

Técnicas de Propagação para Plantas de Melancia: ferramentas úteis no melhoramento genético da cultura



ISSN 0103-9865
Julho, 2003

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 80

Técnicas de Propagação para Plantas de Melancia: ferramentas úteis no melhoramento genético da cultura

Flávio de França Souza

Porto Velho, RO
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO
Telefones: (69) 222-0014/8489, 225-9386, Fax: (69) 222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Newton de Lucena Costa*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Claudio Ramalho Townsend

Flávio de França Souza

José Nilton Medeiros Costa

Luiz Carlos Coelho de Menezes

Maria das Graças Rodrigues Ferreira

Rogério Sebastião Corrêa da Costa

Vanda Gorete Souza Rodrigues

Normalização: *Alexandre César Silva Marinho*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão: 2003, tiragem: 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia

Souza, Flávio de França

Técnicas de propagação para plantas de melancia : ferramentas úteis no melhoramento genético da cultura / Flávio de França Souza. - Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2003.

18 p. - (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103-9865 ; 80).

1. Fruta - Melhoramento genético. 2. Melancia - Propagação vegetativa. II. Título. III. Série.

CDD 635.6

© Embrapa – 2003

Autor

Flávio de França Souza

Eng. Agrôn., M.Sc, Embrapa Rondônia, Caixa Postal 406,
CEP 78900-970, Porto Velho, RO. Fone: (69)222-0014,
222-8489, 225-9386, Telefax: (69)222-0409.
E-mail: flaviofs@cpafro.embrapa.br

Apresentação

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.] é uma cucurbitácea de grande importância econômica, sendo cultivada em vários países do mundo. No Brasil, em 2000, a área plantada foi de 81.022 hectares e a produção total ficou em torno de 2.147.422 toneladas de frutos (IBGE, 2001).

A chegada dos híbridos importados de melancias sem sementes aos supermercados e feiras livres brasileiras contribuirá para a ampliação do consumo e aumentará a complexidade do mercado nacional dessa fruta. Portanto, seria importante suprir os agricultores de sementes de genótipos adaptados, produtivos e resistentes aos principais estresses bióticos da cultura no Brasil. Atualmente, as sementes importadas tem um custo excessivamente elevado e, em geral, os híbridos apresentam problemas de adaptação. O desenvolvimento de cultivares superiores a partir de germoplasma local surge como uma alternativa interessante.

O processo tradicional de desenvolvimento de híbridos sem sementes apresenta uma série de entraves, os quais resultam em quantidades insuficientes de plantas nas gerações iniciais do melhoramento. Nesse contexto, o conhecimento de técnicas adequadas de propagação vegetativa pode ser útil aos melhoristas.

O presente trabalho tem como objetivo descrever sucintamente as principais técnicas de propagação de plantas de melancia, enfatizando aquelas com maior potencial de aplicação nos programas de melhoramento que visem a obtenção de linhagens tetraplóides e híbridos triplóides.

Newton de Lucena Costa
Chefe Geral Embrapa Rondônia

Sumário

Introdução	9
Aspectos Botânicos da Melanciaira	9
Propagação Sexuada.....	10
Propagação Assexuada.....	10
Enxertia	10
Cultura de Tecidos	11
Referências Bibliográficas	16

Técnicas de Propagação para Plantas de Melancia: ferramentas úteis no melhoramento genético da cultura

Flávio de França Souza

Introdução

Nos últimos anos, tem-se observado o crescimento da participação das cultivares sem sementes (apirênicas), dentro do mercado de melancia. Essas cultivares diferem das tradicionais por apresentarem sementes rudimentares, não lignificadas, que são facilmente consumidas com a polpa do fruto.

As melancias sem sementes são produzidas em plantas triplóides híbridas, cujas sementes são obtidos em frutos de plantas tetraplóides, quando polinizadas por plantas diplóides (Souza, 2000). A ausência de sementes perfeitas nos frutos triplóides deve-se à formação de óvulos inviáveis em função de irregularidades meióticas (Kihara, 1951).

As linhagens tetraplóides de melancia são geralmente obtidas através do tratamento de sementes ou plântulas diplóides com colchicina. Nesse caso, as plantas tetraplóides são autofecundadas e suas progênies são submetidas à seleção e a sucessivos ciclos de autofecundação até que atinjam certo nível de estabilidade (Souza, 2001).

Nas gerações iniciais, o baixo índice de pegamento das polinizações realizadas e o baixo número de sementes obtidas em cada fruto são fatores que põem em risco o êxito do trabalho, uma vez que resultam em progênies constituídas de poucas plantas. Esse problema pode ser contornado utilizando-se meios de propagação vegetativa para promover o aumento do número de plantas e conseqüentemente do número de autofecundações realizadas.

