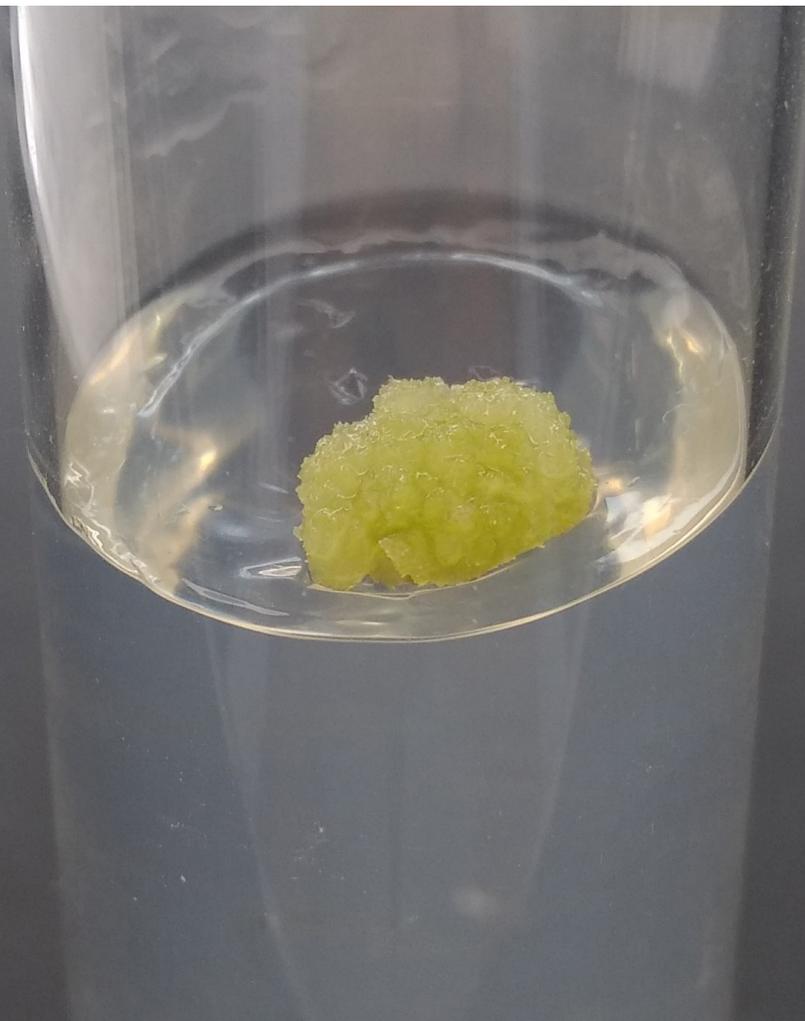




Calogênese in vitro em Óvulos de Três Variedades de Meloeiro



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
227**

**Calogênese in vitro em Óvulos de
Três Variedades de Meloeiro**

Alexya Vitoria Felix Carvalho
Frederico Inácio Costa de Oliveira
Maria Izabel Gallão
Fernando Antonio Souza de Aragão
Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (85) 3391-7100

Fax: (85) 3391-7109

www.embrapa.br/agroindustria-tropical

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente

Antônio Genésio Vasconcelos Neto

Secretária-executiva

Celli Rodrigues Muniz

Secretária-administrativa

Eveline de Castro Menezes

Membros

Afrânio Arley Teles Montenegro, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Christiana de Fátima Bruce da Silva, Francisco Nelsieudes Sombra Oliveira, José Roberto Vieira Júnior, Laura Maria Bruno, Roselayne Ferro Furtado, Sandra Maria Morais Rodrigues

Revisão de texto

José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica

Rita de Cassia Costa Cid

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa

Alexya Vitoria Felix Carvalho

1ª edição

On-line (2022)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Calogênese in vitro em óvulos de três variedades de meloeiro / Alexya Vitoria Felix Carvalho... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2022.

26 p. : il. ; 16 cm x 22 cm – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 227).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. *Cucumis melo*. 2. Ginogênese. 3. Cultura de tecidos vegetais. I. Carvalho, Alexya Vitoria Felix. II. Oliveira, Frederico Inácio Costa de. III. Gallão, Maria Izabel. IV. Aragão, Fernando Antonio Souza de. V. Carvalho, Ana Cristina Portugal Pinto de. VI. Série.

CDD 635.611

Rita de Cassia Costa Cid (CRB-3/624)

© Embrapa, 2022

Sumário

Resumo.....	4
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão.....	13
Conclusões.....	22
Agradecimentos.....	22
Referências.....	22

Calogênese in vitro em Óvulos de Três Variedades de Meloeiro

Alexya Vitoria Felix Carvalho¹

Frederico Inácio Costa de Oliveira²

Maria Izabel Gallão³

Fernando Antonio Souza de Aragão⁴

Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho⁵

Resumo - O desenvolvimento de linhagens homozigotas é um desafio nos programas de melhoramento de meloeiro. A ginogênese in vitro apresenta-se como alternativa para produção de linhagens haploides e di-haploides. O objetivo deste trabalho foi a indução de calos e organogênese em óvulos de meloeiro. Óvulos das variedades *inodorus*, *cantalupensis* e *reticulatus* foram inoculados em meio de cultivo MS contendo 1,0 μM de BAP e 2,0 μM de ANA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Aos 60 dias, foi avaliada a porcentagem de óvulos que formaram calos. Calos de *inodorus* e *cantalupensis* foram transferidos para meio MS contendo diferentes concentrações de BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66; e 8,88 μM) para organogênese. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5. Aos 60 dias, foi avaliada a porcentagem de calos que regeneraram parte aérea. Foram efetuados estudos histológicos nos ovários e óvulos, antes do cultivo in vitro, e nas fases de calogênese e organogênese. A variedade *inodorus* foi a mais responsiva, ratificando que a resposta

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE

³ Bióloga, doutora em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), Fortaleza, CE

⁵ Bióloga, doutora em Genética, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), Fortaleza, CE

à calogênese, em meloeiro, é genótipo-dependente. Não foi observada formação de parte aérea nos calos de *cantalupensis* e *inodorus*. As análises histológicas indicaram que os óvulos desenvolvem-se de maneira diferente nas três variedades de meloeiro.

