação de calos, independente do pré-tratamento térmico utilizado.

A resposta androgênica do cultivo *in vitro* de micrósporos isolados, assim como o de anteras, pode ser afetada por diversos fatores, como o genótipo, as condições de cultivos das plantas doadoras, o estágio de desenvolvimento do micrósporo quando inoculado (SMITH, 2013; WANG *et al.*, 2018), o uso de pré-tratamentos térmicos e choques térmicos (WARCHOŁ *et al.*, 2019; COSTA, 2019; BILYNSKA, 2020) e composição do meio de cultivo utilizado (DIÓGENES NETO, 2019; LOPES, 2019).

O genótipo e os estágios de desenvolvimento dos micrósporos são os fatores que mais afetam a resposta androgênica (SEGUÍ-SIMARRO, 2010). Para maioria das espécies já estudadas, a resposta embriogênica dos micrósporos ocorre entre os estádios vacuolados do micrósporo e o estágio precoce bicelular de grãos de pólen, nesses estádios é possível induzir a alteração da via gametofítica para esporofítica. Neste experimento, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos é uma das possíveis causas para a não formação de calos. Em meloeiro o estágio binuclear tardio predomina nos botões florais em pré-antese (NGUYEN *et al.*, 2022

A androgênese pode ocorrer por meio da cultura de anteras, cultura de micrósporos e cultura de micrósporos isolados. O método de cultivo de micrósporos isolados é utilizado em diversas espécies, de forma eficiente para androgênese (ESTEVEES *et al.*, 2014; LANTOS *et al.*, 2018; MINEYKINA *et al.*, 2021). Segundo Lantos *et al.* (2018), quando a metodologia para cultivo de micrósporos é eficiente, o método torna-se mais vantajoso que o cultivo *in vitro* de

anteras, pois, as plantas que posteriormente forem regeneradas certamente serão derivadas dos micrósporos e por isso só poderão ser haploides ou dihaploides. Enquanto as plantas regeneradas a partir do cultivo *in vitro* de anteras podem ser haploides, diploides e dihaploides.

3.3.2 Experimento II – Cultivo *in vitro* de anteras

- Fase de indução de calos

Segundo Abdollahi e Rashidi (2018), o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento utilizados para a indução de calos são dois fatores importantes na androgênese. No presente estudo, houve formação de calos em todos os tratamentos, constatando a eficiência do meio de cultivo utilizado para a formação dos calos em ambas as variedades botânicas estudadas (TABELA 3).

Tabela 3 – Porcentagem de calos formados no meio de cultivo MS + 1,0 µM de BAP + 2,0 µM de 2,4D em diferentes pré-tratamentos térmicos, aos 35 dias após a inoculação *in vitro*.

| Tratamento | Variedade botânica (<i>Cucumis melo</i>) | | Média |
|--|--|-----------------|-------|
| | <i>reticulatus</i> | <i>inodorus</i> | |
| Controle | 100 aA ¹ | 98 aA | 99 |
| Calor antes da inoculação <i>in vitro</i> | 68 cA | 16 bB | 42 |
| Calor depois da inoculação <i>in vitro</i> | 90 bA | 90 aA | 90 |
| Frio antes da inoculação <i>in vitro</i> | 100 aA | 98 aA | 99 |
| Frio depois da inoculação <i>in vitro</i> | 86 bB | 96 aA | 91 |
| Média | 88,8 | 79,6 | 84,2 |

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No estudo realizado por Lopes (2019) utilizando anteras de três variedades botânicas de meloeiro, inoculados em meio de cultivo MS suplementado apenas com 2,4D na concentração de 2,0 mg L⁻¹ observou-se que não houve formação de calos em nenhuma das anteras inoculadas. Entretanto, nesse mesmo estudo, foi possível observar que após transferir as anteras para um novo meio suplementado com 2,0 mg. L⁻¹ de 2,4D e 0,5 mg. L⁻¹ de BAP,

ocorreu a formação de calos em todos os tratamentos, constatando variações nas taxas de calogênese dentro de cada variedade botânica, sendo o genótipo da variedade botânica *reticulatus* o mais responsivo. Abdollahi *et al.* (2015), também observou efeitos positivos ao combinar 2,4D e BAP na calogênese de anteras de melancia (*Citrullus lanatus*).

O uso de reguladores de crescimento vegetal é importante durante todo o processo para obtenção das plantas haploides, pois, essas substâncias afetam processos que vão desde a embriogênese até a regeneração da planta haploide ou duplo haploide (ZUR *et al.*, 2015). Para cucurbitáceas, observa-se que os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecido são as auxinas e citocininas (DONG *et al.*, 2016). A combinação desses dois fitoreguladores é fundamental para determinar os padrões de crescimento e desenvolvimento das células. As auxinas tendem a estimular o alongamento celular, e as citocininas promovem a regulação e a divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 2013; MORTATE *et al.*, 2018). Determinar a concentração adequada de auxinas (2,4D, AIA e ANA) e citocininas (BAP, KIN e TDZ) é importante para ajustar o protocolo de obtenção de plantas haploides de meloeiro. Observa-se também que, a eficiência do uso de reguladores de crescimento na androgênese *in vitro* depende também da espécie vegetal (NIAZIAN e HARIATPANAH, 2020). Para o meloeiro, a resposta androgênica varia entre e dentro das variedades botânicas, como concluiu os trabalhos de Lopes (2019), Diógenes Neto (2019) e Costa (2019).

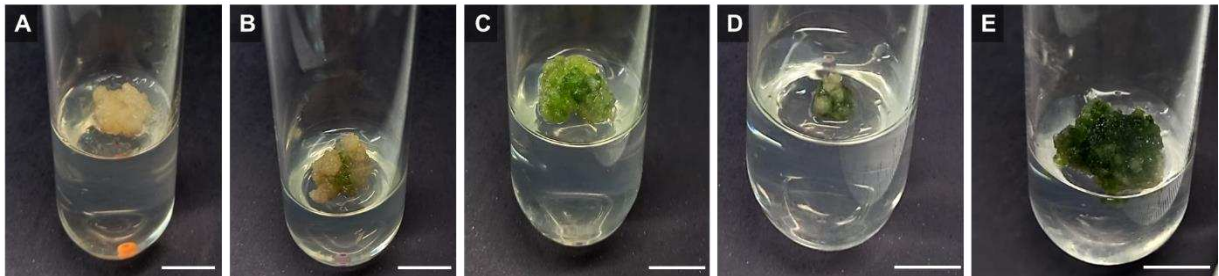
O estresse térmico é utilizado para estimular os micrósporos a passarem da via gametofítica para a esporofítica (DONG *et al.*, 2016). A aplicação de pré-tratamento térmico, tem sido um fator essencial para aumentar a eficiência da androgênese em diferentes espécies (THRIVENE *et al.*, 2021; MINEYKINA *et al.*, 2021; THAKUR *et al.*, 2024). No presente estudo, na fase de indução de calos observa-se que o pré-tratamento térmico calor em estufa B.O.D. a 32 °C antes de inocular apresentou a menor porcentagem de formação de calos em ambas as variedades botânicas (TABELA 3). A aplicação do pré-tratamento calor antes da inoculação *in vitro* pode ter ocasionado o ressecamento dos grãos de pólen comprometendo a formação de calos.

- **Fase de maturação de calos**

Na fase de maturação, os calos foram avaliados quanto à coloração (FIGURA 8), ao tamanho (FIGURA 9) e à presença de pontuações (FIGURA 10). Observou-se que os calos

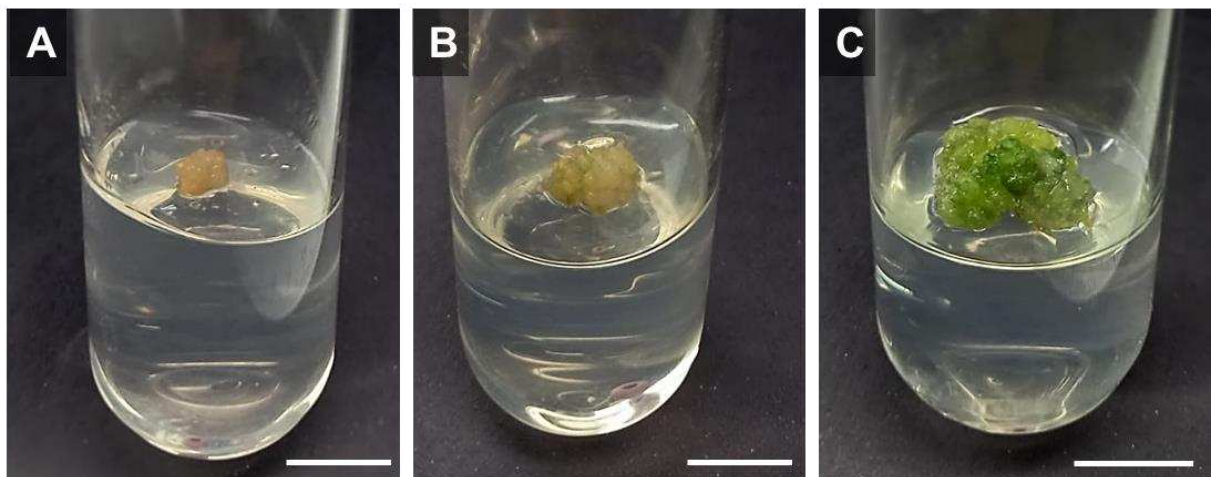
gerados a partir de anteras da variedade botânica *reticulatus*, eram predominantemente verdes claro ou verde escuros, e apresentavam tamanho grande (maior que 1,0cm). Enquanto os calos da variedade botânica *inodorus* eram em sua maioria beges e com tamanho médio (entre 0,5 e 1,0cm). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Costa (2019), no qual, foram observadas essas mesmas predominância de características ao avaliar os calos da dessas duas variedades botânicas.