Aspectos Botânicos da Melancieira

A melancia (*Citrullis lanatus* (Thumb.) Matsum. & Nakai) pertence a família *Cucurbitaceae*, da qual também fazem parte espécies como melão, abóbora, maxixe, pepino, e outras de menor importância comercial. É uma planta herbácea, anual, de caule sarmentoso com folhas geralmente lobadas. É uma espécie alógama, porém bastante tolerante à endogamia. As plantas possuem flores simples de sexos separados (monóica), podendo apresentar flores masculinas e hermafroditas (andromonóica), ou ainda os três tipos de flor (ginandromonóica). A polinização é realizada principalmente pelas abelhas.

Existem muitas evidências de que o centro de origem da melancia seja a África Tropical, onde tem sido encontrada em estado selvagem nos dois lados do Equador, embora na Índia seja encontrada grande variabilidade desta espécie (Whitaker & Davis, 1962). A variabilidade genética contida nas sementes trazidas do continente africano pelos escravos, aliada ao processo de manejo da cultura na agricultura tradicional da região, tornou o Nordeste brasileiro um centro secundário de diversificação da melancia (Romão, 1996).

Propagação Sexuada

A principal forma de propagação da cultura é através de sementes, inclusive nas cultivares triplóides (sem sementes).

No caso das cultivares diplóides, a propagação sexuada tem atendido satisfatoriamente a demanda por parte dos produtores, inclusive chegando até estes por um preço compatível com os custos de produção. O mesmo não ocorre com os genótipos sem sementes. Nos Estados Unidos, 1000 sementes de cultivares normais são vendidas ao preço de U\$ 3,00. Este preço pode variar de U\$ 18,00 a 20,00, no caso de cultivares híbridas. No entanto, 1000 sementes de cultivares triplóides, podem custar de U\$ 150,00 a 200,00 (Marr & Gast, 1991).

O elevado custo da semente é geralmente justificado em função da dificuldade de obtenção e manutenção das linhagens tetraplóides a partir de autofecundações, uma vez que elas apresentam altos índices de auto-esterilidade e baixo número de sementes por fruto (Lower e Johnson, 1969). Além disso, as sementes de plantas tetraplóides e triplóides apresentam baixo percentual de germinação (Maynard, 1989).

A baixa germinação das sementes tetraplóides e triplóides encarece a produção dos híbridos triplóides e diminui o interesse dos agricultores pela produção de melancia sem sementes. Outro problema relacionado à germinação consiste na aderência da casca da semente aos cotilédones, que resulta em distorções das plântulas, restringindo efetivamente o número de plantas produtivas (Maynard, 1992).

A causa destes problemas ainda não está bem esclarecida (Yang e Sung, 1994). Muitos estudos têm demonstrado que o fraco desenvolvimento do embrião de poliplóides (Kihara, 1951; Nerson et al., 1985) e a espessa casca da semente (Maynard, 1959) são os fatores causais dos baixos níveis de germinação em melancia poliplóides. Yang e Sung (1994) observaram que a redução da germinação em temperaturas abaixo da ideal pode estar ligada ao lento padrão de desenvolvimento das enzimas do ciclo do glioxilato, tais como a isocitrato liase e a malato desidrogenase. Este estudo também revelou uma relação inversa entre a germinação das sementes e o peso das sementes triplóides.

Algumas técnicas têm sido testadas para amenizar estes problemas. A imersão das sementes em água e posterior secagem das mesmas, mostrou-se o método mais rápido e menos dispendioso, para melhorar a germinação de tetraplóides (Nerson et al., 1985). No caso dos triplóides, tem sido sugerido que as sementes sejam plantadas com o "bico" voltado para cima, formando um ângulo de 45 a 90° com a horizontal. Este procedimento reduz a aderência da casca das sementes aos cotilédones (Maynard, 1989).

Propagação Assexuada

Enxertia

A prática da enxertia em melancia é bastante comum na Europa, sobretudo na Espanha, nos cultivos protegidos durante o período chuvoso. Nesse caso, a principal finalidade da enxertia é evitar o ataque de patógenos de solo, como o fungo *Fusarium oxysporum* e os nematóides. No entanto, as plantas enxertadas geralmente apresentam maior precocidade, maior vigor, frutos maiores e produção superior às plantas não enxertadas (Simonov, 1974; Mijuskovic y Vucinic, 1979).

Os principais porta-enxertos utilizados consistem de variedades e híbridos da espécie *Lagenaria siceraria*, comumente conhecida no Brasil como cabaça ou caxi. No entanto, também têm sido realizados testes com as espécies *Cucurbita pepo*, *C. maxima* e *C. ficifolia* (Marukawa, 1979), sendo que em Valência, Espanha, as plantas enxertadas sobre os híbridos interespecíficos de *Cucurbita* superaram significativamente àquelas enxertadas em *Cucurbita moschata*, *Lagenaria siceraria* e *Citrullus*. Alguns casos de incompatibilidade entre melancia e *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita maxima* foram relatados (Suzuki, 1972; Marukawa, 1979).

