



Estabelecimento in vitro de anteras de meloeiro amarelo híbrido Goldex



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
245**

**Estabelecimento in vitro de anteras de
meloeiro amarelo híbrido Goldex**

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

***Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2023***

Unidade responsável pelo conteúdo e pela 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/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente
José Roberto Vieira Junior

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

Fotos da capa
Karla Nascimento de Souza

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF

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

Estabelecimento in vitro de anteras de meloeiro amarelo híbrido Goldex / Frederico Inácio Costa de Oliveira ...
[et al.]. – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2023.

PDF (20 p.) : il. ; (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543 ; 245).

1. *Cucumis melo*. 2. Desinfestação. 3. Cultura de tecidos vegetais. 4. Contaminação. I. Oliveira, Frederico Inácio Costa de. II. Carvalho, Alexya Vitoria Felix. III. Carvalho, Ana Cristina Portugal Pinto de. IV. Aragão, Fernando Antonio Souza de. VI. Série.

CDD 635.611

Sumário

Resumo.....	4
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	11
Resultados e Discussão.....	14
Conclusões.....	17
Agradecimentos.....	17
Referências.....	17

Estabelecimento in vitro de anteras de meloeiro amarelo híbrido Goldex

Frederico Inácio Costa de Oliveira¹

Alexya Vitoria Felix Carvalho²

Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho³

Fernando Antonio Souza de Aragão⁴

Resumo – A obtenção de linhagens homozigotas é um desafio nos programas de melhoramento de meloeiro. A androgênese in vitro apresenta-se como alternativa para produção de linhagens haploides e di-haploides. Objetivou-se definir o estágio de desenvolvimento da flor masculina e o procedimento de desinfestação mais adequados para estabelecimento in vitro de anteras de meloeiro amarelo híbrido Goldex. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, esquema fatorial 2 x 4, dois estágios de desenvolvimento da flor masculina (pré-antese e antese) e quatro procedimentos de desinfestação: I. etanol 70% (1 minuto) + hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,1% de cloro ativo – ca (7,5 minutos); II. etanol 70% (dois minutos) + NaClO com 0,2% de ca (7,5 minutos); III. etanol 70% (3 minutos) + NaClO com 0,3% de ca (7,5 minutos); e IV. etanol 70% (4 minutos) + NaClO com 0,4% de ca (7,5 minutos). Aos 30 dias, foram avaliados percentuais de oxidação e contaminação. Não foi constatada oxidação nas anteras. Anteras em pré-antese apresentaram menor percentual de contaminação, independentemente do tratamento de desinfestação, e não desprendimento

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE

² Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE

³ Bióloga, doutora em Genética, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), Fortaleza, CE

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

dos grãos de pólen. O protocolo de desinfestação I é o mais recomendado para estabelecimento in vitro de anteras obtidas de flores masculinas em estágio de pré-antese do meloeiro híbrido amarelo Goldex.

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

In vitro establishment of anthers of melon amarelo híbrido Goldex

Abstract – The development of homozygous lines is a challenge to melon breeding programs. In vitro androgenesis is seen as an alternative to produce haploid and di-haploid lines. The aim of this study was to define the most appropriate stage of male flower development and disinfection procedure for in vitro establishment of anthers of melon amarelo híbrido Goldex. The experimental design was completely randomized, in a 2 x 4 factorial scheme, two stages of anther development (pre-anthesis and anthesis) and four disinfection procedures: I. 70% ethanol (1 minute) + sodium hypochlorite (NaClO) with 0.1% active chlorine – ac (7.5 minutes); II. 70% ethanol (2 minutes) + NaClO with 0.2% ac (7.5 minutes); III. 70% ethanol (3 minutes) + NaClO with 0.3% ac (7.5 minutes); and IV. 70% ethanol (4 minutes) + NaClO with 0.4% ac (7.5 minutes). After 30 days, the percentage of anther's contamination and oxidation was evaluated. No oxidation was found in the anthers. Anthers in the pre-anthesis stage showed a lower percentage of contamination, regardless of the treatment applied, and the non-detachment of pollen grains. Disinfection protocol I is the most recommended for the in vitro cultivation of anthers from male flower in the pre-anthesis stage of the melon amarelo híbrido Goldex.