Figura 8 – Variações nas cores observadas durante avaliação dos calos: A) bege; B) metade bege com metade verde claro; C) verde claro; e, D) metade verde claro com metade verde escuro; e, E) verde escuro. Barra = 1,0 cm.



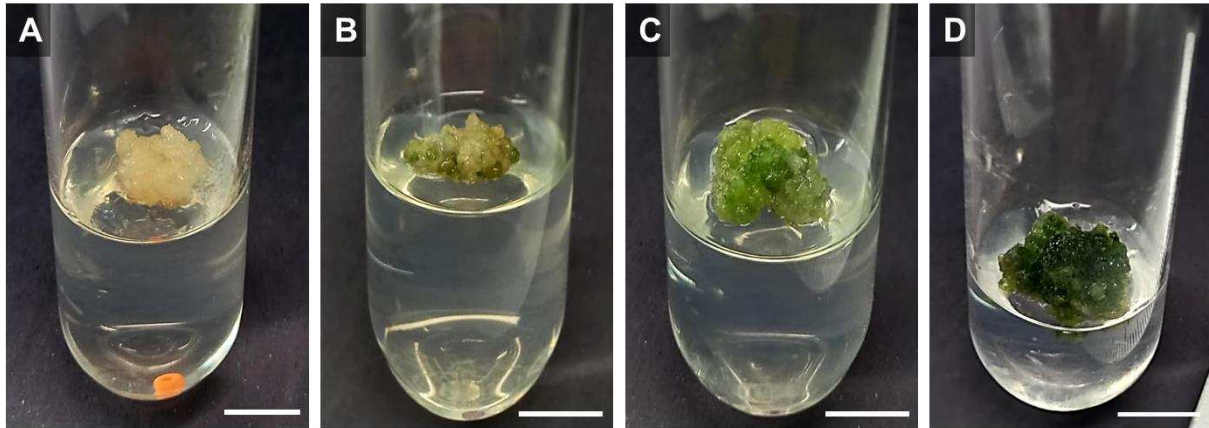
Fonte: Autor

Figura 9 – Classificação utilizada na avaliação do tamanho dos calos: A) pequeno (até 0,5cm de diâmetro); B) médio (de 0,5 cm até 1,0 cm de diâmetro); e, C) grande (maior que 1,0 cm de diâmetro). Barra = 1,0 cm.



Fonte: Autor

Figura 10 – Variações nas quantidades de pontuações observadas durante avaliação dos calos: A) nenhuma; B) pouca; C) intermediária; e, D) muita. Barra = 1,0 cm.



Fonte: Autor

Para *reticulatus*, observou-se que na variável cor do calo os pré-tratamentos controle e frio após inoculação *in vitro* apresentaram as maiores médias, não ocorrendo diferença estatística entre eles. Para variável tamanho do calo, a interação entre o meio A e os pré-tratamentos controle, calor após inoculação e frio após inoculação, apresentaram as melhores médias. Para ocorrência de pontuações, o uso do pré-tratamento frio após inocular e o cultivo no meio I apresentou a melhor média (TABELA 4).

Para *inodorus*, o pré-tratamento térmico calor após inocular apresentou as melhores médias nas variáveis cor e ocorrência de pontuações, em ambos os meios de cultivo. Para variável tamanho, o uso do pré-tratamento controle seguido do meio I apresentou a maior média (TABELA 4). O genótipo é um dos principais fatores para o sucesso da androgênese (GONZÁLEZ-CHAVIRA *et al.*, 2023). A ocorrência de genótipos dependentes é observada com frequência na androgênese, onde, dentro da mesma espécie alguns genótipos são responsivos e outros não, mesmo que submetidos as mesmas condições de cultivo *in vitro* (KOUAKOU *et al.*, 2015; DONG *et al.*, 2016; KURTAR *et al.*, 2016).

Tabela 4 – Médias apresentadas pelas variedades botânicas *reticulatus* e *inodorus* na fase de maturação de calos, para as variáveis cor, tamanho e presença de pontuações, aos 50 dias após a inoculação *in vitro* das anteras.

| Pré-tratamento térmico | Cor | | | Tamanho | | | Pontuações | | |
|---|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------|-------------------|-------------------|--------|
| | Meio ¹ | | Média ¹ | Meio | | Média | Meio | | Média |
| | A | B | | A | B | | A | B | |
| <i>Cucumis melo</i> var. <i>reticulatus</i> | | | | | | | | | |
| Controle | 3,83 ² | 3,39 | 3,66 a | 2,97 | 2,78 | 2,90 a | 3,28 | 2,96 | 3,15 b |
| Calor antes de inocular | 3,18 | 3,38 | 3,28 b | 2,45 | 2,10 | 2,28 b | 2,58 | 2,40 | 2,49 c |
| Calor após inocular | 3,00 | 2,82 | 2,91 b | 2,97 | 2,76 | 2,88 a | 3,28 | 2,61 | 2,97 b |
| Frio antes de inocular | 2,90 | 3,35 | 3,13 b | 2,52 | 2,04 | 2,28 b | 2,48 | 2,19 | 2,33 c |
| Frio após inocular | 3,41 | 3,45 | 3,43 a | 3,00 | 2,52 | 2,77 a | 3,81 | 2,97 | 3,41 a |
| Média ² | 3,23 ^a | 3,28 ^a | 3,25 | 2,76 ^a | 2,37 ^b | 2,58 | 3,03 ^a | 2,55 ^b | 2,80 |
| <i>Cucumis melo</i> var. <i>inodorus</i> | | | | | | | | | |
| Controle | 1,37 | 1,00 | 1,26 b | 2,53 | 2,25 | 2,44 a | 1,37 | 1,13 | 1,30 b |
| Calor antes de inocular | 1,17 | 1,00 | 1,08 b | 1,50 | 1,33 | 1,42 c | 1,17 | 1,33 | 1,25 b |
| Calor após inocular | 1,50 | 2,00 | 1,78 a | 2,50 | 1,60 | 2,00 b | 2,00 | 1,40 | 1,67 a |
| Frio antes de inocular | 1,28 | 1,15 | 1,21 b | 1,93 | 1,70 | 1,81 b | 1,10 | 1,13 | 1,11 b |
| Frio após inocular | 1,47 | 1,35 | 1,41 b | 1,84 | 1,65 | 1,75 b | 1,13 | 1,23 | 1,17 b |
| Média | 1,36 ^a | 1,24 ^a | 1,30 | 2,01 ^a | 1,70 ^b | 1,86 | 1,20 ^a | 1,19 ^a | 1,19 |

¹/Meio A = MS + 0,68 µM de BAP + 30,0 g.L⁻¹ de sacarose; Meio B = MS + 2,22 µM de BAP + 60,0 g.L⁻¹ de sacarose. ²/Médias seguidas da mesma letra, na coluna¹ ou na linha², não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

3.3.3 Experimento III – Cultivo *in vitro* de anteras

Com base nos resultados do experimento II, algumas alterações foram realizadas no experimento III. Os pré-tratamentos térmicos a frio e calor antes de inoculação *in vitro* foram excluídos do experimento III, pois no experimento II o pré-tratamento calor antes da inoculação apresentou as menores porcentagens na formação de calos em ambas as variedades botânicas, e o pré-tratamento a frio antes da inoculação não apresentou diferenças estatísticas quando comparado ao pré-tratamento a frio após a inoculação. Na fase de maturação de calos, o meio (B) MS + 2,22 µM de BAP + 60 g L⁻¹ de sacarose, não foi utilizado no experimento III por ter apresentado médias inferiores ao meio (A) MS + 0,68 µM de BAP + 30,0 g. L⁻¹ de sacarose de sacarose nas variáveis tamanho e pontuações do experimento II.

- **Fase de indução de calos**

A formação de calos ocorreu em todos os tratamentos nas duas variedades botânicas, confirmando a eficiência do meio MS + 1,0 µM de BAP + 2,0 µM de 2,4D (Kurtar *et al.*, 2016) observada no primeiro experimento. É possível observar também que os tratamentos térmicos de calor e frio após a inoculação *in vitro* não influenciaram a indução de calos em ambos os genótipos, apresentando porcentagens de formação de calos semelhantes ao tratamento controle (TABELA 5).

Tabela 5 – Porcentagem de calos formados, utilizando o meio de cultivo MS +1,0 µM de BAP + 2,0 µM de 2,4D em diferentes pré-tratamentos térmicos, aos 35 dias após a inoculação *in vitro*.

| Tratamento | Variedade botânica (<i>Cucumis melo</i>) | | Média |
|--------------------------|--|-----------------|-------|
| | <i>reticulatus</i> | <i>inodorus</i> | |
| Controle | 100 ¹ | 96 | 98 |
| Calor depois de inocular | 98 | 98 | 98 |
| Frio depois de inocular | 94 | 94 | 94 |
| Média | 97,3 | 96 | 96,7 |

¹/ Não houve efeito significativo para Tratamento nem para Variedade botânica.

- **Fase de maturação de calos**

O genótipo da variedade botânica *reticulatus* apresentou médias superiores ao *inodorus* para as três variáveis. Para o genótipo G5-4B, as variáveis cor e tamanho dos calos não apresentaram diferenças significativas quanto ao pré-tratamento térmico aplicado. Já para ocorrência de pontuações, os pré-tratamentos controle e frio apresentaram as maiores médias, não apresentando diferenças significativas entre eles (TABELA 6). Os resultados obtidos complementam e corroboram com o observado no experimento II, com base neles, pode-se indicar o pré-tratamento térmico frio, a 4 °C após inocular durante dois dias, para genótipos da variedade botânica *reticulatus*.