Os principais métodos de enxertia empregados em melancia são a encostia e a garfagem. Outros métodos, como a enxertia de perfuração lateral, a enxertia de cunha e a garfagem lateral também são mencionados.

Para proceder a encostia deve-se fazer uma incisão longitudinal abaixo dos cotilédones nas plântulas de melancia e do porta-enxerto, as quais serão unidas nessa região e envolvidas com fita apropriada. Os dois sistemas radiculares devem ser mantidos até que ocorra a cicatrização do enxerto. As plântulas devem ser sombreadas para estimular o alongamento. Após a cicatrização (cerca de 10 dias) serão removidas a parte aérea do porta-enxerto e o caule e as raízes da plântula de melancia (Chavagnat, 1972; Suzuki, 1972).

Na garfagem, a plântula de melancia a ser enxertada é seccionada a cerca de 1,5 cm abaixo dos cotilédones e a extremidade do caulículo é cortada em formato de cunha (bisel). O porta enxerto é então seccionado à altura dos cotilédones, entre os quais efetua-se um corte longitudinal de 1,0cm a 1,5cm. A extremidade do enxerto é inserida na fenda do porta enxerto e a região é envolvida com fita apropriada (Suzuki, 1972).

Em vários ensaios realizados, não foram verificadas diferenças consideráveis entre os métodos de enxertia, com relação à produção de frutos e precocidade. No entanto, a encostia tem demonstrado maior pegamento e menor exigência com relação ao controle da temperatura e da umidade, sendo portanto mais flexível. A garfagem tem a vantagem de não exigir manipulação posterior, como o corte da base do enxerto e a decapitação do porta-enxerto (Miguel, 1993) .

Cultura de Tecidos

Tendo em vista os problemas apresentados pelos genótipos poliplóides, relacionados à fertilidade das plantas e à germinação das sementes, é notório que o emprego de um método adequado de propagação assexuada das plantas tetraplóides, que possibilite a obtenção de um grande número de clones por vez, garantirá o aumento proporcional de frutos e sementes, assegurando assim a manutenção e a multiplicação das linhas, e conseqüentemente a redução do custo das sementes triplóides (Compton & Gray, 1992; Compton et al., 1993). Uma alternativa seria a propagação *in vitro* das plantas triplóides, para comercialização direta das mudas junto aos produtores (Barnes, 1979). Uma outra vantagem do emprego da reprodução assexuada na melancia seria a possibilidade de utilizar a macho esterilidade nas linhas tetraplóides, para a produção de sementes triplóides, sem a necessidade de linhas mantenedoras (Compton e Gray, 1992).

Por outro lado, a introdução de novos caracteres em melancia através da manipulação genética é uma atividade potencial de grande valor, especialmente em se tratando de genes que conferem resistência a doenças e pragas (Dong & Jia, 1991). Todavia, o uso de técnicas de cultura de células ou tecidos depende do desenvolvimento de um sistema eficiente de regeneração de plantas *in vitro*. Além disso, Compton & Gray (1994) asseguram que a regeneração também pode ser usada como um método eficiente de propagação de plantas tetraplóides, promovendo urna taxa mínima de variação somaclonal.

Micropropagação

Alguns protocolos têm sido testados para micropropagação de melancia, visando ao estabelecimento de um processo eficiente de produção em massa de mudas, sobretudo para os genótipos tetraplóides e triplóides. No caso das cultivares triplóides, as tentativas têm sido prejudicadas pela baixa proliferação de gemas e baixo desempenho das plantas com relação ao enraizamento e à aclimação (Compton e Gray, 1992).

Barnes (1979), utilizou a cultivar diplóide Charleston Gray para testar uma metodologia de micropropagação que visava ao uso de gemas apicais de plântulas de melancia germinadas em meio asséptico. Nessa ocasião, as sementes foram imersas por uma noite em água destilada e desinfetadas superficialmente em peróxido de hidrogênio a 10 % por 15 min, lavadas três vezes com água destilada estéril e germinadas no escuro a 30 °C, em placas de Petri esterilizadas. Quando os cotilédones expulsaram a casca da semente, entre sete e dez dias, as plântulas foram desinfetadas com Chlorox a 10 % por 10 min e depois lavadas três vezes com água destilada estéril. Os explantes foram preparados fazendo um corte transversal no hipocótilo, imediatamente abaixo da inserção do cotilédone, removendo a radícula. Um dos cotilédones foi eliminado, resultando em um explante facilmente manipulável, composto da gema apical (epicótilo 1-3 mm) e o cotilédone remanescente. O explante foi colocado em 20 ml de meio basal L&S (Linsmaier e Skoog, 1965 *apud* Barnes, 1979) em vasos com capacidade para 125 ml. O meio foi suplementado com: 100 mg/l de mio-inositol; 100 mg/l de monofosfato de sódio; 30 mg/l de sacarose; cinetina e ácido indolacético, como especificado para cada estágio de propagação (Tabela 1). O pH foi ajustado para 5,5 com NaOH 1M antes da adição de 8 mg/l de ágar. O meio foi autoclavado por 3 min para dissolver o ágar, despejado em balões e depois autoclavado por 20 min a 1,05 kg/cm² e 125 °C.