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

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 2020, uma produção aproximada de 28,5 milhões de toneladas em mais de 1,07 milhão de hectares colhidos (FAO, 2021). No Brasil, neste mesmo ano, foram colhidas mais de 614 mil toneladas em cerca de 24 mil hectares, representando apenas 2,2% da produção mundial (FAO, 2021). Em relação ao ano de 2019, a produção brasileira de melão cresceu 4,1%. A região Nordeste é a maior produtora, contribuindo com mais de 95% da produção nacional, com destaque dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, responsáveis por 73% do percentual regional da produção (IBGE, 2022). Além desses dois estados, outros como Bahia, na região do Vale do São Francisco, e Pernambuco apresentam cultivos comerciais expressivos de meloeiro (Canal do Horticultor, 2021).

Os tipos de melão mais plantados no Brasil são o Amarelo, Cantaloupe, Pele de Sapo, Orange, entre outros com menor demanda (Canal do Horticultor, 2021). Cultivares comerciais de meloeiro são, em sua maioria, híbridos F₁, devido à uniformidade, ao alto rendimento e à proteção da propriedade intelectual (Nguyen et al., 2022). Esses híbridos são obtidos a partir do cruzamento entre parentais com alto grau de homozigose, isto é, linhagens puras, cujo valor é inestimável para programas de melhoramento genético (Dong et al., 2016). Entretanto, por meio das técnicas convencionais, a obtenção de linhagens puras requer tempo e recursos significativos, devido às rodadas sucessivas de autofecundação e de retrocruzamentos (Yashiro et al., 2002). De acordo com Oliveira (2018), em locais onde a cultura do meloeiro só avança um ciclo por ano, a obtenção de linhagens puras pode necessitar de mais de 10 anos.

Segundo Dong et al. (2016), especificamente para cucurbitáceas, têm sido empregadas três diferentes técnicas para a obtenção de plantas haploides (Hs) 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). Entretanto, as técnicas mais estudadas e empregadas para obtenção de linhagens DHs têm sido a ginogênese e o uso

de pólen irradiado, nas quais mais progressos têm sido obtidos (Asadi et al., 2018). Todavia, esses autores enfatizam que, além dessas abordagens serem tecnicamente desafiadoras, possuem a limitação do reduzido número de óvulos presentes em uma única flor feminina, em comparação com o número expressivamente maior de micrósporos nas anteras de uma flor masculina. De acordo com Ahmadi e Ebrahinzadeh (2020), a androgênese tornou-se ultimamente o método mais frequentemente empregado na produção de DHs nas principais culturas de importância econômica. Teoricamente, as mudas derivadas de micrósporos cultivados *in vitro* possuem metade do número normal de cromossomos das plantas doadoras e, portanto, são consideradas haploides.

A androgênese pode ser efetuada por meio de três métodos principais: cultivo das anteras, cultivo dos micrósporos isolados e cultivo dos micrósporos em camadas (Niazian; Shariatpanahi, 2020). Neste último, os micrósporos não são liberados das anteras mecanicamente, e sim após o desenvolvimento inicial das anteras em meio de cultivo em camada dupla. Entre estes, o cultivo *in vitro* de anteras imaturas, contendo os micrósporos, é o método mais simples de indução de plantas Hs pela via da androgênese (Niazian; Shariatpanahi, 2020). Vários fatores afetam a eficiência do método, incluindo genótipo e condições de cultivo da planta doadora, estágio de desenvolvimento do micrósporo, meio de cultivo, tipo e concentração de reguladores de crescimento, fonte e intensidade de estresse, entre outros (Wang et al., 2018).

A seleção das flores contendo micrósporos no estágio de desenvolvimento apropriado também é muito importante para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de anteras (Niazian; Shariatpanahi, 2020), uma vez que está relacionada com o estágio de desenvolvimento das anteras.