Tabela 6 – Características de calos das variedades botânicas *C. melo* var *reticulatus* (G5-4B) e *C. melo* var *inodorus* (EHMEL 200910) na fase de maturação, quanto a cor, tamanho e presença de pontuações.

| Tratamento | Cor | | | Tamanho | | | Pontuação | | |
|------------|---------------------|--------|-------|--------------|-------|-------|--------------|--------|-------|
| | EHMEL 200910 | G5-4B | Média | EHMEL 200910 | G5-4B | Média | EHMEL 200910 | G5-4B | Média |
| Controle | 1,00bB ¹ | 3,32aA | 2,16 | 2,52 | 3,00 | 2,76b | 1,04bB | 3,10aA | 2,07 |
| Calor | 1,18bB | 2,59aA | 1,89 | 2,67 | 3,00 | 2,84b | 1,06bB | 2,27bA | 1,66 |
| Frio | 1,06bB | 3,23aA | 2,15 | 2,55 | 3,00 | 2,78b | 1,17bB | 2,91aA | 2,04 |
| Média | 1,08 | 3,05 | 2,07 | 2,58b | 3,00a | 2,79 | 1,09 | 2,76 | 1,93 |

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

Para o genótipo EHMEL 200910 (variedade botânica *inodorus*), não houve diferença significativa entre as médias obtidas nos três pré-tratamentos térmicos para nenhuma das variáveis avaliadas (TABELA 6). Calos de coloração bege, de tamanho de diâmetro até 5,0 mm e sem ocorrência de pontuações foram predominantes, esses resultados diferem dos obtidos no experimento II para a variedade botânica *inodorus*.

Entre as variáveis avaliadas, a ocorrência de pontuações é um fator importante para induzir a regeneração da planta *in vitro* (SEGUÍ-SIMARRO, 2010). Segundo Werner *et al.*, (2009), as pontuações são massas pró-embriônicas encontradas na superfície ou dentro da massa do calo.

Após 35 dias do início da fase de maturação, os calos de todos os pré-tratamentos térmicos nos dois genótipos foram avaliados para identificar os que apresentavam pontuações protuberantes (FIGURA 7A). Na variedade botânica *inodorus* (linhagem EHMEL 200910), não foram identificados calos com pontuações

Para o *reticulatus* (linhagem G5-4B) foram selecionados pelo menos dez calos de cada tratamento térmico que apresentavam pontuações proeminentes. As pontuações desses calos foram excisadas e inoculadas em dois diferentes meios de cultivo MS + 4 mg L⁻¹ de BAP + 0,05 mg L⁻¹ de ANA + 30g L⁻¹ de sacarose; e MS + 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,05 mg L⁻¹ de ANA + 30g L⁻¹ de sacarose) seguindo o protocolo de Kurtar *et al.* (2016) para induzir o

desenvolvimento do embrião e parte aérea. Observou-se que essas pontuações cresceram transformando-se em calos com coloração variando entre verde clara e bege, mas não ocorreu o desenvolvimento do embrião e parte aérea.

O desenvolvimento dos embriões e a posterior regeneração das plantas, são influenciados por fatores e condições que ocorrem ao longo de todo o experimento, como o genótipo utilizado, o meio de cultivo de cada fase, os pré-tratamentos térmicos e a fase de desenvolvimento dos micrósporos das anteras quando inoculados (KURTAR *et al.*, 2016).

3.4 Conclusão

Para indução de calos a partir de anteras de meloeiro, o uso do meio de cultivo MS + 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de 2,4D + 30 g L⁻¹ de sacarose foi eficiente para os genótipos utilizados nos experimentos II e III, das variedades botânicas *reticulatus* e *inodorus*.

Na fase de maturação de calos, para *reticulatus*, nos experimentos II e III, o pré-tratamento frio após a inoculação *in vitro* das anteras, foi eficiente quando combinado com o meio de maturação A.

No experimento II, para o híbrido comercial Grand Prix (variedade botânica *inodorus*) a interação entre o pré-tratamento calor antes de inocular e o meio A resultou nas maiores médias.

No experimento III, para o genótipo EHMEL 200910 (variedade botânica *inodorus*), não houve diferença entre os pré-tratamentos utilizados. Neste experimento todas as médias do genótipo *reticulatus* foram superiores ao *inodorus*.

Os resultados dos experimentos confirmam que em meloeiro a androgêneses a partir de anteras é genótipo-dependente.

4 CAPÍTULO II – OBTENÇÃO DE PLANTAS HAPLOIDES DE MELOEIRO POR MEIO DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS

RESUMO

A dihaploidização é uma técnica importante para os programas de melhoramento genético vegetal, pois permite que linhagens com alto grau de homozigose sejam obtidas em menor tempo e com custo reduzido. A técnica consiste no desenvolvimento de indivíduos haploides para posterior indução da duplicação do número de cromossomos. Várias técnicas são utilizadas para a obtenção de plantas haploides, entre elas, o cruzamento interespecífico destaca-se pela simplicidade na execução e o baixo custo, sendo eficiente em diversas espécies. Para desenvolver ou aprimorar protocolos para obtenção de plantas haploides é importante analisar todos os fatores que afetam o êxito da técnica. Para o cruzamento interespecífico é necessário identificar a espécie mais adequada como doadora de pólen, capaz de induzir a formação de embriões haploides, além de estabelecer as condições *in vitro* ideais para a fase de resgate de embrião. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de sementes haploides de meloeiro por meio do cruzamento interespecífico entre o meloeiro e quatro espécies de cucurbitáceas diferentes. Para o experimento foi utilizada a linhagem de meloeiro G5-4B (variedade botânica *reticulatus*), e como cucurbitáceas doadoras de pólen foram utilizadas: pepino (*Cucumis sativus*), maxixe (*Cucumis anguria* L.), abobrinha (*Cucurbita pepo*) e melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*). Em todas as polinizações buscou-se garantir que todo o estigma tricarpelar fosse coberto com os grãos de pólen da espécie doadora. A viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada por meio realização de polinizações controle, em todas as cucurbitáceas doadoras e nos meloeiros. Após três tentativas de polinização, não ocorrendo o pegamento do fruto, as polinizações seguintes foram realizadas misturando os grãos de pólen da cucurbitácea doadora com os grãos de pólen da própria planta de melão. Os frutos formados foram colhidos entre 21 e 24 dias após a polinização e levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais para o procedimento de resgate dos embriões. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliado o percentual de frutos formados com e sem a mistura de grãos de pólen em razão do número de flores polinizadas. Também foi avaliado o percentual de frutos que apresentam sementes haploides. Os cruzamentos realizados utilizando somente o pólen das cucurbitáceas doadoras não geraram nenhum fruto. Porém, a viabilidade dos grãos de pólen foi confirmada pelos cruzamentos controles. Com a mistura de pólen ocorreu o pegamento de fruto nos cruzamentos com todas as espécies doadoras. As sementes de todos os

frutos gerados foram analisadas individualmente, porém, não foram identificadas sementes com embriões com características haploides em nenhum dos cruzamentos.

Palavras-chave: *Cucumis melo*; cucurbitáceas; cruzamentos interepéticos; haploidização.

ABSTRACT

Dihaploidization is an important technique for plant genetic improvement programs, as it allows lines with a high degree of homozygosity to be obtained in a shorter time and at a reduced cost. The technique consists of developing haploid individuals for subsequent induction of the doubling of the number of chromosomes. Several techniques are used to obtain haploid plants, among them, interspecific crossing stands out for its simplicity in execution and low cost, being efficient in several species. To develop or improve protocols for obtaining haploid plants, it is important to analyze all the factors that affect the success of the technique. For interspecific crossing, it is necessary to identify the most suitable species as a pollen donor, capable of inducing the formation of haploid embryos, in addition to establishing the ideal *in vitro* conditions for the embryo rescue phase. Therefore, the objective of this work was to evaluate the production of haploid melon seeds through interspecific crossing between the melon tree and four different cucurbit species. For the experiment, the melon line G5-4B (botanical variety *reticulatus*) was used, and the following cucurbits were used as pollen donors: cucumber (*Cucumis sativus*), gherkin (*Cucumis anguria* L.), zucchini (*Cucurbita pepo*) and melon. -são-caetano (*Momordica charantia*). In all pollinations, we sought to ensure that the entire tricarpelar stigma was covered with pollen grains from the donor species. The viability of pollen grains was evaluated by carrying out control pollinations in all sweet cucurbits and melon trees. After three pollination attempts, with no fruit setting, the following pollinations were carried out by mixing pollen grains from the donor cucurbit with pollen grains from the melon plant itself. The fruits formed were harvested between 21 and 24 days after pollination and taken to the Plant Tissue Culture Laboratory for the embryo rescue procedure. A completely randomized design was used, evaluating the percentage of fruits formed with and without the mixture of pollen grains in proportion to the number of pollinated flowers. The percentage of fruits with haploid seeds was also evaluated. Crosses carried out using only pollen from donor cucurbits did not generate any fruit. However, the viability of pollen grains was confirmed by control crosses. With the mixture of pollen, fruit set occurred in crosses with all donor species. The seeds of all the fruits generated were analyzed individually, however, no seeds with embryos with haploid characteristics were identified in any of the crosses.

Keywords: *Cucumis melo*; cucurbits; interespecific crosses; haploidization.

4.1 Introdução

O melão (*Cucumis melo* L.), é uma hortaliça de importância comercial mundial, pertencente à família Cucurbitaceae (KOMALA e KUNI, 2022). No Brasil, a produção de melão em 2022 foi de aproximadamente 700 mil toneladas cultivadas em 27,457 hectares (IBGE, 2023). Observa-se que nos plantios comerciais da cultura existe a predominância do uso híbridos F₁. Essa preferência é atribuída às características apresentadas por essas cultivares, como alta produtividade, qualidade do fruto, resistência a pragas e doenças e uniformidade na colheita (NUNES *et al.*, 2016; ARAGÃO *et al.*, 2019).