Como resultado, Barnes (1979) percebeu que as gemas de plântulas (1-3 mm) com um cotilédone produziram uma média de $4,5 \pm 1,4$ brotos axilares de tamanho suficiente para repicagem depois de cinco semanas em cultura. Os estágios adicionais de repicagem, usando gemas axilares e apicais resultaram em uma média de 2,6 brotos axilares por explante depois de 35 dias.

Para aumentar o número de brotações obtidas, os níveis de cinetina e sacarose foram aumentados. O número máximo de gemas em 35 dias foi obtido com $9,29 \mu\text{mol/l}$ de sacarose a 3 %. Em geral, altos níveis de sacarose resultaram em um maior número de brotos curtos, enquanto, níveis mais altos de sacarose resultaram num reduzido número de brotos longos. Barnes (1979) comenta que em outros experimentos, os níveis de cinetina maiores que $25 \mu\text{mol/l}$ reduziram o número e o comprimento de brotos axilares alongados, muitos dos quais foram deformados.

Tabela 1. Esquema simplificado para micropropagação comercial de melancia.

	Estádio			
	I	I...n	II	III
	Multiplicação inicial	Multiplicação adicional	Enraizamento e preparação para transferência	Estabelecimento do transplante
Explante	Gema apical das plântulas (1-3 mm)	Gemas axilares e apicais (> 10 mm)	Gemas axilares (> 15 mm)	Plântulas (> 25mm)
Duração	5 semanas	5 semanas	3 semanas	3 semanas
Meio	Nutriente e ágar (L&S)	Nutriente e ágar (L&S)	Substrato com solução nutritiva e vermiculita	1:1 <i>peat</i> e areia
Reguladores de crescimento	4,4 $\mu\text{mol/l}$ de K 0,28 $\mu\text{mol/l}$ de AIA	9,3 $\mu\text{mol/l}$ de K 0,28 $\mu\text{mol/l}$ de AIA	11,5 $\mu\text{mol/l}$ de AIA	Apenas endógenos
Condições de cultura	Cultura estéril 1000-2000 lux; 28 \pm 5°C	Cultura estéril 1000-2000 lux; 28 \pm 5°C	Cultura estéril 1000-2000 lux; 28 \pm 5°C	Cultura não estéril 10.000 lux; 27 \pm 3°C (dia) 21 \pm 3°C (noite)

Fonte: Barnes, 1979.

Broto maiores que 20 mm de comprimento foram induzidos ao enraizamento durante o estágio II em duas a três semanas em meio L & S líquido com 11,5 $\mu\text{mol/l}$ de AIA, mas, sem cinetina e ágar. O uso de meio líquido com substrato de vermiculita para suporte e aeração dos brotos durante o estágio II resultou em um sistema de enraizamento significativamente superior ($P < 0,05$), com melhor ramificação e pêlos radiculares maiores do que quando cultivados em ágar a 0,4-1,2 %. Além disso, houve menos danos às raízes quando retiradas da vermiculita do que quando retiradas do ágar e também maior sobrevivência de explantes quando transferidos para a mistura de *peat* + areia. O aumento da intensidade luminosa para 10.000 lux durante este estágio resultou em considerável crescimento durante a cultura, produzindo plântulas que puderam ser transferidas com sucesso para o estágio III.

O estágio III, estabelecimento dos transplantes, envolveu a transferência de plantas vigorosas e bem enraizadas para uma mistura de *peat* + areia, na proporção de 1:1 (v/v). As tentativas de manter a alta umidade usando *mist* intermitente resultou em baixa sobrevivência de explantes. As plantas puderam ser estabelecidas com sucesso em casa de vegetação através do sombreamento parcial, cobrindo com um plástico claro para manter a alta umidade. Depois de uma semana, as capas foram parcialmente levantadas e inclinadas permitindo a circulação do ar, e depois removidas por 5 a 6 h por dia. As capas foram completamente removidas daquelas plântulas que se apresentavam vigorosas e sem sinais de murcha. Estes transplantes precisaram de duas a três semanas de crescimento antes de serem plantados no campo. Os custos projetados foram estimados em U\$ 0,16 por muda para um volume de 10000 mudas por semana, incluindo as despesas com laboratório e equipamento, mão de obra e aluguel da casa de vegetação.