O cultivo *in vitro* de anteras de meloeiro se resume a dois estudos, nos quais os explantes utilizados apresentavam-se no estágio de micro e macrosporos (Dryanovska; Ileva, 1983; Dryanovska, 1985). Ainda em meloeiro, Nguyen et al. (2022) estudaram a correlação entre as características morfológicas do botão floral e da antera com os estágios de desenvolvimento dos micrósporos. Esses autores concluíram que o comprimento e o diâmetro do botão floral são características que permitem selecionar micrósporos em estágio mais adequado para o cultivo *in vitro* da antera.

Em cucurbitáceas, os estágios de desenvolvimento dos micrósporos mais utilizados para o cultivo in vitro de anteras são os de uninuclear de médio (mediano) a tardio em abóbora (Araghi et al., 2017; Habiba, 2016, Kurtar et al., 2016), melão-de-são-caetano (Tang et al., 2012; Usman et al., 2015) e pepino (Abdollahi et al., 2016; Asadi et al., 2018; Hamidvand et al., 2013). Em melancia, botões florais coletados um dia antes da antese, nas primeiras horas da manhã, foram os mais adequados (Akbas; Solmaz, 2019; Silva et al., 2021).

Além da seleção dos botões florais, considerando-se que são geralmente coletados de plantas mantidas na casa de vegetação, a desinfestação, ou seja, a remoção de contaminantes existentes na superfície do próprio explante é um passo indispensável na cultura in vitro (Cid; Teixeira, 2010), pois os níveis de contaminação tendem a ser maiores (Navroski, 2011).

O processo de desinfestação, primeira etapa para o estabelecimento in vitro de uma cultura, deve ser feito em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, o que nem sempre impede que contaminações ocorram (Souza et al., 2006).

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

Nos dois estudos com o estabelecimento e cultivo in vitro de antera de meloeiro (Dryanovska; Ileva, 1983; Dryanovska, 1985), não são mencionados os protocolos de desinfestação dos botões florais. Procedimentos com essa finalidade têm sido relatados para outras cucurbitáceas, embora apresentem diferenças entre os produtos, as concentrações e os tempos de exposição utilizados.

Em abóbora, a desinfestação de botões florais masculinos das variedades Eskandrani, Baladi, Zucchini e Milittle, e de seus respectivos híbridos F₁, foi efetuada por meio da imersão em solução de bicloreto de mercúrio (Hg₂Cl) a 1% contendo a adição de duas gotas de Tween 20 durante 10 minutos, e posteriormente do enxágue em água destilada autoclavada, três vezes

consecutivas (Habiba, 2016). Botões florais de seis linhagens coletadas na costa do Mar Negro, na Turquia, foram imersos em etanol 70% durante dois minutos e depois agitados suavemente em solução de NaClO comercial a 10% (v/v) contendo de duas a três gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Posteriormente, foram enxaguados três vezes em água destilada autoclavada, por 5 minutos cada enxágue, e colocados sobre papel de filtro autoclavado para retirar o excesso de água presente na superfície dos botões (Kurtar et al., 2016).

Em melancia, a desinfestação dos botões florais masculinos das cultivares Charleston Gray e Crimson Sweet foi realizada por meio da imersão em etanol 70% durante dois minutos, em seguida em solução de NaClO a 1,5% por 15 minutos e enxaguados três vezes em água autoclavada (Abdollahi et al., 2016). Entretanto, os botões florais masculinos das linhagens Smile e Sugar Baby foram desinfestados em etanol 70% por um minuto, seguida de imersão em solução de 20% de NaClO (v/v) por 15 minutos e lavados três vezes em água destilada autoclavada (Silva et al., 2021). Os botões florais masculinos de vários genótipos de melancia foram imersos em etanol 70% durante dois minutos e depois lavados de três a quatro vezes com água autoclavada, sendo posteriormente mantidos por 15 minutos em solução de NaClO a 15% contendo de uma a duas gotas de Tween 20, e finalmente enxaguados de três a quatro vezes em água autoclavada (Akiba; Solmaz, 2019).