O híbrido F₁ é resultado do cruzamento entre duas linhagens que apresentam alto grau de homozigose. Contudo, a obtenção de linhagens puras por meio de técnicas tradicionais de melhoramento é considerada uma etapa demorada e onerosa para os programas de melhoramento genético de diversas espécies, visto que, são necessários vários ciclos de autofecundação para obter as linhagens, e mesmo assim não se alcança 100% de homozigose (BAKTEMUR *et al.*, 2013). Uma alternativa para reduzir o tempo e custo para se obter linhagens puras é por meio do uso de dihaploides.

A técnica consiste no desenvolvimento de indivíduos haploides para posterior indução da duplicação do número de cromossomos (CHEN *et al.*, 2014). Dentre as técnicas utilizadas para a obtenção de plantas haploides, o cruzamento interespecífico destaca-se como uma técnica simples e de baixo custo (OLIVEIRA, 2019). A técnica consiste na fertilização da espécie da qual se deseja obter o haploide a partir do pólen de outra espécie. A planta polinizada é emasculada (caso a flor seja hermafrodita) para em seguida receber o pólen e, posteriormente faz-se o resgate dos embriões das sementes imaturas (FRITSCHÉ-NETO *et al.*, 2013; WATTS *et al.*, 2018).

Para a cultura do meloeiro, são poucos os relatos na literatura sobre o uso da técnica, principalmente com a finalidade de produzir plantas haploides. No trabalho realizado por Dumas de Vaultx (1979), ao cruzar plantas de meloeiro com *Cucumis ficifolius* obteve-se plantas haploides de meloeiro, porém com uma taxa inferior a 0,3%. No estudo conduzido por Oliveira (2019), ao induzir a formação de plantas haploides de meloeiro por meio de cruzamentos interespecíficos com dez espécies diferentes de cucurbitáceas, foi observado que o cruzamento com abobrinha (*Cucurbita pepo*) resultou em sementes com características típicas de haploides, porém, com uma baixa taxa de produção dessas sementes.

Desta forma, no intuito de desenvolver ou aprimorar protocolos para obtenção de plantas haploides é importante estudar todos os fatores que afetam o sucesso da técnica. Para o cruzamento interespecífico é necessário identificar a espécie adequada como doadora de pólen, e estabelecer as condições *in vitro* ideais para a fase de resgate de embrião (REN *et al.*, 2017). Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de sementes haploides de meloeiro por meio do cruzamento interespecífico entre o meloeiro e quatro espécies de cucurbitáceas diferentes.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado na casa de vegetação do laboratório de Melhoramento e Recursos Genéticos Vegetais, localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza/CE, no período de abril a agosto de 2023. A casa de vegetação tem cobertura de filme plástico e revestimentos laterais de tela, assim, a luminosidade e a temperatura dentro da casa de vegetação são altas ao longo do dia.

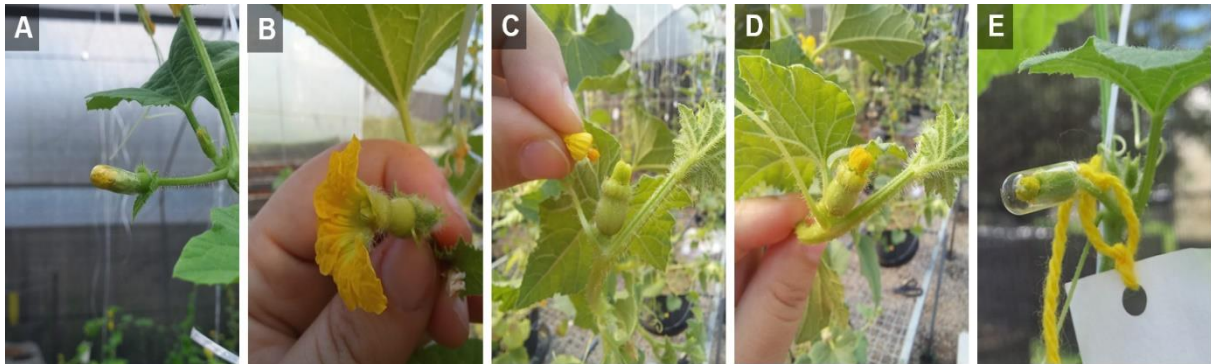
No trabalho de Oliveira (2019), sementes de meloeiro com característica haploide foram obtidas por meio do cruzamento entre meloeiro da variedade botânica *reticulatus* e abobrinha (*Cucurbita pepo*). Com isto, nesse experimento foi utilizado um genótipo pertencente a variedade botânica *reticulatus*. A linhagem G5-4B foi selecionada devido a disponibilidade das sementes na coleção de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Meloeiro da Embrapa. Como cucurbitáceas doadoras de pólen foram utilizadas: pepino (*Cucumis sativus*), maxixe (*Cucumis anguria* L.), abobrinha (*Cucurbita pepo*) adquiridas na Isla Sementes ®, e o melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) obtido por meio de coleta realizada em Alto do Rodrigues/RN. O semeio foi realizado em bandejas de 200 células, preenchidas com uma mistura de pó de fibra de coco e substrato comercial na proporção 1:1, as quais foram mantidas no escuro por 48 horas e, posteriormente levadas à casa de vegetação. Antes do semeio do melão-de-são-caetano foi necessário realizar a escarificação física das sementes.

Doze dias após da sementeira, as mudas de todas as espécies cultivadas (com pelo menos uma folha verdadeira) foram transplantadas para vasos de polietileno de 5 litros contendo areia. O espaçamento utilizado na casa de vegetação foi de 0,4 m entre vasos e 0,8 m entre linha. O tutoramento das plantas foi conduzido por meio de fitilhos. E as capinas dentro dos vasos realizadas manualmente sempre que necessário. As plantas receberam fertirrigação diariamente, sendo fornecidas as quantidades de água e nutrientes adequados para cada fase de desenvolvimento (SOUZA, 2004). O controle fitossanitário foi realizado para Mosca-branca (*Bemisia tabaci*) sempre que necessário.

Em pré-antese as flores femininas de melão e as flores masculinas das cucurbitáceas doadoras foram encapsuladas com cápsulas de gelatina nº 0, a fim de evitar contaminação com pólen indesejado. O número de flores masculinas utilizadas para polinizar uma flor feminina de meloeiro variou de acordo com a espécie doadora de pólen, buscou-se em todos os cruzamentos

garantir que todo o estigma tricarpelar fosse coberto com os grãos de pólen da espécie doadora (FIGURA 11).

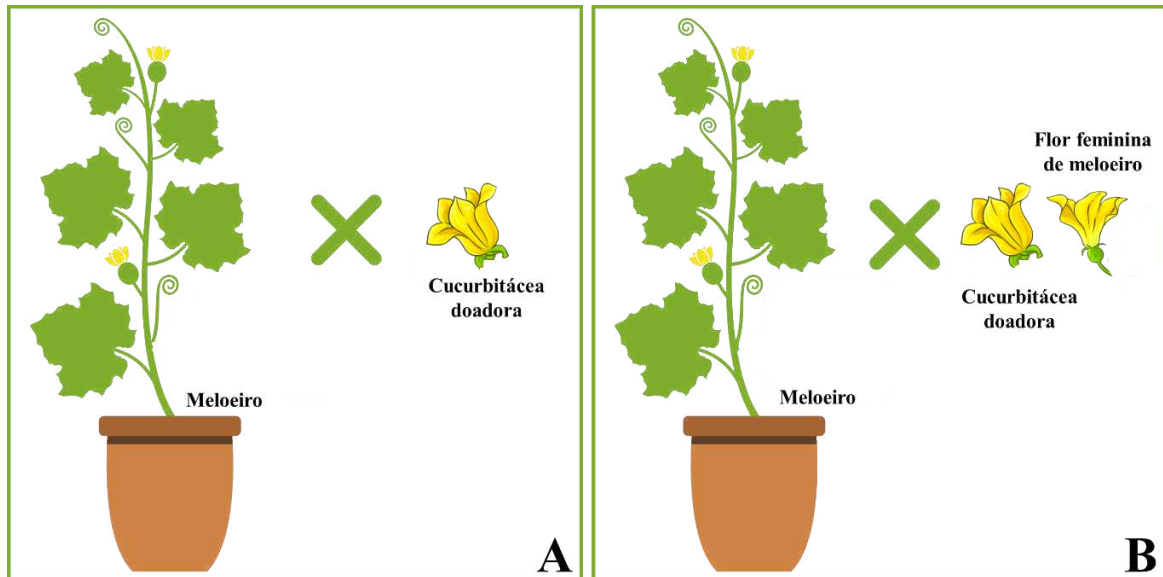
Figura 11 – Polinização em meloeiro com pólen da cucurbitácea doadora: A) Flor feminina do meloeiro em antese protegida com cápsula de gelatina; B) Retirada das pétalas da flor feminina; C) Polinização da flor feminina de meloeiro com o pólen da flor masculina de melão-de-são-caetano; D) Estigma polinizado; E) Flor após a polinização, protegida com cápsula de gelatina e identificada.



Fonte: Autor

A viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada por meio das polinizações controle, onde algumas plantas das cucurbitáceas doadoras e dos meloeiros foram autofecundadas. Nos cruzamentos interespecíficos, após três tentativas consecutivas de polinização com o pólen da cucurbitácea doadora na mesma planta de meloeiro, não ocorrendo o pegamento do fruto, as polinizações seguintes foram realizadas misturando os grãos de pólen da cucurbitácea doadora com os grãos de pólen da própria planta de meloeiro (FIGURA 12). Os frutos formados foram colhidos entre 21 e 24 dias após a polinização, de acordo com o trabalho de Oliveira (2019), e levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza/CE, para o procedimento de resgate dos embriões. Os frutos foram lavados com água corrente e sabão neutro, e secados com papel toalha, para retirar resíduos sólidos na superfície. Posteriormente, os frutos foram levados para capela de fluxo laminar, colocados em bandejas de alumínio e desinfestados em álcool etílico 96% utilizando o método *dry burning* (DAL *et al.*, 2016).