Helmle-Janosi et al. (1992), na Hungria, realizaram um experimento semelhante ao de Barnes, utilizando a cultivar triplóide *Erwyn* (Takii Seeds, Japan). Neste caso, plântulas de 14 dias foram sujeitas a uma esterilização por 10 min em hipoclorito de sódio a 10 % da formulação comercial. O meio utilizado consistiu de MS com macro (meia concentração) e micro elementos, suplementado com 100 mg/l de mio-inositol, 0,1 mg/l de tiamina (HCl), 0,5 mg/l de piridoxina (HCl), 30 g/l de sacarose e 7 g/l de ágar, como também 0,1 mg/l de ANA e 1,0 a 7,5 mg/l de BAP. O pH foi ajustado para 5,7-5,8 com NaOH 5N ou HCl antes da autoclavagem (por 18 min a 121 °C e 1,1 kg/cm²). As culturas foram incubadas em uma sala de crescimento a 25-27 °C com 16/8 h de fotoperíodo. A fonte de luz utilizada foram lâmpadas fluorescentes tubulares brancas provendo 2.500 lux ao nível da cultura.

Os autores observaram que na ausência de hormônios, o crescimento dos brotos e a formação das raízes foram mantidos. Além disso, o tamanho do explante exerceu um importante efeito na proliferação de brotos. Os explantes maiores que 0,5 cm garantiram as melhores taxas de proliferação no meio MS na presença de 0,1 mg/l de ANA e 1,0 mg/l de BAP. Os explantes menores que 0,5 cm apresentaram inclinação à formação de calo, como também de brotos curtos. O enraizamento foi realizado em meio MS com metade da concentração e na ausência de reguladores de crescimento, ou pelo uso de irradiação indutiva.

Compton e Gray (1992) testaram dois métodos de micropropagação em plantas de melancia. O primeiro, através de brotações coletadas em plântulas germinadas *in vitro* e o segundo utilizando explantes extraídos de plantas cultivadas em casa de vegetação.

No primeiro caso, sementes de melancia triplóides ('King of Hearts', 'Jack of Hearts' e 'CFREC 894') e tetraplóides ('SP90-1', 'SP90-2' e 'SP90-4') foram desinfetadas superficialmente por 30 min em NaOCl a 2,5 % (com uma gota de detergente por 100 ml), lavadas cinco vezes com água destilada estéril e imersas por 5 h em água destilada estéril. As cascas das sementes foram removidas e os embriões foram desinfetados superficialmente por 20 min em NaOCl a 1,25 % (com uma gota de detergente por 100 ml) e depois lavadas 6 vezes com água destilada estéril. Os embriões (nove por vaso) foram inoculados em meio MS modificado em vasos Margenta GA7 que continham 50 ml de meio. O pH foi ajustado antes da

adição de ágar e autoclavado a 121 °C e 98 kPa por 15 min. Depois de 28 dias, explantes de pontas de gemas de 1 cm de comprimento e pelo menos um nó foram extraídos das plântulas germinadas e inseridas verticalmente no meio de mesma composição. Explantes (5 por vaso GA7) foram subcultivados para meio fresco a cada quatro semanas durante três meses. Todas as culturas foram incubadas sob 16 h de fotoperíodo (30-50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de lâmpadas fluorescente brancas) a 25 °C.

No segundo caso, gemas de 2 cm de 'Mickylee 4' e 'Dixielee-1' (tetraplóides regenerantes de cultura de cotilédones de 'Mickylee' e 'Dixielee' diplóides) foram extraídas de plantas maduras cultivadas em casa de vegetação. Todas as folhas expandidas e botões florais visíveis foram removidos e as brotações (2 cm) foram desinfetadas superficialmente em NaOCl a 1,25 % mais duas gotas de detergente por 5 min, lavadas seis vezes com água destilada estéril e secas ao ar em câmara de fluxo laminar por 10 a 15 min. Todos os botões florais e folhas remanescentes foram removidos sob a lupa. Gemas contendo o meristema apical e 1-2 primórdios foliares foram extraídas e cultivadas em MS modificado como descrito anteriormente, mas com 1,7 μM de ácido indolacético, 0,46 μM de cinetina e 0,29 μM de ácido giberélico (GA_3). As gemas foram transferidas para meio contendo 1 μM de BAP após atingirem 1 cm de altura e subcultivados para meio de mesma composição a cada três semanas.