Termos para indexação: *Cucumis melo* L., ginogênese, cultura de tecidos vegetais.

In vitro Callogenesis in Ovules of Three Melon Varieties

Abstract - The development of homozygous lines is a challenge to melon breeding programs. In vitro gynogenesis is seen as an alternative for the production of haploid and di-haploid lines. The aim of this study was the induction of calli and organogenesis in ovules of the melon. Ovules of the *inodorus*, *cantalupensis* and *reticulatus* varieties were inoculated in MS culture medium containing 1.0 μM BAP and 2.0 μM ANA. The experimental design was completely randomised. The percentage of ovules with formed calli was evaluated after 60 days. Calli from *inodorus* and *cantalupensis* were transferred to MS medium containing different concentrations of BAP (0, 2.22, 4.44, 6.66 and 8.88 μM) for organogenesis. The experimental design was completely randomized in a 2 x 5 factorial scheme. After 60 days, the percentage of calli showing regenerated shoots was evaluated. Histological studies were carried out on the ovaries and ovules before the in vitro culture, and during the phases of callogenesis and organogenesis. The *inodorus* variety was the most responsive, confirming that the response to callogenesis in the melon is genotype dependent. No shoot formation was observed in the calli of *cantalupensis* or *inodorus*. The histological analysis showed that ovules develop differently in the three melon varieties.

Index terms: *Cucumis melo* L., gynogenesis, plant tissue culture.

Introdução

A família Cucurbitaceae inclui diversas espécies de grande valor econômico, dentre elas o meloeiro (*Cucumis melo* L.). O melão é uma hortaliça de expressiva relevância mundial, atingindo, em 2019, uma produção aproximada de 27,5 milhões de toneladas em mais de 1,04 milhão de hectares colhidos. China, Turquia, Índia, Cazaquistão e Irã foram os cinco países maiores produtores, respondendo a um valor em torno de 67% do total produzido (FAO, 2021). O Brasil ocupou a 12ª posição, representando menos de 2% da produção mundial. Em 2019, foram colhidas mais de 588 mil toneladas em cerca de 22 mil hectares (FAO, 2021). A região Nordeste contribui com mais de 90% da produção nacional, com destaque para os estados do Ceará e Rio Grande do Norte (Dias, 2020).

Segundo a classificação taxonômica, a espécie *Cucumis melo* L. foi dividida em dezesseis variedades botânicas (Pitrat et al., 2000). Entretanto, grande parte dos genótipos produzidos comercialmente no Brasil pertence a apenas três variedades botânicas: *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin; *C. melo* var. *cantalupensis*, Naudin e *C. melo* var. *reticulatus* Seringe (Oliveira, 2018).

Cultivares comerciais de meloeiro são, em sua maioria, híbridos F₁. Esses híbridos são obtidos a partir do cruzamento entre parentais com alto grau de homozigose, isto é, linhagens puras, cujo valor é inestimável para os programas de melhoramento genético (Dong et al., 2016). Entretanto, por meio das técnicas convencionais de melhoramento de plantas, a geração de linhagens puras requer tempo e recursos significativos, devido às rodadas sucessivas de autofecundação e retrocruzamentos (Yashiro et al., 2002), podendo esse processo durar de 7 a 9 anos (Fritsche-Neto et al., 2014). De acordo com Oliveira (2018), em locais onde a cultura do meloeiro só avança um ciclo por ano, esse processo pode durar mais de 10 anos. Além disso, mesmo após os sucessivos avanços nas gerações, não é possível obter materiais 100% homozigotos (Baktemur et al., 2013; Fritsche-Neto et al., 2014).

Sendo assim, as técnicas biotecnológicas são alternativas viáveis em comparação aos métodos convencionais de melhoramento para obtenção de linhagens puras em várias espécies (Dunwell, 2010). Segundo Dong et al.

(2016), especificamente para as espécies da família Cucurbitaceae, têm sido empregadas três diferentes técnicas visando à obtenção de plantas haploides e di-haploides (DHs): partenogênese in situ (induzida principalmente pela polinização com pólen irradiado), ginogênese in vitro (por meio do cultivo in vitro de óvulos e ovários) e androgênese in vitro (por meio do cultivo in vitro de micrósporos e anteras). Esses autores enfatizam que o desenvolvimento dessas técnicas de cultivo in vitro para a produção de haploides, em cucurbitáceas, representa um avanço notável e recente.

Nos programas de melhoramento, as linhagens di-haploides (DHs) são geralmente utilizadas como novas cultivares ou como linhagens parentais (progenitores) puras para a produção de híbridos F_1 comerciais (Gonzalo et al., 2011; Hooghvorst et al., 2020; Rojas Casado, 2020). As linhagens DHs permitem aumentar a proporção de genótipos homozigotos com alelos recessivos, melhor utilização da variabilidade genética, por meio da anulação dos efeitos de dominância e epistasia, assim como a identificação de mutantes e a eliminação de genes letais (Fritsche-Neto et al., 2014).

Na obtenção de plantas DHs, dois passos principais devem ser considerados: a indução do desenvolvimento de haploides e a posterior duplicação dos cromossomos desses indivíduos haploides (Seguí-Simarro; Nuez, 2008). A probabilidade de plantas haploides serem geradas in vivo sem que ocorra fusão dos gametas é muito baixa, variando de acordo com a espécie. Em meloeiro, a taxa varia em torno de 2% (Lotfi et al., 2003). Entretanto, é possível obter in vitro linhagens haploides (completamente homozigotas) em um ano e depois proceder à duplicação do número cromossômico com uso de colchicina (Baktemur et al., 2013).

Tendo em vista que os estudos de Dryanovska e Ilieva (1983) e de Dryanovska (1985) para obtenção de plantas haploides, mediante o cultivo in vitro de anteras, não resultaram em sucesso, e que a partenogênese por meio da técnica de pólen irradiado requer uma fonte de irradiação, a ginogênese apresenta-se como uma opção viável para a produção de plantas haploides em meloeiro (Kaur et al., 2019).