Figura 12. Cruzamentos interespecíficos. A – Cruzamento entre a flor feminina do meloeiro e a flor masculina da cucurbitácea doadora (sem a mistura de grãos de pólen), foram realizadas três tentativas de polinização por plantas. B - Cruzamento entre a flor feminina do meloeiro e a flor masculina da cucurbitácea doadora e do meloeiro.



Fonte: Autor

Os frutos foram cortados com o auxílio de uma faca e as sementes colocadas em placa de Petri autoclavada, sendo as analisadas individualmente com o auxílio do microscópio estereoscópico e luz fluorescente. Cada semente foi aberta e avaliada quanto ao formato do embrião. Segundo Dal *et al.* (2016), embriões haploides normalmente apresentam formato característico (de coração), o que facilita sua identificação.

Nos cruzamentos, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo avaliado o percentual de frutos formados com e sem a mistura de grãos de pólen em razão do número de flores polinizadas. Também foi avaliado o percentual de frutos que apresentam sementes possivelmente haploides.

4.3 Resultados e Discussão

Todos os cruzamentos controles foram capazes de gerar frutos com sementes (FIGURA 13), comprovando a viabilidade do pólen das cucurbitáceas utilizadas neste estudo. Assim como, as plantas de meloeiro que foram autofecundas, produziram frutos com sementes, comprovando a viabilidade dos óvulos. Contudo, nos cruzamentos interespecíficos (FIGURA

14A) houve somente a formação de fruto sem sementes haploides (FIGURA 14B) ou os frutos não vingaram (FIGURA 14C). No total foram realizados 147 cruzamentos utilizando somente o pólen das cucurbitáceas doadoras (TABELA 7).

Figura 13 – Frutos controles para comprovar a viabilidade do pólen das cucurbitáceas: A) pepino (*Cucumis sativus*); B) maxixe (*Cucumis anguria* L.); C) abobrinha (*Cucurbita pepo*); D) melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*).



Fonte: Autor

Figura 14 – Cruzamentos interespecíficos: A) dois dias após a polinização; B) fruto formado sem semente haploide; C) fruto que não vingou.



Fonte: Autor

Tabela 7 – Número de cruzamentos interespecíficos realizados entre a linhagem de meloeiro Gália G5-4B e quatro espécies de cucurbitáceas, considerando o número de flores polinizadas, o número de flores fertilizadas e o número de frutos gerados.

| Receptor | Cruzamentos | | Nº de flores polinizadas | Nº de frutos |
|----------------|-------------|---|--------------------------|--------------|
| | | Doador | | |
| Linhagem G5-4B | | Pepino (<i>Cucumis sativus</i>) | 37 | 0 |
| | | Maxixe (<i>Cucumis anguria</i> L.) | 31 | 0 |
| | | Abobrinha (<i>Cucurbita pepo</i>) | 40 | 0 |
| | | Melão-de-são-caetano (<i>Momordica charantia</i>) | 39 | 0 |
| | | Total | 147 | 0 |

No trabalho realizado por Oliveira (2019), foram testadas dez espécies diferentes de cucurbitáceas nos cruzamentos interespecíficos com meloeiro para obtenção de plantas haploides, observou-se que abobrinha e melão-de-são-caetano foram capaz de estimular a formação do fruto, e que somente o cruzamento entre o genótipo da variedade botânica *reticulatus* e a abobrinha resultaram em sementes aparentemente haploides.

Apesar da variedade botânica *reticulatus* ser utilizada neste trabalho e no de Oliveira (2019), os genótipos utilizados são diferentes, o que pode ter influenciado na não formação de frutos neste experimento. Outro fator que pode ter influenciado na polinização e pegamento dos frutos são as condições de temperaturas dentro da casa de vegetação durante o experimento.

Embora cruzamentos interespecíficos sejam utilizados com frequência entre algumas espécies de cucurbitáceas para hibridização e apresentam resultados positivos na etapa de cruzamento e formação de frutos (HOLDSWORTH *et al.*, 2016; URETSKY e LOY, 2017; KUAR *et al.*, 2023). Vários fatores podem ter influenciado na não formação de frutos nos cruzamentos interespecíficos. Entre eles, as condições ambientais, como as altas temperaturas durante o processo de polinização podem causar o ressecamento do pólen, dificultando assim o desenvolvimento do fruto (CERQUEIRA-SILVA *et al.* 2014; OCAMPO *et al.*, 2016). Outras

possíveis causas para a inconsistência ou incompatibilidade dos cruzamentos interespecíficos são as barreiras pré e pós-fertilização (BRANDVAIN e HAIG, 2005; KUAR *et al.*, 2021).

As barreiras pré-fertilização incluem fatores como a baixa viabilidade do pólen da espécie doadora, falha na germinação do pólen e variações nos comprimentos do tubo polínico entre as espécies (KUAR *et al.*, 2021; KUAR *et al.*, 2023), neste estudo, a viabilidade do pólen das plantas doadoras foi comprovada por meio das polinizações controle.

A morfologia dos grãos de pólen varia em formas e tamanhos entre as espécies da família das cucurbitáceas, essa variação pode resultar em uma menor concentração de pólen da espécie doadora na superfície do estigma da flor feminina do meloeiro, contribuindo para a não formação de frutos (OLIVEIRA, 2019). Já as barreiras pós-fertilização incluem a degeneração do embrião ou do endosperma (BRANDVAIN e HAIG, 2005; KUAR *et al.*, 2021; KUAR *et al.*, 2023).

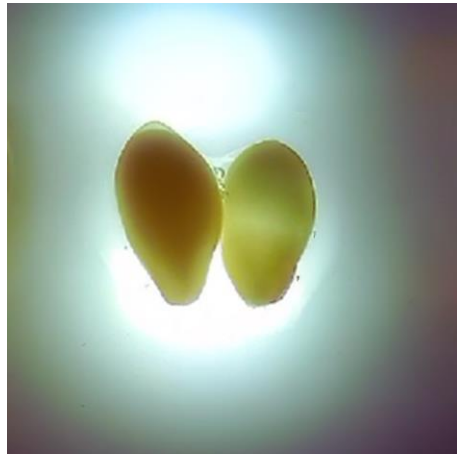
Desta forma, constatou-se que com polinização utilizando somente o pólen das cucurbitáceas doadoras, não ocorreu o pegamento do fruto. Entretanto, com a mistura de pólen ocorreu o pegamento de fruto (FIGURAS 14A e 14B) nos cruzamentos com todas as espécies doadoras. A relação entre o número de flores polinizadas e o número de frutos obtidos variou entre 31 e 40% (TABELA 8).

Tabela 8 – Número de cruzamentos interespecíficos realizados entre a linhagem de meloeiro Gália ‘G5-4B’ e quatro espécies de cucurbitáceas, com mistura dos grãos de pólen, e a relação em porcentagem entre o número de flores polinizadas e o número de frutos obtidos.

| Cruzamentos | | Nº de flores polinizadas | Nº de frutos | % |
|----------------|------------------------------|--------------------------|--------------|----|
| Receptor | Doador | | | |
| Linhagem G5-4B | G5-4B e Pepino | 13 | 4 | 31 |
| | G5-4B e Maxixe | 15 | 6 | 40 |
| | G5-4B e Abobrinha | 24 | 8 | 33 |
| | G5-4B e Melão-de-são-caetano | 17 | 6 | 35 |
| Total | | 69 | 24 | |

As sementes de todos os frutos gerados foram analisadas individualmente, no entanto, não foram identificadas sementes com embriões com características haploides em nenhum dos cruzamentos, sendo identificado somente sementes sem embrião e sementes completamente formadas (Figura 15). Segundo Dal *et al.* (2016), embriões haploides geralmente apresentam o formato de coração (Figura 16).

Figura 15 – Semente completamente formada (esquerda), e semente sem embrião (direita).



Fonte: Autor

Figura 16 – Sementes com embriões haploides de meloeiro.



Fonte: Oliveira, (2019) (esquerda) e Del *et al.* (2016) (direita).

A não formação de sementes com embriões haploides, pode estar relacionada à incompatibilidade cromossômica e aos diferentes níveis de ploidia das espécies utilizadas nos

cruzamentos (SAXENA *et al.*, 2015; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; MILC *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018) (Tabela 9).

Tabela 9 – Número de cromossomos das cinco espécies de cucurbitáceas ($2n = 2x$) utilizadas nos cruzamentos interespecíficos.

| Nome comum | Espécie | Número de Cromossomos |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|
| Melão | <i>Cucumis melo</i> | 24 |
| Pepino | <i>Cucumis sativus</i> | 14 |
| Maxixe | <i>Cucumis anguria</i> L. | 24 |
| Abobrinha | <i>Cucurbita pepo</i> | 40 |
| Melão-de-são-caetano | <i>Momordica charantia</i> | 22 |

Além dos resultados obtidos por Oliveiro (2019), onde o cruzamento de meloeiro (*Cucumis melo*) com abobrinha (*Cucurbita pepo*) resultou em sementes haploides, há relato na literatura da obtenção de plantas haploides de meloeiro por meio do cruzamento com a espécie selvagem *Cucumis ficifolius* ($2n = 48$), contudo, a taxa de plantas haploides identificadas foi baixa, menor que 0,3% (DUMAS DE VAULX, 1979).

4.4 Conclusão

Os cruzamentos interespecíficos realizados sem a mistura dos grãos de pólen da cucurbitácea doadora com pólen da própria planta de meloeiro, não foram capazes de produzir frutos.