Brotações (5-30 mm) oriundas dos dois métodos foram extraídas de explantes proliferados. Todas as folhas foram removidas antes de transferidas para o meio de enraizamento (MS como descrito anteriormente, mas com 20 g/l de sacarose e 5 μM de AIB). Duas semanas depois, as gemas enraizadas foram transplantadas em bandejas preenchidas com meio autoclavado (1 ProMix: 1 vermiculita grossa), coberta com uma tampa clara de plástico e incubadas em um fotoperíodo de 16 h (30-50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) a 24 ± 3 °C. Depois de uma semana sob alta umidade, as plantas foram aclimatadas pela remoção gradual da tampa, durante cinco dias. As plantas aclimatadas foram levadas à casa de vegetação e três semanas depois transferidas para o solo. O número de plantas aclimatadas em condições ambientais foi registrado depois de uma semana em casa de vegetação.

O híbrido '*Jack of Hearts*' apresentou a maior taxa de proliferação de gemas, enquanto o 'CFREC 894' apresentou a menor taxa. Observou-se também que a percentagem de enraizamento foi diretamente inversa à taxa de brotação. Não houve diferença significativa na taxa de brotação entre os diferentes genótipos ou fontes de explantes tetraplóides. Também nenhum decréscimo significativo do número de gemas por explante foi observado durante três meses de cultivo. Também foi observado que as plantas tetraplóides micropropagadas *in vitro* apresentaram igual desempenho quando comparadas com plantas propagadas por sementes, no que diz respeito ao vigor das ramas e fertilidade.

Baseando-se nas taxas observadas no brotamento, enraizamento e percentagens de plantas aclimatadas, Compton e Gray (1992) concluíram que seriam necessários cerca de seis a oito meses para micropropagar uma quantidade suficiente de indivíduos tetraplóides (cerca de 13.000) para a produção comercial de sementes triplóides (cerca de 60 kg) nos Estados Unidos, ao custo de U\$ 0,26 por planta tetraplóide aclimatada (começando com 225 explantes). Isto reduziria o custo da semente triplóide, fazendo a produção de melancia sem sementes uma atividade viável.

Compton et al (1993) repetiram o método de micropropagação através de explantes obtidos *in vitro* usando plantas diplóides e tetraplóides. Neste caso, conseguiu-se reduzir para 21 dias o período para a primeira repicagem.

Regeneração

Algumas tentativas de regeneração de plantas de melancia têm sido feitas. Blackmon e Reynolds (1982) tentaram induzir a formação de gemas em explantes de folhas e/ou cotilédones de melancia em dois meios. A cultivar usada exibiu baixíssimos níveis de diferenciação a partir dos cotilédones.

Anghel e Rosu (1985) relataram que a formação de gemas ocorreu quando os cotilédones de plantas diplóides e tetraplóides foram incubados em meio MS com 4,4 a 10,4 μM de BAP, sozinho ou complementado com 0,1 a 0,45 μM de 2,4-D, ou 0,1 μM de AIA, ou 0,98 μM de AIB. Porém, a porcentagem de explantes com brotos e o número de brotos por explante não foram informados.

Srivastava et al. (1989) compararam respostas morfogenéticas em explantes de cotilédones e hipocótilos da cultivar Melitopolski. As sementes foram assepticamente germinadas em meio MS básico. Para assegurar a uniformidade e acelerar a germinação, os frascos foram mantidos no escuro por 72 h a 28 °C. As sementes germinadas foram transferidas para a saia de crescimento sob 16 h de fotoperíodo. Depois de sete dias, quando as plântulas estavam verdes, mas os cotilédones estavam parcialmente desenrolados eles foram utilizados. Os explantes foram preparados assepticamente removendo a plântula e cortando discos ($\varnothing = 5$ mm) ou seções alongadas do hipocótilo (0,5-1,0 cm). Estes explantes formaram calos no meio usado e brotos ou gemas puderam ser produzidos apenas a partir de explantes cotiledonares após a formação de calo em meio suplementado com 4,5 μM de BAP.

Dong e Jia (1991) usaram, com sucesso, um sistema de regeneração de plantas em oito cultivares de melancia, que consiste basicamente de três fases: a indução direta de brotações, alongamento de brotos e enraizamento. Neste método, as sementes são descascadas e o embrião é desinfetado superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 0,5 % por 30 mm e lavado três vezes em água destilada estéril. Os embriões são colocados em meio MS, com metade da concentração (meio 1), para germinação e deixados sob fotoperíodo de 8/16 horas com luminosidade de 55-65 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ e temperatura de 27 ± 1 °C. Os cotilédones de plântulas de cinco dias de idade são cortados e colocados em meio MS suplementado com 5,0 mg/l de BAP e 0,5 mg/ de AIA (meio 2) para indução de brotos. Depois de duas semanas neste meio, os explantes com múltiplas gemas são repicados e colocados em meio MS contendo 0,2 mg/l de cinetina (meio 3) para alongamento dos brotos. Os brotos longos são cortados e inoculados em meio MS contendo 0,1 mg/l de ANA para enraizamento. Todos os meios continham 3 % (p/v) de sacarose e 0,85 % (p/v) de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

No meio 1, os cotilédones aumentaram de tamanho durante os primeiros meses de cultura. Múltiplas brotações foram diferenciadas sem a formação de calo após 10 dias. As gemas originaram-se do tecido ao redor da região vascular no lado ferido do cotilédone.