A ginogênese é uma técnica de obtenção de plantas DHs baseada na produção de embriões a partir do gametófito feminino, desde que não tenha ocorrido o processo de fecundação (Forster et al., 2007).

A obtenção de plantas DHs por meio da técnica de ginogênese in vitro tem sido relatada para várias espécies da família Cucurbitaceae, tais como abóbora (Kurtar et al., 2018), melancia (Zou et al., 2018; 2020; Zhu et al., 2018), melão (Ficcadenti et al., 1999; Malik et al., 2011; Koli, Murthy, 2013; Kaur et al., 2019) e pepino (Tantasawat et al., 2015; Golabadi et al., 2017; Ozran et al., 2017; Sorntip et al., 2017; Deng et al., 2020).

Em meloeiro, a obtenção de plantas haploides e DHs, por meio da ginogênese, depende de vários fatores, tais como genótipo da planta doadora, pré-tratamento com temperatura e estágio de desenvolvimento do gametófito feminino, reguladores de crescimento e de outros componentes do meio de cultivo, além das condições de cultivo in vitro (Dong et al., 2016; Rojas Casado, 2020).

Tendo em vista que os estudos sobre a ginogênese in vitro são escassos no Brasil e que a obtenção de plantas haploides e DHs são de grande importância para os programas de melhoramento, o presente trabalho objetivou investigar as respostas do cultivo in vitro de óvulos de três diferentes variedades de meloeiro quanto à formação de calos e regeneração de plantas.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado em Fortaleza, Ceará, no período de março a agosto de 2018. Foram conduzidos dois experimentos, sendo um para cada uma das fases de indução de calogênese e de parte aérea.

Fase de indução de calogênese

Foram utilizados como explantes óvulos obtidos de flores (femininas e hermafroditas). Essas flores possuíam os ovários não polinizados e foram colhidas um dia antes da antese, de acordo com a metodologia utilizada por Koli e Murthy (2013) (Figura 1). Foram colhidas flores de três variedades botânicas de meloeiro: *Cucumis melo* var. *inodorus*, Jacquin; *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naudin; e *Cucumis melo* var. *reticulatus*, Seringe, cujas plantas doadoras foram cultivadas em casa de vegetação.



Figura 1. A) Flor feminina de meloeiro (*Cucumis melo* L.) da variedade botânica *cantalupensis* Naudin, com ovário não polinizado um dia antes da antese. B) Flor em corte longitudinal visualizada em microscópio estereoscópio (aumento 40 x). C) Detalhe do ovário em corte longitudinal contendo os óvulos. D) Detalhe do óvulo (utilizado como explante para o cultivo in vitro). Barra: A e B: 5,0 mm; C e D: 1,0 mm.

Em capela de fluxo laminar, as flores foram desinfestadas em solução de álcool 70% por 1 minuto, a seguir em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%) por 7,5 minutos e, posteriormente, em três enxágues com água destilada autoclavada, de 1 minuto cada. Os óvulos foram isolados dos ovários e inoculados in vitro, um de cada vez, com o auxílio de pinças e bisturis, sob microscópio estereoscópio Nova XTS - 30.

O meio de cultivo básico utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (Gelzan®) a 1,8 g L⁻¹, adicionado de 1,0 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,0 µM de ácido naftalenoacético (ANA), de acordo com o protocolo utilizado por Koli e Murthy (2013). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi

realizada a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio de cultivo foi distribuído em 20,0 mL por tubo de ensaio (150 mm x 25 mm).

Os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento, a 25 ± 1 °C, permanecendo no escuro por um período de sete dias para a fase de indução de calos, conforme descrito por Sorntip et al., 2017. Posteriormente, os explantes foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (cada tratamento consistiu em uma variedade botânica de meloeiro: *inodorus*, *cantalupensis* e *reticulatus*) e 15 repetições. Cada repetição foi constituída por 10 tubos de ensaio contendo dois explantes cada (totalizando 300 óvulos/tratamento). Aos 60 dias de cultivo in vitro, foi registrado o número de óvulos que desenvolveram calos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, efetuando-se, quando necessárias, as devidas transformações (Box-Cox). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, dentro de cada tratamento, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fase de indução de parte aérea

Para a fase de indução de parte aérea, foram utilizados como explantes os calos (de aproximadamente 10 mm de tamanho) formados a partir do cultivo in vitro dos óvulos, obtidos na fase anterior, para as variedades botânicas *inodorus* e *cantalupensis*. A variedade *reticulatus* não foi utilizada nessa fase devido à baixa taxa de formação de calos na fase anterior. Esses calos foram transferidos para os meios: T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μM de BAP; T3) MS + 4,44 μM de BAP; T4) MS + 6,66 μM de BAP; T5) MS + 8,88 μM de BAP para a regeneração de parte aérea. Esses meios de cultivo foram testados tendo como base o trabalho de Koli e Murty (2013). Após a esterilização, o meio de cultivo foi distribuído em 20,0 mL por tubo de ensaio (150 mm x 25 mm).

As culturas foram mantidas por 60 dias em sala de crescimento a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, sendo duas variedades botânicas,

cinco meios de cultivo e 10 repetições de cinco tubos de ensaio contendo um calo cada, totalizando 50 calos/tratamento/variedade.

Estudos histológicos

Os estudos histológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular Vegetal da Universidade Federal do Ceará, localizado em Fortaleza, Ceará, no período de junho a novembro de 2018. Esses estudos foram efetuados nos ovários e óvulos, antes do cultivo *in vitro*, e nas duas fases, tanto de indução de calos quanto de parte aérea.

Na fase de indução de calos, culturas *in vitro* de óvulos das variedades botânicas de meloeiro *inodorus*, *reticulatus* e *cantalupensis* foram coletadas aos 30 e 60 dias após a inoculação em meio de cultivo.

Já na fase de regeneração de parte aérea, culturas *in vitro* de calos das variedades *cantalupensis* e *inodorus* foram coletadas aos 30 e 60 dias após a inoculação em diferentes meios de cultivo.