Em melão-de-são-caetano, os botões florais das cultivares Lvculi, Cuifei e Bixiu foram imersos inicialmente em etanol 75% (v/v) durante 30 segundos, a seguir em solução de cloreto de mercúrio a 0,1% (w/v) sob agitação constante durante cinco minutos e lavados em água destilada autoclavada por cinco vezes (Tang et al., 2012); na cultivar Faisalabad, os botões florais foram desinfestados em etanol 70% (v/v) contendo de uma a duas gotas de Tween, durante de dois a três minutos, e enxaguados de duas a três vezes em água autoclavada. Na sequência, foram imersos em NaClO a 5% (v/v) durante cinco minutos e novamente enxaguados em água autoclavada três vezes (Usman et al., 2015).

Em pepino, os botões florais das cultivares Beta Alfa e Esfahani foram imersos em etanol 70% durante dois minutos, depois em uma solução de NaClO a 1,5% durante 15 minutos e, posteriormente, em vários enxágues em água destilada autoclavada (Hamidvand et al., 2013). Botões florais masculinos

das cultivares Beta Alpha, Isfahani, Basmenj e Korki foram desinfestados em solução de etanol 70% (v/v) durante um minuto, seguido da imersão em solução de NaClO 2,5% (v/v) durante cinco minutos (Abdollahi et al., 2016). Botões florais do híbrido F₁ Beta Alpha e Estafahi foram desinfestados com etanol 70% durante 30 segundos e em solução de NaClO na concentração de 4g/L por cinco minutos, e enxaguados três vezes em água autoclavada (Asadi et al., 2018). Botões florais masculinos das cultivares DTG, BT1 e BT2 foram imersos em solução de etanol 70% durante um minuto e depois em solução NaClO 1% durante quatro minutos e, por último, enxaguados três vezes em água destilada autoclavada (Amiran et al., 2019).

Além da contaminação, outro fator importante que resulta na perda das culturas in vitro é o processo de oxidação. Oxidação, em cultura de tecidos, pode ser definida como o escurecimento de tecidos cortados que resulta da reação de compostos fenólicos liberados ao meio de cultivo com o oxigênio (Carvalho et al., 2011). Segundo Cid e Teixeira (2010), o corte do explante com bisturi pode desencadear a oxidação fenólica, responsável pela cor marrom do explante.

Nos trabalhos citados anteriormente com a cultura de tecidos de anteras de cucurbitáceas (melão, abóbora, melancia, melão-de-são-caetano e pepino), não são relatados os percentuais de contaminação e oxidação observados nas culturas.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo definir o estágio de desenvolvimento e o procedimento de desinfestação da flor masculina mais adequados para o estabelecimento in vitro da cultura de antera de meloeiro amarelo híbrido Goldex.

Material e Métodos

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

Sementes de meloeiro amarelo híbrido Goldex foram semeadas em bandejas de 200 células contendo substrato comercial e pó de coco seco na proporção de 1:1. Dez dias após a semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de cinco litros contendo areia.

Plantas com aproximadamente quatro semanas, depois do transplântio para os vasos, foram utilizadas como fontes de explantes. Flores masculinas em dois estágios de desenvolvimento, pré-antese (Figura 1A) e antese (Figura 1B), foram coletadas no período da manhã, de acordo com a metodologia recomendada por Habiba (2016). Dessas flores, foram excisadas as anteras como fonte de explantes. Após a retirada da corola, verificou-se que na flor masculina em pré-antese as anteras ainda estavam fechadas, mantendo os grãos de pólen na parte interior (Figura 1C), enquanto que na flor masculina em antese as anteras já se encontravam abertas, com os grãos de pólen expostos (Figura 1D).