Compton & Gray (1993) relataram sobre a organogênese e regeneração de plantas diplóides, triplóides e tetraplóides de melancia, a partir de explantes de cotilédone. Nesta experiência, as sementes foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio 2,5 % por 30 mm e lavadas cinco vezes com água destilada estéril. Os embriões foram extraídos e desinfetados com hipoclorito de sódio 0,75 % por 10 mm e depois lavados seis vezes. Os embriões foram colocados em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose, 100 mg/l de mio-inositol, 2 mg de glicina, 0,5 mg de piridoxina, 0,5 mg de ácido nicotínico e 0,1 mg de tiamina. O pH foi ajustado para 5,7 antes da adição de 7 g/l de ágar e da autoclavagem.

Foram utilizados explantes de cotilédones retirados de plântulas de cinco dias. As margens dos cotilédones eram descartadas e os explantes foram cultivados com a região abaxial em contato com o meio contendo concentrações testes de reguladores de crescimento durante seis meses sob 16 h de fotoperíodo (30 a $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e 25°C . Os explantes foram repicados a cada três semanas e colocados em meio com a mesma composição

Com relação à organogênese, a habilidade de explantes cotiledonares dos três genótipos para formar brotos, depende da presença de BAP no meio, mas sua concentração não foi crítica para alterar a percentagem de explantes com gemas e o número de gemas por explante. Porém, o híbrido triplóide 'SP90-1' só formou gemas quando cultivado em meio com $20 \mu\text{mol}$ de BAP. A adição de AIA ao meio, inibiu drasticamente a organogênese nos genótipos testados.

A formação de gemas foi melhor entre os explantes preparados a partir da região basal do cotilédone ou de cotilédones cortados longitudinalmente. No caso destes últimos, observou-se que as brotações surgem apenas da região basal.

A percentagem de explantes oriundos de plântulas de cinco dias que formaram brotos foi superior àquela dos explantes de plântulas de 10, 20 dias e embriões não germinados. Além disso, o número de brotos por explante, também foi superior nos primeiros. Os autores comentam ainda que folhas de 21 dias falharam em regenerar brotos e que embora as células sejam competentes para formar brotos em qualquer idade, nos genótipos testados as células tornaram-se competentes entre cinco e 10 dias após a germinação.

A percentagem de explantes com brotos e o número de brotos por explante foram mais elevados quando o meio foi suplementado com BAP (5 a $10 \mu\text{M}$), em comparação com o uso de cinetina ($20 \mu\text{M}$) e thidiazuron ($0,1 \mu\text{M}$). Muitos dos brotos formados em meio com altas concentrações de BAP ou TDZ apresentaram anormalidades e/ou vitrificaram. Os brotos incubados em cinetina eram alongados e facilmente manipuláveis, porém houve prejuízo na formação de gemas.

Os resultados apresentados por estes autores diferem daqueles apresentados por Dong & Jia (1991) com relação à composição do meio em termos das quantidades de BAP e AIA. Estas diferenças podem ser devidas aos diferentes genótipos utilizados.

Compton & Gray (1994) realizaram um experimento semelhante ao descrito anteriormente, usando apenas genótipos tetraplóides. Procedeu-se de forma semelhante para a desinfestação dos explantes, porém os embriões foram tratados com hipoclorito de sódio a $1,25\%$ por 20 mm e germinados em meio da mesma composição descrita por Compton & Gray (1993). As variáveis analisadas foram a idade das plantas para retirada do explante (2 a 10 dias após a germinação) e o genótipo. Depois de quatro semanas no meio para alongamento, os brotos maiores que 5 mm foram cortados e colocados em meio MS para enraizamento contendo 20 glidade sacarose e $1 \mu\text{M}$ de AIB por três semanas.

Foi observado que os genótipos testados e a idade do material usado para a preparação dos explantes interagem significativamente para a percentagem de explantes que produziram explantes. Em geral, a maioria dos explantes organogênicos foram aqueles obtidos em plantas de 2 a 4 dias de idade germinadas *in vitro*. Porém, a idade ótima pode variar em um a dois dias para cada genótipo. Este resultado difere daquele obtido com genótipos diplóides, que sugere que plântulas de 5 a 7 dias são mais responsivas (Srivastava et al., 1989; Dong & Jia, 1991; Compton & Gray, 1993).