As amostras (duas por tratamento), escolhidas aleatoriamente, foram fixadas em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato, pH 7,2) (Karnovsky, 1965) e permaneceram acondicionadas em geladeira até o processamento.

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

Resultados e Discussão

Fase de indução de calos

Houve diferença significativa para formação de calos entre as três variedades botânicas de meloeiro estudadas (Tabela 1). A variedade *inodorus* foi a mais responsiva, produzindo calos em 60,65% dos óvulos avaliados, diferindo estatisticamente das variedades *cantalupensis* (37,65%) e *reticulatus* (18,65%), que também apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 2). Ao utilizarem o mesmo meio de cultivo (MS adicionado de 1,0 μM de BAP + 2,0 μM de ANA) para o cultivo in vitro de óvulos da variedade *conomon* cv. Mudicode, Koli e Murthy (2013) obtiveram calogênese em 90,73% dos explantes, valor superior ao registrado para as três variedades estudadas.

Kaur et al. (2019) constataram que os genótipos 'MM Sel. 103' e 'MS-5', ambos da variedade *reticulatus*, apresentaram respostas diferentes para calogênese a partir do cultivo in vitro de óvulos, 24,6% e 48,7%, respectivamente, confirmando que a resposta à ginogênese in vitro é específica, mesmo entre genótipos da mesma variedade de meloeiro. No presente estudo, das três variedades estudadas, *reticulatus* foi a que apresentou as menores porcentagens de óvulos que formaram calos – 18,65% (Tabela 1).

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

Variedade botânica	IC (%) ¹
<i>Cucumis melo</i> var. <i>inodorus</i>	60,65 a
<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	37,65 b
<i>Cucumis melo</i> var. <i>reticulatus</i>	18,65 c
CV%	32,74

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

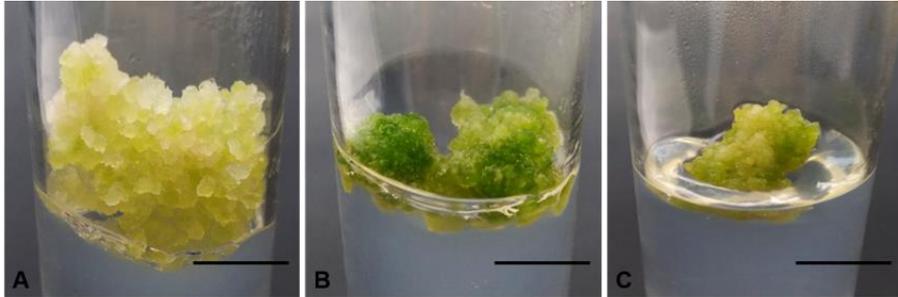


Figura 2. Calos obtidos a partir de óvulos de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.), aos 60 dias de cultivo in vitro em meio MS adicionado de 1,0 μ M de BAP + 2,0 μ M de ANA. A) *inodorus*; B) *cantalupensis*; e C) *reticulatus*. Barra: 10 mm.

Os resultados obtidos por Koli e Murthy (2013) e Kaur et al. (2019) corroboram os observados no presente estudo, em que cada variedade botânica de meloeiro se comportou de maneira específica na indução de calos a partir de óvulos. Segundo Dong et al. (2016), tal variação deve ser atribuída à influência do genótipo, e Bhojwani e Dantu (2013) afirmam que o genótipo da planta doadora é o principal fator determinante do sucesso da ginogênese in vitro. Essas observações ressaltam a necessidade do desenvolvimento de protocolos específicos para cada genótipo de meloeiro.

Além da influência do genótipo, o estágio de desenvolvimento do gametófito feminino é outro fator determinante relacionado à regeneração de plantas haploides e di-haploides na cultura de óvulos e ovários (Dong et al., 2016). No presente estudo, os óvulos foram excisados de ovários coletados de flores um dia antes da ocorrência da antese, de acordo com o protocolo de Koli e Murthy (2013) e Kaur et al. (2019). Entretanto, os óvulos utilizados por Ficcadenti et al. (1999) e Malik et al. (2011) foram obtidos de ovários colhidos no estágio de antese, quando as anteras continham os grãos de pólen binucleados. Além disso, esses óvulos foram inoculados por meio de secções de 1,0 a 2,0 mm do ovário, o que pode ter contribuído para a continuidade do desenvolvimento in vitro dos óvulos, tendo em vista que, quando cultivados in vitro, eles ainda permaneciam em contato com os tecidos do ovário.

Sob microscopia de luz, o corte histológico de segmento de ovário da variedade *reticulatus* Séringe indicou que os óvulos ainda apresentavam ligação com o tecido da placenta do ovário quando foram excisados para

o cultivo in vitro (Figura 3). É possível que o desenvolvimento dos óvulos ocorra de maneira diferente entre as três variedades de meloeiro testadas. Provavelmente, os óvulos da variedade *reticulatus* apresentavam-se em estágios mais imaturos quando foram submetidos ao meio de cultivo para indução de calos, resultando em menor porcentagem de calogênese nessa variedade.

Bhojwani e Dantu (2013) enfatizam que, para minimizar os entraves da obtenção de calos oriundos de tecidos esporofíticos, o óvulo excisado isoladamente é considerado o melhor explante para ginogênese in vitro, visando à produção de plantas haploides, ratificando o emprego desse tipo de explante no presente estudo. Além disso, esses autores mencionam que a ginogênese só se inicia depois que o saco embrionário está totalmente organizado.

Foto: Alexya Vitoria Felix Carvalho



Figura 3. Corte histológico de segmento de ovário de meloeiro (*Cucumis melo* L.) variedade *reticulatus* Seringe. Detalhe dos óvulos imaturos, antes da excisão para o cultivo in vitro, sob microscopia de luz. Ov: óvulo. Am: amido.

Fase de indução de parte aérea

Nas variedades botânicas *cantalupensis* e *inodorus* de meloeiro, não foi observada formação de parte aérea nos calos submetidos aos tratamentos testados (Figura 4).