Fotos: Frederico Inácio Costa de Oliveira

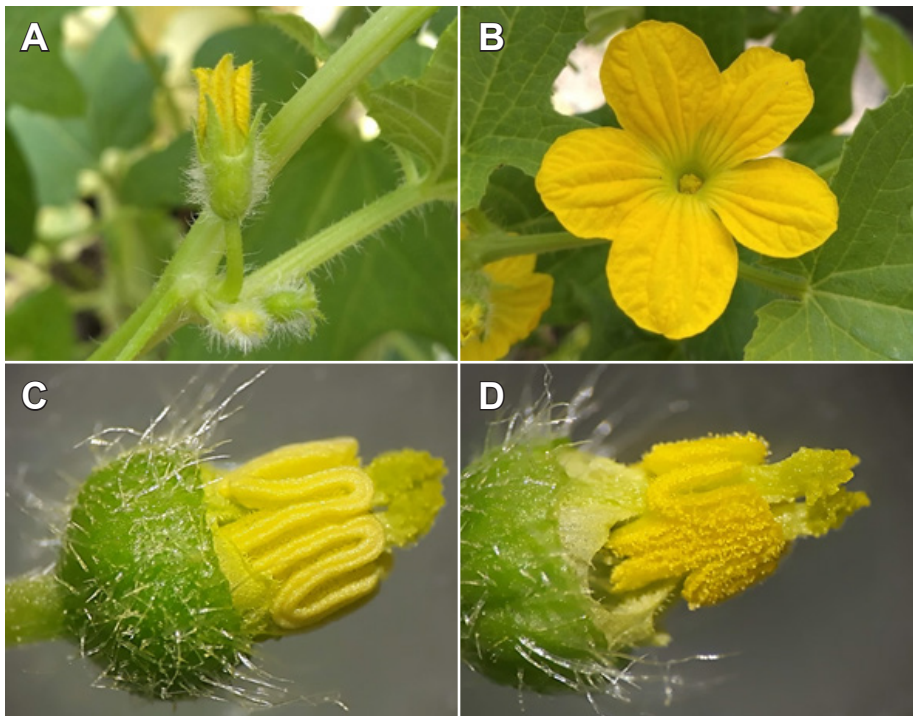


Figura 1. Flor masculina de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex. Estádio de pré-antese (A); estágio de antese (B); detalhe das anteras ainda fechadas na flor em pré-antese (C); e anteras abertas, expondo os grãos de pólen (D).

A desinfestação das flores masculinas nos dois estádios de desenvolvimento foi realizada sob condições de capela de fluxo laminar, sendo as anteras retiradas com o auxílio de pinça e bisturis estéreis.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 4), constituído de dois estádios de desenvolvimento da flor masculina (flores em pré-antese e flores em antese) e quatro procedimentos de desinfestação: I. etanol 70% (1 minuto) + hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,1% de cloro ativo – ca (7,5 minutos); II. etanol 70% (2 minutos) + NaClO com 0,2% de ca (7,5 minutos); III. etanol 70% (3 minutos) + NaClO com 0,3% de ca (7,5 minutos); e IV. etanol 70% (4 minutos) + NaClO com 0,4% de ca (7,5 minutos). A desinfestação foi finalizada com três enxagues com água destilada e autoclavada, com duração de um minuto cada. No total, foram oito tratamentos em seis repetições, sendo cada repetição formada por cinco tubos de ensaio contendo um explante cada (antera).

O meio de cultivo utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar a 6,5 g L⁻¹, sem a adição de fitorreguladores. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 121 °C, por 15 minutos. Em capela de fluxo laminar, os explantes (anteras) foram introduzidos, após a desinfestação das flores masculinas, em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm), contendo 10,0 mL de meio de cultivo e apenas um explante (uma antera) por tubo de ensaio.

As culturas inicialmente foram mantidas em sala de crescimento, a 25 °C ± 1 °C, no escuro, durante sete dias, sendo posteriormente submetidas à intensidade luminosa próxima de 30 µmolm⁻²s⁻¹, sob fotoperíodo de 16 horas de luz por 21 dias.