Referências Bibliográficas

- ANGHEL, I.; ROSU, A. In vitro morphogenesis in diploid, triploid and tetraploid genotypes of watermelon - *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. **Rev. Roum. Biol. Végét.**, v. 30, p. 43-55, 1985.
- BARNES, L. R. In vitro propagation of watermelon. **Scientia Horticulturae**, v. 11, p. 223-227, 1979.
- BLACKMON, W. J.; REYNOLDS, B. D. **HortScience**, n. 17, v. 4, p. 588-589.
- COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. ; ELMSTRONG, G. W. A simple protocol for micro propagating diploid and tetraploid watermelon using shoot tip explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 211-217, 1993.
- COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Micropropagation as a mean of rapidly propagating triploid and tetraploid watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v. 105, p. 352-354, 1992.
- COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 118, p. 151-157, 1993.
- COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. **HortScience**, n. 29, v. 3, p. 211-213, 1994.
- DIAS, R. de C. S.; COSTA, N. D.; FARIA, C. M. B. **Cultura da melancia**. In: CURSO DE HORTALIÇAS IRRIGADAS DO NORDESTE, 4., 1997, Petrolina. **Apostila...** Petrolina: Embrapa-Semi-Árido, 1997. p. 8.
- DONG, J. Z.; JIA, S. R. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) **Plant Cell Report**, v. 9, p. 559-562, 1991.
- HELMLE-JANOSI, M.; MATHE, A.; MOZSAR, K. Contribution to the micropropagation of triploid watermelon. **Acta Horticulturae**, v. 300, p. 163-168, 1992.
- IBGE. **Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cginbin>> . Acesso em: 20 dez. 2001.
- KIHARA, H. Triploid watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.58, p.217-230, 1951.
- LOWER, R. L.; JOHNSON, K. W. Observations on sterility of induced autotetraploid watermelons. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.91, n.4, p.367-369, 1969.
- MARR C. W.; GAST K. L. R. Reactions by consumers in a "farmers" market to prices for seedless watermelon and ratings of quality. **HortTechnology**, v. 1, p. 105-106, 1991.
- MARUKAWA, S. 1979. Studies on varieties of *Cucurbita* spp. as rootstocks for cucurbitaceous vegetables, with special reference to their grafting compatibility. **Bulletin of Ibaraki-ken Horticultural Experiment Station Special Issue**, n. 5, 1979.
- MAYNARD, D. N.; ELMSTROM, G. W. Triploid watermelon production practices and varieties. **Acta Horticulturae**, v. 318, p. 169-178, 1992.

MAYNARD, D. N. Triploid watermelon seed orientation affects seed coat adherence on emerged cotyledons. **HortScience**, v. 24, n. 4, p. 603-604, 1989.

MIGUEL, A. **El injerto herbáceo como método alternativo de control de enfermedades telúricas y sus implicaciones agronómicas**. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 1993. 127 p. Tese de doutorado.

MIJUSKOVIC, M.; VUCINIC, Z. Fusarium wilt of watermelon in Montenegro and the possibility of its control. **Review of plant path**, n. 58, 1979.

NERSON, H.; PARIS, H. S.; KARCHI, Z. Seed treatments for improved germination of tetraploid watermelon. **HortScience**, v. 20, n. 5, p. 897-899, 1985.

ROMÃO, R. L. **Dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai em três regiões do Nordeste brasileiro**. Piracicaba: USP-ESALQ, 1996. 75 p. Tese de Mestrado.

SIMONOV, D. 1974. The grafting of some varieties of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad) on Lagenaria sp. for early yield in the Skopje region. **Zbornik Zemjodelski Inst. Skopje**, 10.

SOUZA, F. de F. **Desenvolvimento e avaliação de híbridos triplóides de melancia (*Citrullus lanatus* Thunb. Mansf)**. Recife: UFRPE, 2000. 121 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pernambuco.

SOUZA, F. de F.; QUEIRÓZ, M. A.; DIAS, R. C. S. Desenvolvimento de híbridos triplóides experimentais de melancia. **Sitientibus**, Feira de Santana, BA, v. 1, n. 2, p.1 54-160, 2001.

SOUZA, F. de F.; QUEIRÓZ, M. A. de; DIAS, R. de C. S. Melancia sem sementes: Desenvolvimento e avaliação de híbridos triplóides experimentais de melancia. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p. 90-95, jul./ago. 1999.

SRIVASTAVA, D. R.; ANDRIANOV, V. M.; PIRUZIAN, E. S. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 300-302, 1989.

WHITAKER, T. W; DAVIS, G N. **Cucurbits**. New York: Interscience publishers, 1962. 250 p.

YANG, M. L.; SUNG, F. M. J. The effect of suboptimal temperature on germination of triploid watermelon seeds of different weights. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 485-493, 1994.

Embrapa

Rondônia

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