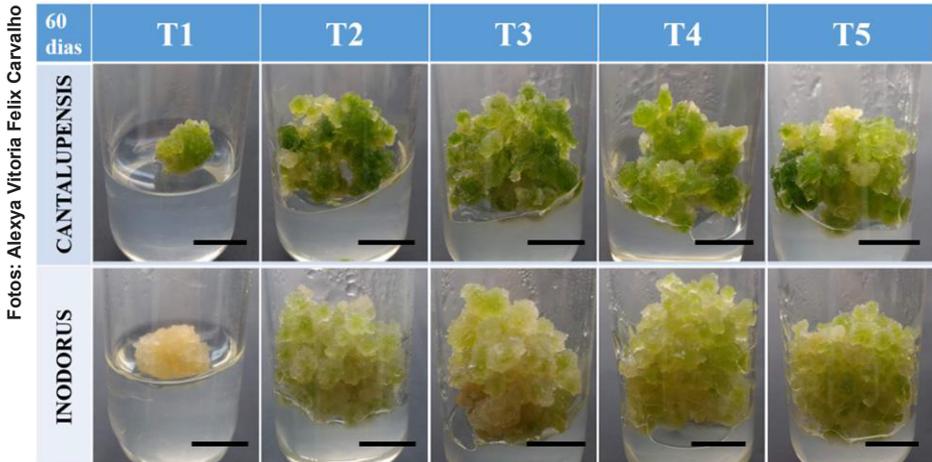


Figura 4. Calos de meloeiro (*Cucumis melo* L.) das variedades botânicas *inodorus* e *cantalupensis* aos 60 dias de cultivo em meios para regeneração de parte aérea. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μM de BAP; T3) MS + 4,44 μM de BAP; T4) MS + 6,66 μM de BAP; T5) MS + 8,88 μM de BAP.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

O primeiro registro da obtenção de plantas haploides em meloeiro, a partir do cultivo in vitro de óvulos, foi o de Ficaddenti et al. (1999). Esses autores testaram cinco genótipos, sendo um da variedade *reticulatus*, dois da variedade *inodorus* e dois híbridos F_1 , e verificaram que, entre os genótipos estudados, as respostas variaram tanto na formação de embriões quanto na regeneração de plantas haploides. A maior eficiência de regeneração de plantas haploides foi registrada no meio de cultivo MS suplementado com 0,27 μM de ANA e 0,88 μM de BAP.

Malik et al. (2011) verificaram que secções de ovário do híbrido F_1 comercial Jin Man Di formaram apenas calos de coloração branca no meio de cultivo suplementado com 0,54 μM de ANA em combinação com diferentes concentrações de BAP, mas sem a diferenciação na parte aérea.

Entretanto, resultados satisfatórios foram registrados em meio de cultivo MS suplementado com 2,66 μM de BAP, com uma taxa de regeneração de plantas de 22,5%.

Em meloeiro, Koli e Murthy (2013), ao utilizarem BAP na concentração de 5,0 μM , constataram que mais de 90% dos calos formaram parte aérea na cultivar Mudicode da variedade botânica *conomon*, com uma média de 5,5 brotos por calos.

No presente estudo, mesmo utilizando-se concentrações de BAP semelhantes às empregadas por Malik et al. (2011) e Koli e Murthy (2013), não houve formação de parte aérea nos calos nas duas variedades botânicas estudadas, confirmando que a resposta in vitro é genótipo-dependente.

A incorporação de BAP em baixas concentrações tem sido aplicada com sucesso em alguns estudos para a maturação embrionária e, em última análise, para a regeneração de parte aérea, visando à obtenção de plantas haploides por meio da ginogênese in vitro de meloeiro (Ficcadenti et al., 1999; Malik et al., 2011; Koli; Murthy, 2013). Malik et al. (2011) constataram que a adição de concentrações altas de BAP induziram apenas a formação de calos ao redor das bordas das secções de ovário, que permaneceram com a coloração verde durante 5 a 6 semanas, mas esses calos não resultaram na regeneração de parte aérea.

Essa variação na regeneração de parte aérea indica que a produção in vitro de plantas haploides e DHs depende das fontes, concentrações e combinações adequadas dos reguladores de crescimento (Rojas Casado, 2020).

Os resultados obtidos neste estudo ratificam a necessidade de otimização dos protocolos em função da especificidade de cada genótipo, em relação à composição dos meios de cultivo e aos procedimentos de pré-tratamento dos explantes, visando à geração bem-sucedida de haploides por meio da ginogênese in vitro em meloeiro, corroborando as inferências de Kaur et al. (2019).

Microscopia óptica

O corante PAS revelou a presença de polissacarídeos no citoplasma das células e, após teste positivo com o lugol, foi confirmada a existência de amido nos óvulos, antes de serem submetidos ao meio para indução in vitro de calos. Com o azul de toluidina, foi possível observar as células de tamanho reduzido e a presença do núcleo (Figura 5).