Os cruzamentos realizados com a mistura dos grãos de pólen da cucurbitácea doadora com o da própria planta de meloeiro, induziram a formação de frutos, mas não foram geradas sementes haploides.

5 CONCLUSÃO GERAL

Para indução de calos a partir da inoculação *in vitro* de anteras de meloeiro, recomenda-se o uso do meio MS + 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de 2,4D.

Os resultados observados nos dois experimentos realizados com o cultivo *in vitro* de anteras confirmam que em meloeiro a indução de calogênese é genótipo-dependente.

Mais estudos são recomendados para estabelecer as condições adequadas para o cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos de meloeiro, tais como: inoculação *in vitro* de explantes que apresentem micrósporos em estádios vacuolados ou grãos de pólen em estágio precoce bicelular; aplicação de choque térmico (calor e frio) como pré-tratamento térmico; análise das estruturas globulares pró-embriogênicas (pontuações) por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura ou de Transmissão, para determinar o estágio de desenvolvimento dos calos obtidos.

Nos cruzamentos interespecíficos, as quatro espécies de cucurbitáceas utilizadas como doadora de pólen foram capazes de induzir o desenvolvimento de fruto somente quando ocorreu a mistura com os grãos de pólen da própria planta de meloeiro. Entretanto, não geraram sementes haploides.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, N.; EL-RAMADY, H.; SELIEM, M. K.; EL-MAHROUK, M. E.; TAHA, N.; BAYOUMI, Y.; SHALABY, T. A.; DOBRÁNSZKI, J. An academic and technical view on the challenges of plant micropropagation. **Horticulturae, Switzerland**, [s.l.], v. 8, n. 677, p. 1-28, 2022. DOI: 10.3390/horticulturae8080677.
- 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, n. 3, p. 571-579, 2016.
- ABDOLLAHI, M. R.; DARBANDI, M.; HAMIDVAND, Y.; MAJDI, M. The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.). **Brazilian Journal Botany**, [s.l.], v. 38, p. 447-456, 2015. DOI: 10.1007/s40415-015-0152-z.
- ABDOLLAHI, M. R.; RASHIDI, S. Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, [s.l.], v. 133, n. 1, p. 39-49, 2018.
- AHMADI, B.; EBRAHIMZADEH, H. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 39, p. 299-316, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02509-z>.
- ALVES, D. F.; ALENCAR, M. O.; JUSTO, W. R.; LIMA JUNIOR, F. do Ó. A relevância da produção de melão na economia do Nordeste. In: VI Simpósio em Economia Rural SIMPOER 2018, 2018, Fortaleza. **Anais do VI Simpósio em Economia Rural - SIMPOER 2018**, 2018.
- AMIRIAN, R.; HOJATI, Z.; AZADI, P. Male flower induction significantly affects androgenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 95, n. 2 p. 183-191, 2019. DOI: 10.1080/14620316.2019.1655488.
- ARAGÃO, F.A.S.; CELIN, E.F.; SILVA, J.C.V.; NUNES, G.H.S.; QUEIRÓZ, M.A. Melhoramento genético e biotecnologia no meloeiro. In: GUIMARÃES, M. A.; ARAGÃO, F.A.S. (org.). **Produção de Melão**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2019, p. 63-82.
- ASADI, A.; SEGUÍ-SIMARRO, J.M. Production of Doubled Haploid Plants in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Through Anther Culture. **Methods Molecular Biology**. [s.l.], v. 2289, p. 71-85, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1331-3_4.
- ASADI, A.; ZEBARJADI, A.; ABDOLLAHI, M.R. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**. [s.l.], v. 214, n. 216, p. 1-17, 2018. DOI: 10.1007/s10681-018-2297-x.
- AZEVEDO, T. C.; GUIMARÃES, F. F. M.; TRINDADE, R. dos S.; LANA, U. G. D. P.; SOUZA, I. R. P. Comparison of protocols for chromosome duplication in haploid maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [s.l.], v. 22, p. 1-8, 2023. DOI: 10.18512/rbms2023v22e1311
- BAGHERI, L.; LOTFI, M.; NORI, M. Production of haploid embryos and plants in Iranian melon (*Cucumis melo* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. **Mutation**

- breeding, genetic diversity and crop adaptation to climate change.** [s.l.], v. 1, p. 127-133, 2021. DOI: 10.1079/9781789249095.0013.
- BAKTEMUR, G.; KELES, D.; KARA, E.; YILDIZ, S.; TASKIN, H. Effects of genotype and nutrient medium on obtaining haploid plants through ovary culture in cucumber. **Molecular Biology Reports.** [s.l.], v. 49, n. 6, p. 5451–5458, 2022. DOI: 10.1007/s11033-022-07238-y.
- 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, p. 1-8, 2013. DOI: 10.1155/2013/529502.
- 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, n. 3, p. 318–327, 2014. DOI: 10.3906/biy-1309-5.
- BELICUAS, P. R. **Obtenção, identificação e caracterização de haploides androgenéticos em milho.** 2004. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2004.
- BHATTACHARYA, A.; PALAN, B.; CHAR, B. An insight into wheat haploid production using wheat × maize wide hybridization. **Journal of Applied Biology Biotechnology**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 44–47, 2015.
- BILYNSKA, O. V. Influence of spike pretreatment at low temperatures on efficiency of spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. **Problems of Cryobiology and Cryomedicine**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 68–76, 2020. DOI: 10.15407/cryo30.01.068.
- BORÉM, A.; MIRANDA, V. G. **Melhoramento de espécies cultivadas.** 6 ed. Viçosa: UFV, 2013.
- BRAUNER, P.C.; SCHIPPRACK, W.; UTZ, H.F.; BAUER, E.; MAYER, M.; SCHÖN, C.C.; MELCHINGER, A.E. Testcross performance of doubled haploid lines from European flint maize landraces are promising for broadening the genetic base of elite germplasm. **Theor Appl. Genet**, [s.l.], v. 132, p. 1897–1908, 2019.
- BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Hibridação em maracujá. *In*: BORÉM, A. (ed). **Hibridação artificial de plantas.** Viçosa: Editora UFV, 1999, p. 379-399.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, p. 87-132.
- CALLOHUARI, Y. **Cultivo de anteras *in vitro* para la producción de individuos haploides de maíz (*Zea mays* L.).** 2013, 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, 2013.
- CARVALHO, M. de J. da S.; GOMES, V.B.; SOUZA, A. da S.; AUD, F.F.; SANTOS-SEREJO, J.A.; OLIVEIRA, E.J. Inducing autotetraploids in cassava using oryzalin and colchicine and their *in vitro* morphophysiological effects. **Genetics and molecular research: GMR**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 1-14, 2016.

- CAVALCANTE NETO, J. G.; FERREIRA, K. T. C.; ARAGÃO, F. A. S.; ANTÔNIO, R. P.; NUNES, G. H. S. Potential of parents and hybrids experimental of the yellow melon. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 50, n.2, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1590/0103-8478cr20190452
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.; ONILDO, N.J.; SANTOS, E.S.L.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 1422–1452, 2014. DOI:10.3390/ijms150814122.
- CHEN, J.F.; CUI, L.; MALIK, A.A.; MBIRA, K.G. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s.l.], v. 104, n. 3, p. 311-319, 2011.
- COSTA, L. A. de S. **Primeira lista de plantas tropicais propostas como padrões de referência para estimativa de tamanho do genoma por citometria de fluxo**. 2018, 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- COSTA, W.L.C. **Pré-tratamentos térmicos e meios de cultivos na calogênese de anteras de meloeiro**. 2019. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- COUTO, E.G.O.; VON PINHO, E.V.R.; VON PINHO, R.G.; VEIGA, A.D.; BUSTAMANTE, F.P.; DIAS, K.O.G. *In vivo* haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Agricultural Sciences**, Lavras, v. 39, n. 5, p. 435-442, 2015. DOI: 10.1590/S1413-70542015000500002
- CRISÓSTOMO, JR; ARAGÃO, FAS. Melhoramento genético do meloeiro. In: VIDAL NETO, FC; CAVALCANTI, JJV (org.). **O melhoramento genético de plantas no Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2014, p. 209-245.
- DAL, B.; SARI, N.; SOLMAZ, I. Effect of different irradiation sources and doses on haploid embryo induction in Altinbas (*Cucumis melo* var. *inodorus*) melons. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 552-559, 2016. DOI: 10.3906/tar-1511-27.
- DIOGENES NETO, H.N. **Cultivo *in vitro* de anteras de três variedades botânicas de meloeiro**. 2019. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, [s.l.], v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- DOMBLIDES, E.; SHMYKOVA, N.; KHIMICH, G.; KOROTSEVA, I.; KAN, L.; DOMBLIDES, A.; PIVOVAROV, V.; SOLDATENKO, A. Production of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family crops through unpollinated ovule culture *in vitro*. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 1294, p. 19-28, 2020. DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1294.4.
- 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, 2016. DOI: 10.1007/s00299-016-2018-7.
- 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**, [s.l.], v. 289, p. 875-878, 1979.

- DWIVEDI, S.; BRITT, A.; TRIPATHI, L.; SHARMA, S.; UPADHYAYA, H.; ORTIZ, R. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 33, n.1, p. 812–829, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001.
- EBRAHIMZADEH, H., SOLTANLOO, H., SHARIATPANAH, M.E. ET AL. Improved chromosome doubling of parthenogenetic haploid plants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) Using colchicine, trifluralin, and oryzalin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 135, p. 407–417, 2018.
- EBRAHIMZADEH, H.; LOTFI, M.; SADAT-HOSSEINI, M. Parthenogenetic Haploid Plant Production in Styrian Pumpkin by Gamma Irradiated Pollen. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 305-314, 2021. DOI: 10.22059/ijhst.2021.294838.331.
- EECKHAUT, T. **Ploidy breeding and interspecific hybridization in Spathiphyllum and woody ornamentals**. 2003. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas Aplicadas), Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Gent, Bélgica, 2003.
- ELIBY, S.; BEKKUZHINA, S.; KISHCHENKO, O.; ISKAKOVA, G.; KYLYSHBAYEVA, G.; JATAYEV, S.; SOOLE, K.; LANGRIDGE, P.; BORISJUK, N.; SHAVRUKOV, Y. Developments and prospects for doubled haploid wheat, **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 60, p. 1-7, 2022. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108007.
- ESTEVEZ, P.; CLERMONT, I.; MARCHAND, S.; BELZILE, F. Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 33, p.871–879, 2014.
- FAO. **Faostat – Statistics Database**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 22 de setembro de 2023.
- FENG, H.; WANG, M.L.; CONG, R.C.; DAI, S.L. Colchicinen and trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa multiflora* Thunb. var. *inermis* and *Rosa roxburghii* f. *normalis*. **The Journal of Horticultural Science Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n.3, p. 1–9, 2017.
- FERRIE, A. Doubled Haploid Production in Higher Plants. In: Thomas, B.; Murray, B.G.; Murphy, D.J. (ed.). **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. [s.l.]: Elsevier, 2017, p.147-151.
- FORSBERG, R.A.; SMITH, R.R. Sources, maintenance, and utilization of parental material. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. (ed.). **Hybridization of Crop Plants**. American Society of Agronomy e Crop Science Society of America, 1980, p.65-81.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. 1ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D.D.; BORÉM, A. Duplo-haplóides. In: Fritsche-Neto, R.; Borém, A. (ed.). **Bioteχνologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa: Produção Independente, 2014, p. 267-302.
- GAŁAZKA, J.; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. **Folia Horticulturae**, [s.l.], v. 25, p. 67-78, 2013. DOI: 10.2478/fhort-2013-0008.

- 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.
- GARCIA-MAS, J.; BENJAK, A.; SANSEVERINO, W.; *et al.* The genome of melon (*Cucumis melo* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 109, n.29, p. 11872-11877, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1205415109
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. Plant tissue culture procedure – Background. *In*: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. (ed.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Reino Unido: Springer Dordrecht, 2008, p. 1-28.
- GERMANA, M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v.104, n.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.], 11, p. 495- 497, 2012.
- GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.M.; GUERRERO-AGUILAR, B.Z.; PONS-HERNÁNDEZ, J.L.; ESCOBEDO-LANDÍN, M.Á.; GARCÍA-REYNA, J.F.; MORA-AVILÉS, M.A. Inducción de embriones androgénicos y regeneración de plantas haploides en genotipos experimentales de chile poblano a través de cultivo de anteras. **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, [s.l.], v.14, n.2, p. 277-287, 2023. DOI:10.29312/remexca.v14i2.3054.
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetics and Genome Research**, [s.l.], v.120, p.339-350, 2008. DOI: 10.1159/000121083.
- 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. DOI: 10.1590/1678-4324-2021180505.
- HAN, Y.; GU, Y.; ZHANG, A. C.; LO, Y. H. Review: imaging technologies for flow cytometry. **Lab on a Chip**, [s.l.], v. 16, n. 24, p. 4639-4647, 2016. DOI: 10.1039/c6lc01063f.
- HOLDSWORTH, W. L.; LAPLANT, K. E.; BELL, D. C.; JAHN, M. M.; MAZOUREK, M. Cultivar-based introgression mapping reveals wild species-derived Pm-0, the major powdery mildew resistance locus in squash. **Plos One**, [s.l.], v.11, n. 12, p. 1–20, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0167715.
- HOOGHVORST, I.; TORRICO, O.; HOOGHVORST, S.; NOGUÉS, S. *In situ* Parthenogenetic Doubled Haploid Production in Melon “*Piel de Sapo*” for Breeding Purposes. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 11, p.1-12, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00378.
- HOWARD, A.; PELC, S. R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, [s.l.], v. 49, n. 2, p. 207-2018, 1986. DOI: 10.1080/09553008514552501.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA**. Disponível em < <http://www.sidra.ibge.gov.br> >. Acesso em 22 de setembro de 2023.

- ISHII, T.; KARIMI-ASHTIYANI, R.; HOUBEN, A. Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 421-438, 2016. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114714.
- IVANOVA, Z. Obtaining of melon plant-regenerants via pollination with irradiated pollen. **Science, Technology, Innovation e Business**, [s.l.], v.28, p. 11-17, 2020.
- KAUR, B.; GARCHA, K. S.; CHAHAL, G. K.; DHATT, A. S. Study on pre-fertilization barriers in the interspecific hybridization between *Cucurbita pepo* L. and *C. moschata* Duchesne. **Agricultural Research Journal**, [s.l.], v. 58, p. 594–602, 2021. DOI: 10.5958/2395-146X.2021.00084.3.
- KAUR, B.; GARCHA, K.S.; SANDHU, J.S.; SHARMA, M.; DHATT, A. S. Interspecific hybridization for transfer of hull-less seed trait from *Cucurbita pepo* to *C. moschata*. **Scientific Reports**, [s.l.], v.13, n.4627, p. 1-13, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29935-9>.
- KAUR, H.A.; SHARMA, S.P.; KAUR, N.; KALIA, A. Gynogenic response of musk melon genotypes to temperature and MS medium supplements. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v.1255, p. 13-18, 2019. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1255.3.
- KIILL, L. H. P.; RIBEIRO, M. F.; SIQUEIRA, K. M. M. de; SILVA, E. M. S. **Plano de manejo de polinizadores do meloeiro**. 1 ed. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido (Serie Documentos - Embrapa), 2015.
- KIRKBRIDE, J.H. Biosystematics monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): botanical Identification of Cucumbers and Melons. **US Department of Agriculture**. Boone: Parkway Publishers., p. 325-326, 1993.
- 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. DOI: 10.9734/BBJ/2013/5417.
- KOMALA, M.; KUNI, P. Genetic Diversity and Molecular Breeding of Melon (*Cucumis melo* L.): A review. **Current Agriculture Research Journal**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 181-192, 2022.
- KOŠMRLJ, K.; KASTELEC, D.; BOHANEK, B. Styrian oil pumpkin pollen germinability at higher irradiation doses: Optimization of the *in vitro* germination protocol and irradiation procedure. **Turkish Journal of Biology**, [s.l.], v. 38, n. 4, p. 516–522, 2014. DOI: 10.3906/biy-1402- 58.
- 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, n. 4, p. 1779–1789, 2015. DOI: 10.4314/ijbcs.v9i4.4.
- KUMAR, H.G.A.; MURTHY, H.N. Effect of Sugars and Amino Acids on Androgenesis of *Cucumis sativus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 78, n. 3, p. 201–208, 2004. DOI: 10.1023/B:TICU.0000025637.56693.68.
- KUMAR, H.G.A.; RAVISHANKAR, B.V.; MURTHY, H.N. The Influence of Polyamines on Androgenesis of *Cucumis sativus* L. **European Journal Horticultural Science**, [s.l.], v. 69, n. 5, p. 201–205, 2004.

- KURTAR, E. S.; BALKAYA, A. KANDEMİR, D. Screening for Salinity Tolerance in Developed Winter Squash (*Cucurbita maxima*) and Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Lines. **Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 83-195, 2016b.
- KURTAR, E. S.; BALKAYA, A.; KANDEMİR, D. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 127, n. 2, p. 497–511, 2016a. DOI: 10.1007/s11240-016-1074-6.
- LANTOS, C.; BÓNÁ, L.; NAGY, É. *et al.* Induction of *in vitro* androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, [s.l.], v. 133, p. 385–393, 2018. DOI: 10.1007/s11240-018-1391-z
- 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. DOI: 10.1007/s10535-012-0269-x.
- 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 Research**, [s.l.], v. 150, p. 150-155, 2016.
- 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. DOI: 10.1139/gen-2017-0235
- LONG, Y.; YANG, Y.; PAN, G.; SHEN, Y. New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 13, p. 1-15, 2022. doi: 10.3389/fpls.2022.926752
- LOPES, L.S. **Cultivo *in vitro* de anteras de meloeiro**. 2019. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- 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. DOI: 10.17221/47/2010-HORTSCI.
- MCCREIGHT, J.D.; NERSON, H.; GRUMET, R. Melon, *Cucumis melo* L. In: KALLOS, G.; BERGH, B.O. (ed.) **Genetic improvement of vegetable crops**. New York: Pergamon Press, 1993, p. 295-296.
- 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.
- MINEYKINA, A., BONDAREVA, L., SOLDATENKO, A., DOMBLIDES, E. Androgenesis of red cabbage in isolated microspore culture *in vitro*. **Plants**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 1-16, 2021. DOI: 10.3390/plants10091950
- 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 22 de setembro de 2023.