Aos 30 dias após a inoculação in vitro, as anteras foram avaliadas em relação à oxidação e contaminação. As anteras foram consideradas oxidadas quando apresentavam um amarelecimento inicial seguido de escurecimento na superfície do tecido, com posterior possibilidade de morte do explante.

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

Resultados e Discussão

Os procedimentos de desinfestação, o estágio de desenvolvimento da flor masculina e a interação entre esses fatores foram significativos para a contaminação das anteras, aos 30 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de contaminação de anteras obtidas de flores masculinas em antese e pré-antese de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em função de quatro procedimentos de desinfestação, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

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

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

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

Os procedimentos de desinfestação I e II foram mais eficientes em anteras excisadas das flores masculinas em pré-antese. Os tratamentos III e IV induziram menor contaminação em ambos os explantes, não sendo verificada contaminação nas anteras submetidas ao tratamento contendo a maior concentração de cloro ativo e o maior tempo de exposição aos produtos (IV), independentemente do estágio da flor no qual foram coletadas.

As anteras oriundas de flores masculinas em estágio de pré-antese, além de apresentarem menor percentual de contaminação (3,3%) do que as em antese (25%), não registraram diferença significativa entre os tratamentos de desinfestação. Nas flores em antese, os tratamentos de desinfestação com NaClO em concentrações mais elevadas e com maiores intervalos de tempo de imersão em etanol (III e IV) resultaram em redução significativa dos níveis

de contaminação das anteras (Tabela 1). Na prática, espera-se que haja redução da porcentagem de contaminação com o aumento da concentração de cloro ativo na solução desinfetante e provavelmente também com o maior tempo de exposição dos explantes ao etanol 70%. A maior concentração de NaClO e a prolongada exposição ao etanol 70% foram capazes de reduzir os percentuais de contaminantes nas anteras excisadas das flores masculinas em antese. Reis (2018) ressalta que a alta taxa de contaminação nos explantes pode estar relacionada à concentração de NaClO e ao tempo de exposição dos explantes a esse produto.

Apesar da contaminação ser um fator limitante na cultura de tecidos de plantas, os percentuais de explantes contaminados não são mencionados em trabalhos publicados com a cultura in vitro de antera de cucurbitáceas, impossibilitando a discussão dos resultados obtidos com os estudos citados anteriormente.

Comparando-se os diferentes estágios das flores masculinas, houve diferença apenas nos procedimentos de desinfestação I e II, com menores índices de contaminação nas anteras oriundas de flores masculinas em pré-antese. Esse comportamento era previsto, uma vez que, nas flores em pré-antese, as anteras ficam mais protegidas pela corola e menos expostas aos agentes contaminantes do ambiente (Figura 1A). Por outro lado, nas flores masculinas em antese, as anteras ficam mais expostas pela corola e em maior contato com o meio externo (Figura 1B).

Não houve registro de oxidação nas anteras aos 30 dias de cultivo in vitro. No entanto, até mesmo nas flores masculinas em antese, apesar das anteras ficarem mais expostas ao agente desinfestante (NaClO) não houve registro de oxidação.

As anteras são expansões dilatadas do estame, constituídas por duas tecas, cada uma com dois sacos polínicos ou microsporângios, onde são produzidos os grãos de pólen (Kaltchuk-Santos; Badonese-Zanettini, 2002), sendo que as flores masculinas, em meloeiro, apresentam cinco estames (Delaplane; Mayer, 2000). Nas flores masculinas em antese, constatou-se que os grãos de pólen se desprenderam das anteras após o processo de desinfestação (Figura 2B). Desse modo, conclui-se que as anteras oriundas de flores masculinas em estágio de pré-antese são as mais adequadas, tendo em vista que, mesmo após a desinfestação, os grãos de pólen ainda

permaneciam aderidos às anteras (Figura 2A). Além da menor aderência dos grãos de pólen às anteras nas flores masculinas em antese, os grãos de pólen perdem a viabilidade após 7 horas da antese, demonstrando a importância da coleta do pólen no período da manhã (Abreu et al., 2008).

Fotos: Frederico Inácio Costa de Oliveira

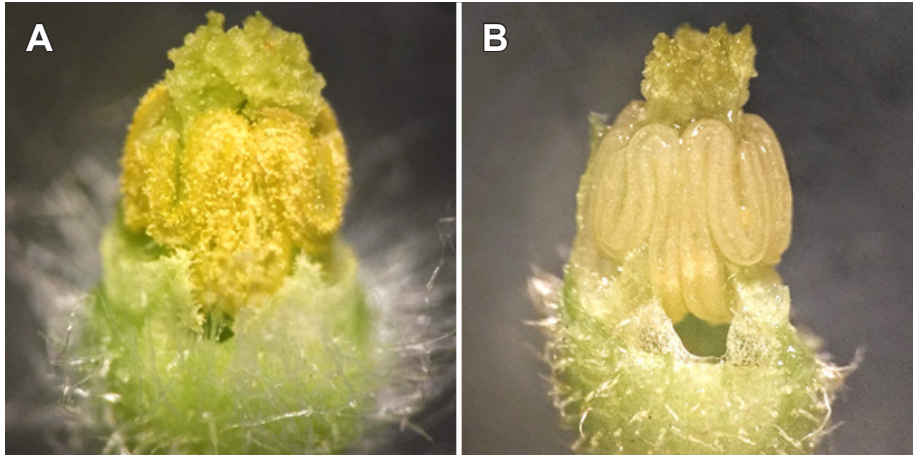


Figura 2. Anteras de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex oriundas de flores masculinas em antese. Antes da desinfestação, com os grãos de pólen aderidos à teca (A); e após o procedimento de desinfestação, sem a presença dos grãos de pólen (B).

Em relação à desinfestação, o protocolo I é o mais recomendado para anteras em estágio de pré-antese, tendo em vista o baixo percentual de contaminação obtido, mesmo na menor concentração da solução de NaClO e no menor tempo de exposição das anteras.

Além da contaminação, deve-se também ponderar a possibilidade de remoção dos grãos de pólen após o procedimento de desinfestação, pois são os grãos de pólen que irão dar origem *in vitro* às culturas haploides. Assim, as flores em estágio de antese, após o processo de desinfestação, apresentaram-se inadequadas como fontes de explante, pois grande parte dos grãos de pólen já foi desprendida das anteras.

Conclusões

Para o estabelecimento da cultura in vitro de anteras de meloeiro devem ser utilizadas flores masculinas em pré-antese.

As flores masculinas em pré-antese devem ser desinfestadas com etanol 70% durante 1 minuto, seguido de imersão em solução de NaClO a 0,1% de cloro ativo durante 7,5 minutos e três enxágues com água destilada e autoclavada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor e à Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT) pelo auxílio à pesquisa.

Referências

- ABDOLLAHI, M. R.; NAJAFI, S.; SARIKHANI, H.; MOOSAVI, S. S. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, p. 571-579, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3906/bjy-1502-55>.
- ABREU, T. B.; NUNES, G. H. de S.; DANTAS, M. S. M.; COSTA FILHO, J. H. da; COSTA, G. G.; ARAGÃO, F. A. S. de. Fenologia floral, viabilidade do grão de pólen e receptividade do estigma do meloeiro. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, v. 52, p. 43-46, 2008.
- AHMADI, B.; EBRAHIMZADEH, H. In vitro androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 299-316, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02509-z>.
- AKBAS, F. C.; SOLMAZ, I. Obtention of haploid plant in *Citrullus lanatus* var. *lanatus* and *Citrullus lanatus* var. *citroides* species by anther culture method. **International Journal of Environmental Research and Technology**, v. 2, n. 3, p. 25-36, 2019.
- AMIRAN, R.; HOJATI, Z.; AZADI, P. Male flower induction significantly affects androgenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, (Online), 2019. 9 p. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1655488>.

ARAGHI, Z. M.; ABDOLLAHI, M. R.; ASL, A. M.; HAMZEI, J.; MOUSAVI, S. S. The study on the effect of anther orientation, type and composition of culture medium and ovary co-culture on callus induction from cultured anthers of pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *Styriaca*). **Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 19-32, 2017. DOI: <https://doi.org/10.22084/AB.2017.2267>.

ASADI, A.; ZEBARJADI, A.; ABDOLLAHI, M. R.; SEGUÍ-SIMARRO. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**, v. 214, artigo: 216, 2018. 17 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x>.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Ser. B, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x>.

CANAL DO HORTICULTOR. **Conheça os diferentes mercados de melões**: tendências. 2021. Disponível em: <https://canaldohorticultor.com.br/conheca-os-diferentes-mercados-de-meloos/>. Acesso em: 22 ago. 2022.

CARVALHO, A. C. P. P. de; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E. P. de; SOUZA, F. V. D.; PETERS, J. A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2011. Disponível em: <http://pccm.ufla.br/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/66>. Acesso em: 18 out. 2021.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. (ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, capítulo 2, p. 53-64, 2010.

DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop pollination by bee**. New York: CABI Publishing, 2000, 352 p. DOI: <https://doi.org/10.1079/9780851994482.0000>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>.

DRYANOVSKA, O. A. Induced callus in vitro from ovaries and anthers of species from Cucurbitaceae family. **C R Academie Bulgare Des Sciences**, v. 38, n. 9, p. 1.243, 1985.

DRYANOVSKA, O. A.; ILEVA, I. N. In vitro anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **C R Academie Bulgare Des Sciences**, v.36, n. 8, p. 1107-1110, 1983.

FAO. **Faostat** – Statistics Database. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 22 de ago. 2022.

HABIBA, R. M. M. Effect of genotypes, sucrose concentrations and their interaction on anther culture response on summer squash. **Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 113-120, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.21608/jacb.2016.40787>.

HAMIDVAND, Y.; ABDOLLAHI, M. R.; CHAICHI, M.; MOOSAVI, S. S. The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 5, n. 10, p. 1089-1095, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 ago. 2022.

KALTCHUK-SANTOS, E.; BADONESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, v. 32, p. 165-173, 2002. <http://hdl.handle.net/10183/22412>.

KURTAR, E. S.; AHMET BALKAYA, A.; KANDEMIR, 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**, v. 127, p. 497-511, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1074-6>.

OLIVEIRA, F. I. C. de. **Cultura de tecidos e cruzamentos interespecíficos visando obtenção de haploides em meloeiro**. Tese de doutorado (Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2018, 81p. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/39074>.

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

NAVROSKI, M. C. **Multiplicação in vitro de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Tese de mestrado (Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS. 2011. 101 p. <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/8676>.

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.). **Вавиловский журнал генетики и селекции**, v. 26, n. 2, p. 146-152, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-18>.

NIAZIAN, M.; SHARIATPANAH, M. E. In vitro-based doubled haploid production: recent improvements. **Euphytica**, v. 216, n. 69, 2020. 21 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02609-7>.

REIS, E. O. **Testes para desinfestação de explantes do cacauzeiro visando estabelecimento in vitro**. 2018. 36 f. Monografia (Agronomia – Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/35428>.

SILVA, C. M. de J.; DIAS, R. de C. S.; MELO, N. F. de. The effect of temperature and growth regulators on callus induction in watermelon anthers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, e21180505, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021180505>.

SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 11-37.

TANG, Y.; LI, X.; LI, J.; MA, C.; LAI, J.; LI, H. Effect of different pretreatment on callus formation from anther in balsam pear (*Momordica charantia* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 17, p. 3393-3395, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/JMP11.1752>.

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**, v. 25, n. 1, p. 181-188, 2015. <https://www.researchgate.net/publication/272081287>.

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**, v. 134, n. 1, p. 15-28, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1396-7>.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.588.54>.

Embrapa

Agroindústria Tropical

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA



CGPE 018369