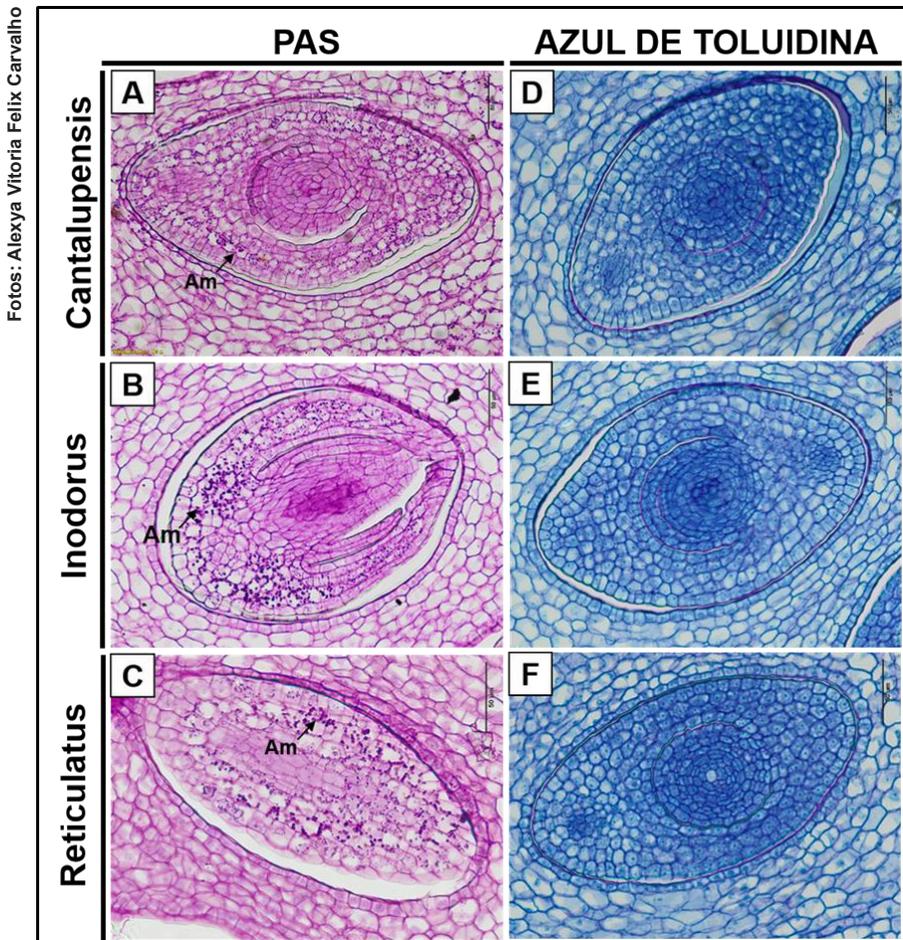


Figura 5. Óvulos excisados de ovários não fecundados, um dia antes da antese, de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.): A) e D) *cantalupensis*; B) e E) *inodorus*; C) e F) *reticulatus*, antes da indução à formação de calos sob microscopia de luz. Am: amido.

Aos 30 dias de inoculação in vitro, verificou-se a formação de calos nos óvulos mantidos no meio de cultivo MS adicionado de $1,0 \mu\text{M}$ de BAP + $2,0 \mu\text{M}$ de ANA (Figuras 6A, 6B e 6C). Foram observadas células indiferenciadas, com grandes vacúolos e núcleos pequenos na maior parte dos calos; porém, também foram registradas regiões com células menores e núcleos grandes que, provavelmente, estão em divisão celular (Figura 6). Já nas secções de ovários da variedade *conomon*, os calos foram constatados apenas ao final de seis semanas de cultivo in vitro (Koli; Murthy, 2013).

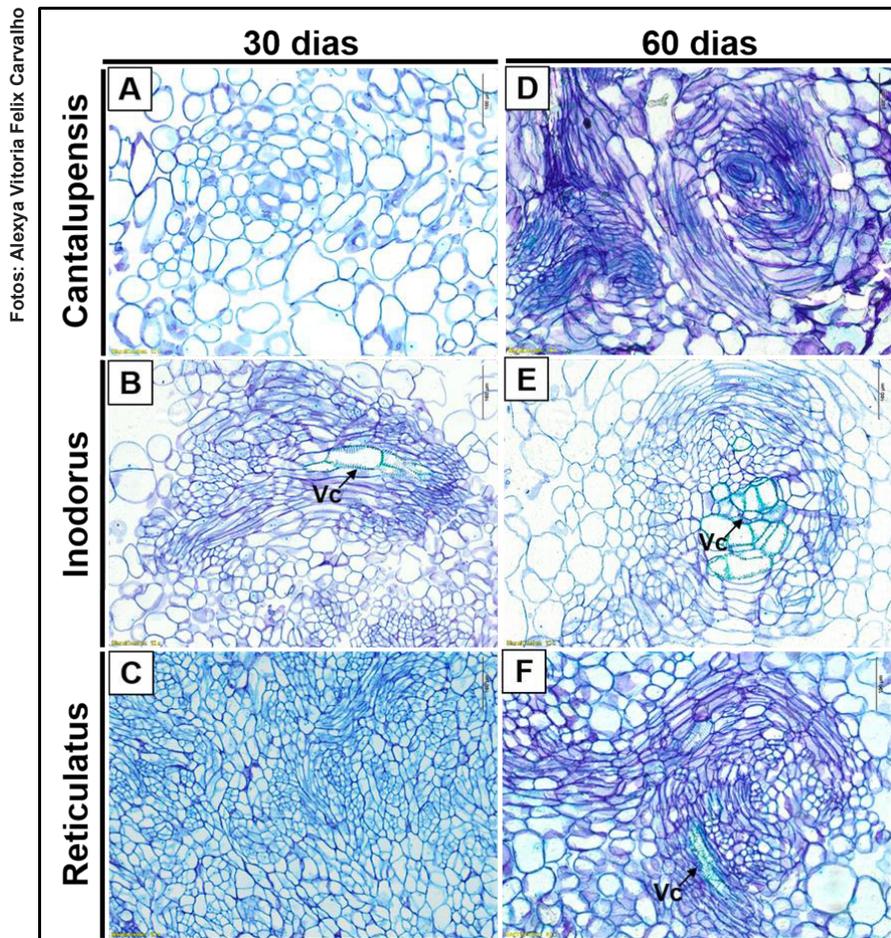


Figura 6. Calos formados em óvulos (6A, 6B e 6C) aos 30 dias e aos 60 dias de cultivo in vitro (6D, 6E e 6F) de três variedades botânicas de meloeiro (*Cucumis melo* L.) sob microscopia de luz. Vc: vasos condutores.

Foi observada metacromasia (processo que consiste na obtenção de uma coloração diferente da do corante utilizado) com o corante azul de toluidina, principalmente nos calos submetidos em meios de cultivo MS adicionados apenas de BAP, utilizados para regeneração de parte aérea (Figuras 7 e 8), em que os vasos condutores apresentaram coloração verde-claro, enquanto as outras estruturas apresentaram coloração azul-escuro, característica do corante utilizado.