- MOHAMED, M.F.; REFAEI, E.F.S. Enhanced haploids regeneration in anther culture of summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, [s.l.], v. 27, p. 57–60, 2004.
- MORTATE, R.K.; ARAÚJO, M.M.; LIMA, M.W.P.; BINOTTI, F.F.S. Resposta de mudas de pimentão submetidas à diferentes reguladores vegetais via foliar. **Ciência & Tecnologia**, Jaboticabal, v. 10, n. 1, p. 57–64, 2018.
- 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. In: ABDURAKHMONOV, I. Y. (ed.). **Plant Breeding**. Rijeka: InTech, 2012, p.87-106.
- NEE, M. Cucurbitaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.M.; HEALD, S.V. (ed.). **Flowering plants of the neotropics**. New Jersey: Princeton University Press, 2004, p. 56-68.
- NGUYEN, M.L.; HUYEN, T.N.B.T.; TRINH, D.M.; VORONINA, A.V. Association of bud and anther morphology with developmental stages of the male gametophyte of melon (*Cucumis melo* L.). **Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii**. [s.l.], v. 26, n. 2, p. 146-152, 2022. DOI: 10.18699/VJGB-22-18.
- NAZIAN, M.; HARIATPANAH, M.E. *In vitro* based doubled haploid production: recent improvements. **Euphytica**, [s.l.], v. 216, n. 69, p. 1-21, 2020.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, [s.l.], v. 163, p. 85–87, 1969.
- 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. (ed.). **Melhoramento de Hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 331-363.
- OCAMPO, J.; ARIAS, J.C.; URREA, R. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. **Euphytica**, [s.l.], v. 209, p. 395–408, 2016. DOI:10.1007/s10681-016-1647-9
- OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 27, n. 77, p. 185–200, 2013. DOI: 10.1590/S0103-40142013000100014
- OLIVEIRA, F. I. C. **Estabelecimento *in vitro*, calogênese e cruzamentos interespecíficos visando obtenção de haploides em meloeiro**, 2018. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- OLIVEIRA, F. I. C.; NUNES, A.C.; SILVA, F.D.; SILVA, G.T.M.; ARAGÃO, F.A.S. A cultura do melão. In: FIGUEIRÊDO, M. C. B. de; GONDIM, R. S.; ARAGÃO, F. A. S. (ed.). **Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017, p. 17-32.
- OSOLNIK, B.; BOHANEK, B.; JELASKA, S. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) anthers by low temperature and anther dissection. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 32, p. 241–246, 1993. DOI: 10.1007/BF00029849.

- PATIAL, M.; PAL, D.; THAKUR, A.; BANA, R. S.; PATIAL, S. Doubled Haploidy Techniques in Wheat (*Triticum aestivum* L.): An Overview. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 89, p. 27–41, 2019. DOI: 10.1007/s40011-017-0870-z
- PELLICER, J.; LEITCH, I. J. The Application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. **Methods in molecular Biology**, [s.l.], v. 1115, p. 279–307, 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-767-9_14
- PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; TIMBO, A. L. O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.7, p. 1278-1285, 2012.
- PERPIÑÁ, G.; ESTERAS, C.; GIBON, Y.; MONFORTE, A. J.; PICÓ, B. A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits. **BMC Plant Biology**, [s.l.], v.16, n. 154, p. 1-21, 2016. DOI: 10.1186/s12870-016-0842-0
- PITRAT, M. Phenotypic diversity in wild and cultivated melons (*Cucumis melo*). **Plant Biotechnology**, [s.l.], v. 30, p. 273-278, 2013.
- PLAPUNG, P.; KHAMSUKDEE, S.; POTAPOHN, N.; SMITAMANA, P. Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, [s.l.], v.9, n.3, p.261-269, 2014. DOI: 10.3844/ajabssp.2014.261.269
- RAKHA, M. T.; METWALLY, E. I.; MOUSTAFA, S. A.; ETMAN, A. A.; DEWIR, Y. H. Evaluation of regenerated strains from six “Cucurbita” interspecific hybrids obtained through anther and ovule *in vitro* cultures. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 6, n.1, p. 23-30, 2012.
- REN, J.; WU, P.; TRAMPE, B.; TIAN, X.; LÜBERSTEDT, T.; CHEN, S. Novel technologies in doubled haploid line development. **Plant Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 11, p. 1361-1370, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12805
- RODRIGUES, F. A. **Antimitóticos na indução de tetraploides em bananeira**, 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- SAUTON, A.; DUMAS DE VAULX, R. Doubled haploid production in melon (*Cucumis melo* L.). In: Proceedings of Eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding, **Book of Abstracts**, Avignon Monfavet, France, 1988, p. 119-128.
- SAUTON, A.; DUMAS DE VAULX, R. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenese induite par du pollen irradié. **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.

- SCAGLIUSI, S. M. Establishing isolated microspore culture to produce doubled haploid plants in Brazilian wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 8, n. 6, 887–894, 2014.
- 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.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Androgenesis Revisited. **The Botanical Review**, [s.l.], v. 76, p. 377–404, 2010. DOI: 10.1007/s12229-010-9056-6
- SHALABY, T. A. Embryogenesis and plantlets regeneration from anther culture of squash plants (*Cucurbita pepo* L.) as affected by different genotypes. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 173–183, 2006. DOI: 10.1016/S0304-4238(03)00003-7.
- SHEIKH, S.; NOH, J.; SEONG, M. H.; JUNG, G. T.; KIM, J. M.; JU, H.; HUH, Y. C. Phenotypic markers for tetraploid watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] following parental exposure to colchicine in T0 generation. **Horticulture Environment Biotechnology**, [s.l.], v.54, n. 6, p. 524-530, 2013.
- SILVA, C. M. de J. **Indução de calos em anteras e poliploidia em genótipos de melancia**, 2018. 96f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.
- SMITH, R. H. Haploid Plants from Anther Culture. **Plant Tissue Culture**, [s.l.], p. 103–112, 213. DOI: 10.1016/B978-0-12-415920-4.00009-8.
- SONG, H.; LOU, Q. F.; LUO, X. D.; WOLUKAU, J. N.; DIAO, W. P.; QIAN, C. T.; CHEN, J. F. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 90, p. 245-254, 2007.
- SOUZA, V. S. **Avaliação da concentração da solução nutritiva no cultivo de tomate, pepino, pimentão, berinjela em pó de coco**, 2004. 100f. Dissertação (Mestrado em Solos Nutrição de plantas), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- SUPRUNOVA, T.; SHMYKOVA, N. *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. **Agricultural and Food Sciences**, [s.l.], p. 371-374, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- THAKUR, P., KUMARI, N., KUMAR, A., SHARMA, P.; CHADHA, S. Recent advances in development and utilization of double haploids (DHs) in economically important vegetable crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v.156, n.15, 2024. DOI: 10.1007/s11240-023-02617-0
- THRIVENI, V.; SHARMA, D.; JHA, Z. The effects of cold preculture and heat shock treatment on the *in vitro* androgenesis of brinjal (*Solanum melongena* L.). **The Pharma Innovation Journal**, [s.l.], v.10, n.3, p. 449-452, 2021.
- TOMÉ, L. G. O.; SILVA, A. B.; PINTO, C. A. B. P.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, D. S.; CARVALHO, C. R. Colchicine and oryzalin effects on tetraploid induction and leaf anatomy of *Solanum commersonii* ssp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 11, p.1973-1979, 2016.

- TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. The microspore: a haploid multipurpose cell. **Advances in Botanical Research**, [s.l.], v. 35, 53–109, 2001. DOI: 10.1016/S0065-2296(01)35004-8
- URETSKY, J.; LOY, J. B. Evaluation of morphological traits associated with productivity in F1 interspecific (*Cucurbita maxima* Duch. x *C. moschata* Duch.) hybrid processing squash. **HortScience**, [s.l.], v. 52, n. 9, p.1156-1163, 2017. DOI: 10.21273/HORTSCI12018-17
- USMAN, M.; BAKHSH, K.; FATIMA, B.; ZAMAN, Q.; SHAH, M. H. Exploring embryogenic competence in anthers of bitter melon (*Momordica charantia* L.) cultivar Faisalabad long. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, [s.l.], v. 25, n.1, p. 181-188, 2015.
- WANG, G. F.; QIN, H. Y.; SUN, D.; FAN, S. T.; YANG, Y. M.; WANG, Z. X.; XU, P. L.; ZHAO, Y.; LIU, Y. X.; AI, J. Haploid plant regeneration from hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* Planch.) anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 134, n. 1, p. 15–28, 2018. DOI: 10.1007/s11240-018-1396-7.
- WARCZÓŁ, M.; CZYCYŁO-MYSZA, I.; MARCINSKA, I.; DZIURKA, K.; NOGA, A.; KAPŁONIAK, K.; PILIPOWICZ, M.; SKRZYPEK, E. Factors inducing regeneration response in oat (*Avena sativa* L.) anther culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, [s.l.], v. 55, n. 5, p. 595–604, 2019. DOI: 10.1007/s11627-019-09987-1.
- WATTS, A.; KUMAR, V.; RAIPURIA, R. K.; BHATTACHARYA, R. C. *In Vivo* Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges. **Plant Molecular Biology Reporter**, [s.l.], v. 36, n. 5, p. 685–694, 2018. DOI: 10.1007/s11105-018-1132-9.
- WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. de A. Controle da calogênese de pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.
- XIE, M.; QIN, L. Y.; PAN, J. S.; HE, H. L.; WU, A. Z.; CAI, R. Flower morphogenesis and microspore development versus anther culture of cucumber. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.1096–1100, 2005.
- ZARGAR, M.; ZAVARYKINA, T.; VORONOV, S.; PRONINA, I.; BAYAT, M. The Recent Development in Technologies for Attaining Doubled Haploid Plants *in vivo*. **Agriculture**, [s.l.], v. 12, n.10, p. 1-21, 2022.
- ZHAO, G.; LIAN, Q.; ZHANG, Z. *et al.* A comprehensive genome variation map of melon identifies multiple domestication events and loci influencing agronomic traits. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 51, p. 1607–1615, 2019. DOI:10.1038/s41588-019-0522-8
- ZHU, Y. C.; SUN, D. X.; DENG, Y.; LI, W. H.; AN, G. L.; LI, Y. Y.; SI, J. W.; LIU, J. L. Effects of medium addition on ovule enlargement of watermelon non-pollinated ovary. **International Journal of Agriculture and Biology**, [s.l.], v. 20, n.10, p. 2312–2318, 2018. DOI: 10.17957/IJAB/15.0783.
- Zou, T.; Su, H. N.; Wu, Q.; Sun, X. W. Haploid induction via unfertilized ovary culture in watermelon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v.135, n. 2, p. 179–187, 2018. DOI: 10.1007/s11240-018-1454-1.

ZUR, I.; DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; JANOWIAK, F. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 6, p. 1-10, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00424.