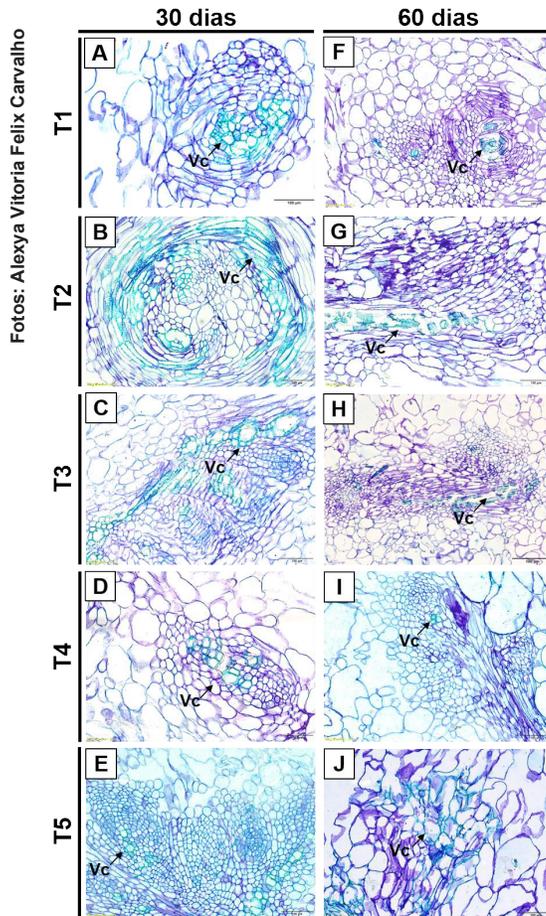


Figura 7. Calos formados aos 30 dias (7A, 7B, 7C, 7D e 7E) e aos 60 dias de cultivo in vitro (7F, 7G, 7H, 7I e 7J) na variedade botânica *cantalupensis* de meloeiro (*Cucumis melo* L.) em meios para regeneração de parte aérea, sob microscopia de luz. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μM de BAP; T3) MS + 4,44 μM de BAP; T4) MS + 6,66 μM de BAP; T5) MS + 8,88 μM de BAP. Vc: vasos condutores.

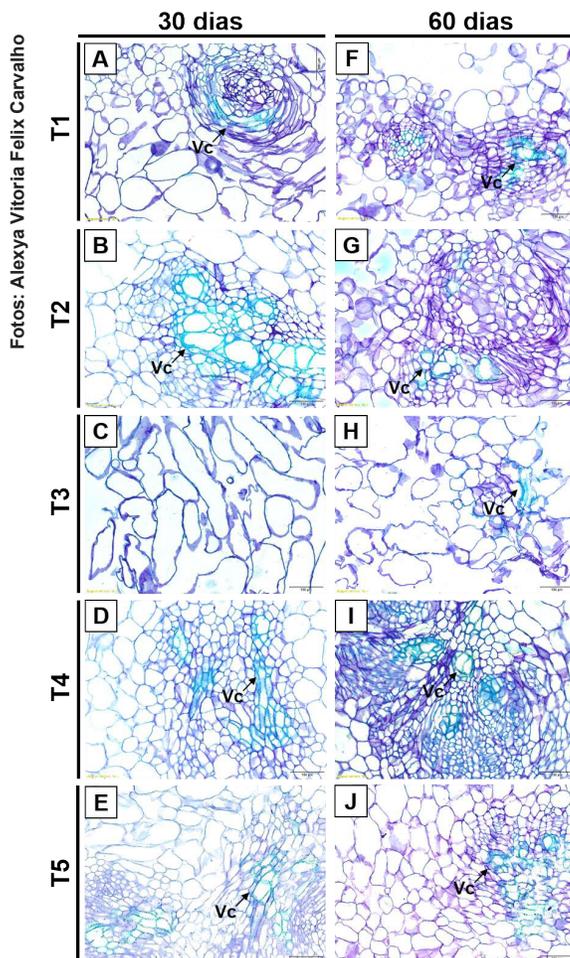


Figura 8. Calos formados aos 30 dias (8A, 8B, 8C, 8D e 8E) e aos 60 dias de cultivo in vitro (8F, 8G, 8H, 8I e 8J) na variedade botânica inodorus de meloeiro (*Cucumis melo* L.) em meios para regeneração de parte aérea, sob microscopia de luz. T1) MS sem regulador de crescimento; T2) MS + 2,22 μ M de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

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

Conclusões

A indução *in vitro* de calos em óvulos de meloeiro é genótipo-dependente, sendo a variedade *inodorus* a mais responsiva à calogênese.

O estágio de desenvolvimento dos óvulos, coletados em ovários com um dia da antese, varia em função da variedade de meloeiro.

O estágio de desenvolvimento dos óvulos pode ter efeito na indução *in vitro* de calos, sendo os mais imaturos os menos responsivos.

A variedade de meloeiro *reticulatus* é a menos responsiva à calogênese; sendo a quantidade de calos obtida insuficiente para avaliação nos meios de cultivo para organogênese da parte aérea.

Os meios de cultivo testados não são adequados para organogênese da parte aérea de plantas haploides das variedades de meloeiro *inodorus* e *cantaloupensis* a partir de calos de óvulos.

As análises histológicas, por meio de microscopia óptica, permitem identificar diferenças entre os calos das fases de indução de calos e de regeneração da parte aérea.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida à primeira autora; à Universidade Federal do Ceará (UFC) pela cooperação na parte referente à microscopia; e à Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT) pelo auxílio à pesquisa.

Referências

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**, v. 2013, article ID 529502, 2013. 7 p. <<https://doi.org/10.1155/2013/529502>>.

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. Gynogenesis. In: BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. (Ed.). **Plant tissue culture: an introductory text**. India: Springer, 2013. Cap. 9, p. 113-118. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_9>.

DENG, Y.; TANG, B.; ZHOU, X.; FU, W.; TAO, L.; ZHANG, L.; CHEN, J. Direct regeneration of haploid or doubled haploid plantlets in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through ovary culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, p. 253-268, 2020. <<https://doi.org/10.1007/s11240-020-01839-w>>.

DIAS, I. **Brandt apresenta resultados de tecnologias no manejo de melão**. 2020. Disponível em: <<https://www.grupocultivar.com.br/noticias/brandt-apresenta-resultados-de-tecnologias-no-manejo-de-melao>>. Acesso em: 17 out. 2021.

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**, v. 35, n. 10, p. 1991-2019, 2016. <<https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>>.

DRYANOVSKA, O. A. Induced callus in vitro from ovaries and anthers of species from the Cucurbitaceae family. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v. 38, n. 9, p. 1243-1244. 1985.

DRYANOVSKA, O. A.; ILEVA, I. N. In vitro anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v. 36, n. 8, p. 1107-1110, 1983.

DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 377-424, 2010. <<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x>>.

FAO. **Faostat** – Statistics Database. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 17 out. 2021.

FICCADENTI, N.; SESTILI, S.; ANNIBALI, S.; DI MARCO, M.; SCHIAVI, M. In vitro gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L. **Journal of Genetics and Breeding**, v. 53, p. 255-257, 1999.

FORSTER, B. P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K. J.; TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends Plant Science**, v. 12, n. 8, p. 368-375, 2007. <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>>.

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Double haploids. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnology and plant breeding: applications and approaches for developing improved cultivars**. San Diego: Academic Press, 2014. Cap. 9, p. 201-224. <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418672-9.00009-X>>.

GOLABADI, M.; GHANBARI, Y.; KEIGHOBADI, K.; ERCISLI, S. Embryo and callus induction by different factors in ovary culture of cucumber. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 90, p. 68-75, 2017. <<https://doi.org/10.5073/JABFQ.2017.090.010>>.

GONZALO, M. J.; CLAVERIA, E.; MONFORTE, A. J.; DOLCET-SANJUAN, R. Parthenogenic haploids in melon: generation and molecular characterization of a doubled haploid line populaion. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 136, n. 2, p. 145-154, 2011. <<https://doi.org/10.21273/JASHS.136.2.145>>.

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**, v. 11, article 378, 2020. 12 p. <<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00378>>.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 1A-149A, 1965. <<http://www.jstor.org/stable/1604673>>.

KAUR, H. A.; SHARMA, S. P.; KAUR, N.; KALIA, A. Gynogenic response of muskmelon genotypes with temperature and MS medium supplementations. **Acta Horticulturae**, v. 1255, p. 13-18, 2019. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1255.3>.

KOLI, S. P.; MURTHY, H. N. Haploid plant regeneration from unpollinated ovules of *Cucumis melo* L. var. *conomon* cv. Mudicode. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. 605-613, 2013. <<http://dx.doi.org/10.9734/BBJ/2013/5417>>.

KURTAR, E. S.; BALKAYA, A.; OZBAKIR OZER, M. Production of callus mediated gynogenic haploids in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 54, n. 1, p. 9-16, 2018. <<http://dx.doi.org/10.17221/30/2017-CJGPB>>.

LOTFI, M.; ALAN, A. R.; HENNING, M. J.; JAHN, M. M.; EARLE, E. D. Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 1121-1128. 2003. <<https://doi.org/10.1007/s00299-003-0636-3>>.

MALIK, A. A.; LI, C.; SHUXIA, Z.; JIN-FENG, C. Efficiency of SSR makers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. **Horticultural Science**, v. 38, n. 1, p. 27-34, 2011. <<https://doi.org/10.17221/47/2010-HORTSCI>>.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497. 1962. <<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>.

OLIVEIRA, F. I. C. de. **Cultura de tecidos e cruzamentos interespecíficos visando obtenção de haploides em meloeiro**. 2018. 81 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) -

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1103380>>.

OZKAN, T.; GOZEN, V.; ONUS, A. N. Cucumber gynogenesis: effects of 8 different media on embryo and plant formation. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 6, n. 2, p. 419-422, 2017. <https://www.ijair.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJAIR_2581_FINAL.pdf>.

PITRAT, M.; HANELT, P.; HAMMER, K. Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. **Acta Horticulturae**, v. 510, p. 29-36, 2000. <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.510.4>>.

ROJAS CASADO, M. del C. **Generación de doble haploides mediante ginogénesis, una estrategia biotecnológica para la mejora genética de melón (*Cucumis melo*) y pepino (*Cucumis sativus*)**. 2020. 50 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial e Agroalimentar). Universidad de Almería: Espanha. <<http://hdl.handle.net/10835/10262>>.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p. 358-369, 2008. <<https://doi.org/10.1159/000121085>>.

SORNTIP, A.; POOLSAWAT, O.; KATIVAT, C.; TANTASAWAT, P. A. Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 98, n. 2, 353-361, 2017. <<https://doi.org/10.1139/cjps-2017-0112>>.

TANTASAWAT, P. A.; SORNTIP, A.; POOLSAWAT, O.; CHAOWISET, W.; PORNBUNGKARD, P. Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 17, n. 3, p. 613-618, 2015. <<https://doi.org/10.17957/IJAB.17.3.14.257>>.

YASHIRO, K.; HOSOYA, K.; KUZUYA, M.; TOMITA, K.; EZURA, H. Efficient production of doubled haploid melon plants by modified colchicine treatment of parthenogenetic haploids. **Acta Horticulturae**, v. 588, p. 335-338, 2002. <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.588.54>>.

ZHU, Y. C.; SUN, D. X.; DENG, Y.; LI, W. H.; AN, G. L.; LI, Y. Y.; WU, J.; SI, W. J.; LIU, J. P. Effects of medium addition on ovule enlargement of watermelon non-pollinated ovary. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 20, p. 2312-2318, 2018. <<https://doi.org/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**, v. 135, p. 179-187, 2018. <<https://doi.org/10.1007/s11240-018-1454-1>>.

ZOU, T.; SONG, H.; CHU, X.; TONG, L.; LIANG, S.; GONG, S.; YANG, H.; SUN, X. Efficient induction of gynogenesis through unfertilized ovary culture with winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch). **Scientia Horticulturae**, v. 264, article 109152, 2020. 8 p. <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109152>>.

Embrapa

Agroindústria Tropical



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL