



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**

**CARLA MARIA DE JESUS SILVA**

**INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS E POLIPLOIDIA EM  
GENÓTIPOS DE MELANCIA**

**CARLA MARIA DE JESUS SILVA**

**INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS E POLIPLOIDIA EM  
GENÓTIPOS DE MELANCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana/BA, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Souza Dias

Feira de Santana – BA  
2018

### **Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado**

S579i Silva, Carla Maria de Jesus  
Indução de calos em anteras e poliploidia em genótipos de melancia /  
Carla Maria de Jesus Silva. - 2018.  
96 f.: il.

Orientador: Nataniel Franklin de Melo.


Coorientadora: Rita de Cássia Souza Dias.

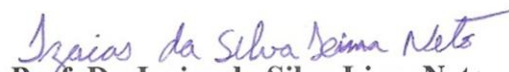
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.


1. Melancia – Melhoramento genético. I. Melo, Nataniel Franklin de,  
orient. II. Dias, Rita de Cássia Souza, coorient. II. Universidade Estadual de  
Feira de Santana. III. Título.

CDU: 635.615

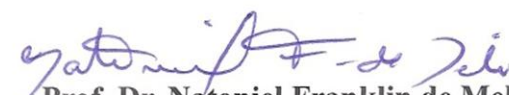
**BANCA EXAMINADORA**

  
**Profa. Dra. Joice Simone dos Santos**  
**(EMBRAPA Semiárido)**

  
**Prof. Dr. Izaias da Silva Lima Neto**  
**(Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF)**

  
**Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiroz**  
**(Universidade do Estado da Bahia - UNEB)**

  
**Prof. Dr. José Geraldo de Aquino Assis**  
**(Universidade Federal da Bahia - UFBA)**

  
**Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo**  
**(EMBRAPA Semiárido)**  
**Orientador e Presidente da Banca**

Ao Deus eterno, seja glória! A minha fortaleza, porque Ele esteve comigo em cada segundo, minutos, horas, dias, meses e anos.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS! Autor da minha fé, Dono de toda ciência, sabedoria e poder! Pelo dom da vida, sabedoria, inteligência, paciência, alegria, força, consolo e paz que me concedeu durante todo esse período de quatro anos. Pela Sua proteção e misericórdia, por ouvir e responder as minhas orações, principalmente nos momentos de preocupações e aflições, me trazendo paz, perseverança e esperança.

A minha família, especialmente aos meus pais Mário Antonio (in memoriam) e Odete Maria que me educaram com seus bons exemplos de cristãos, cidadãos, pais, pessoas e profissionais. Por me motivarem e incentivarem a avançar nos meus estudos, além de todo amor, dedicação e carinho.

Ao meu esposo Silvio Jayro pela cumplicidade, convivência, companheirismo, amor, cuidado e paciência. Além de ter se dedicado a educar e cuidar do nosso filho com todo amor e carinho para que eu pudesse concluir esta etapa da minha vida.

Ao meu filho Vitor Silva que mesmo tão pequeno compreendia a minha ausência e sempre foi amável e carinhoso comigo.

Aos meus irmãos, Cleiton, Queila, Kelly e sobrinhos: Alice, Karoline, Lucas e Livia por simplesmente fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador Dr<sup>o</sup> Nataniel Franklin de Melo, pela oportunidade, orientação, profissionalismo e comprometimento com o desenvolvimento do trabalho, além da paciência, ensinamentos e conselhos valiosos, apoio e confiança.

A Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Souza Dias que me orientou desde a graduação, sempre acreditando no meu trabalho, incentivando e torcendo para que obtivéssemos sucesso em cada etapa. Pelo comprometimento com a pesquisa e pelo suporte que me forneceu para o desenvolvimento do trabalho. Além de suas palavras contagiantes de carinho, paciência, cuidado e amizade.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Manoel Abílio de Queiroz que mesmo sendo muito ocupado, sempre foi atencioso, se disponibilizando a ensinar, orientar e esclarecer as minhas dúvidas.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Izaias da Silva Lima Neto pela consideração, atenção, amizade, conselhos e ensinamentos.

A Ângela Katiuscia, uma profissional altamente comprometida, trabalhando em tudo com muita dedicação e excelência! Tenho a honra de poder dizer que és minha amiga-irmã que com todo amor, me ensinou a trabalhar com excelência em um Laboratório de Biotecnologia, desde a organização até uma análise final. Além de estar comigo nos momentos de alegrias e tristezas, vibrando, comemorando, consolando, motivando e orando.

A minha amiga Angélica Ricarte que em todos os momentos de dúvidas me auxiliou nas análises estatísticas, ensinando e ajudando-me para que tudo fosse feito com excelência.

A Maiany e Irlane que estiveram sempre comigo, discutindo resultados, estatística e trocando experiências na cultura de tecidos, citogenética e molecular.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido pelo companheirismo, amizade e momentos felizes. Em especial a Francisco, Hugo Leonardo, Maria do Socorro Coelho, Jéssica Coelho, Leila, Bruna Lais, Evelyn, Larissa Emannuely, Pedro, Rúbia, Simone, Jéssica Oliveira, enfim a todos que tive o imenso prazer de conhecer.

A Joice Simone (Equipe de Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia) que me ajudou, incentivou e trabalhou juntamente comigo nos experimentos finais com sua força, dedicação e orientação.

Aos amigos da turma de Recursos Genéticos Vegetais pela amizade e troca de experiências. Em especial a Emily e a Danilo Olegário, os quais, tive o imenso prazer de conhecer e nos tornarmos amigos.

A Cícero, Chiquinho, Antonio e Almério do Campo Experimental em Bebedouro da Embrapa Semiárido que me ajudaram nos experimentos de campo com sua força e ensinamentos diários.

A Banca examinadora composta para avaliação deste trabalho pelas sugestões e considerações.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de auxílio financeiro.

A Universidade Estadual de Feira de Santana/BA e ao Programa de Pós-graduação pela oportunidade e apoio.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UEFES pelos ricos ensinamentos e experiências transmitidas.

A Embrapa Semiárido por permitir a realização dos experimentos em suas instalações e fornecer todo o material necessário para realização deste.

**Muito obrigada!!!**

## RESUMO

A melancia (*Citrullus lanatus*) é uma hortaliça muito importante para a região Nordeste do Brasil por sua adaptação as condições climáticas e pelas boas características de fruto que se obtém. Os objetivos desse trabalho foram avaliar as respostas de genótipos de melancia quanto à indução de calos em anteras utilizando reguladores de crescimento e temperatura; e induzir a poliploidia mediante o uso da colchicina em diferentes concentrações, tempos de exposição, escarificação mecânica e métodos de aplicação. Anteras das linhagens de Smile e Sugar Baby foram inoculadas em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D ou BAP com 2,4-D, associado ao pré-tratamento (baixa temperatura). Para indução de poliploidia, sementes da cultivar Crimson Sweet foram tratadas com diferentes concentrações de colchicina, em dois tempos, com e sem escarificação. Para a linhagem LDRO, utilizaram-se diferentes concentrações de colchicina em dois tempos e métodos de aplicação: a) Método direto na semente (com escarificação e sem escarificação) (MDS, CE e SE), b) Método da semente com emissão da radícula (MER), c) Método no ponto de inserção do hipocótilo e raiz (MIHR), d) Método no ápice da plântula (MAP) e e) Método do hipocótilo invertido (MHI). Na indução de poliploidia em botões florais de Crimson Sweet utilizou-se colchicina em dois tempos. Os resultados mostraram que o 2,4-D induziu a maior frequência de calos nas duas linhagens, a interação BAP com 2,4-D e o pré-tratamento, não aumentaram a frequência de indução. Para Crimson Sweet, o maior percentual de indução foi obtido com colchicina a 0,2% por 48 h, SE. Para LDRO, observou-se uma frequência de plantas com células tetraploides com colchicina a 0,2% por 24 h e 48 h. Nos métodos 0,2% MDS CE e MHI observou-se também plantas com células tetraploides. Em botões florais, o diâmetro dos grãos de pólen tratados aumentou; o maior percentual de indução de gametas não reduzidos foi de 16,07% e; o diâmetro em torno de 1,5 mm do botão floral foi estimado como adequado para indução.

**Palavras-chave:** Calogênese em anteras. Citogenética. *Citrullus lanatus*. Gametas não reduzidos. Melancia sem semente. Viabilidade polínica em melancia.



## ABSTRACT

The watermelon (*Citrullus lanatus*) is a very important vegetable for a region of Northeast Brazil due to its adaptation as the natural conditions and the good characteristics of the fruit that are obtained. The aims of the current study are to assess watermelon genotype responses to calluses in anthers by using growth and temperature regulators, and to induce polyploidy through colchicine use (at different concentrations), exposure time, mechanical scarification and application methods. Anthers of Smile and Sugar Baby lines were inoculated in MS medium at different concentrations of 2.4-D or of BAP with 2.4-D, in combination with the pre-treatment (low temperature). Crimson Sweet cultivar seedlings were treated with different colchicine concentrations at two different times, with and without scarification, in order to induce polyploidy. Line LDRO was subjected to different colchicine concentrations at two different times and application methods: a) direct in the seed method (with, and without, scarification) (DSM, WE and WOE), b) Radicle emission method (ERM), c) Hypocotyl and root insertion point method (HRIM), d) At the apex of the seedling method (ASM) and e) Inverted hypocotyl method (IHM). Crimson Sweet flower buds were subjected to colchicine, at two different times, in order to induce polyploidy. Results have shown that 2.4-D often induced callus formation in both lines, but BAP/2.4-D interaction and pre-treatment did not increase the induction frequency. Crimson Sweet showed higher induction rate at 0.2% colchicine for 48h, WE. Line LDRO presented plants with tetraploid cells at 0.2% colchicine for 24 and 48h. The method 0.2% DSM, WE and WOE also generated plants with tetraploid cells. The diameter of treated pollen grains in flower buds have increased; the higher rate of non-reduced gametes induction was 16.07% and flower bud diameter (1.5mm) was estimated as adequate for induction.

**Keywords:** Calogenesis in anthers. Cytogenetics. *Citrullus lanatus*. Unreduced gametes. Seedless watermelon. Pollen viability in watermelon.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	11
<b>CAPÍTULO 1- EFEITO DA TEMPERATURA E DO USO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE MELANCIA</b>	30
<b>1.1 Introdução</b>	33
<b>1.2 Material e Métodos</b>	35
1.2.1 Material vegetal	35
1.2.2 Viabilidade polínica	35
1.2.3 Coleta, desinfestação e condições da cultura de anteras	35
1.2.4 Avaliações e análises estatísticas	36
<b>1.3 Resultados e discussão</b>	37
1.3.1 Avaliação da viabilidade polínica	37
1.3.2 Efeito do regulador 2,4-D na indução de calos a partir de anteras (Experimento 1)	38
1.3.3 Efeito de BAP em combinação com 2,0 µM de 2,4-D e da temperatura como pré-tratamento (Experimento 2)	41
<b>REFERÊNCIAS</b>	46
<b>CAPÍTULO 2 - INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM GENÓTIPOS DE MELANCIA</b>	49
<b>2.1 Introdução</b>	52
<b>2.2 Material e Métodos</b>	54
2.2.1 Indução de poliploidia em melancia cv. Crimson Sweet (Experimento 1)	54
2.2.2 Indução de poliploidia em sementes da Linhagem Diploide com Resistência ao Oídio (LDRO) da Embrapa Semiárido (Experimento 2)	54
2.2.3 Indução de poliploidia em sementes e plântulas de linhagem de melancia da Embrapa Semiárido (Experimento 3)	55
2.2.3.1 Descrição dos métodos utilizados para aplicação da colchicina	55
2.2.3.1.1 Método de aplicação direto na semente - MDS	55
2.2.3.1.2 Método de aplicação em sementes com emissão da radícula - MER	56
2.2.3.1.3 Método de aplicação no ponto de inserção entre o hipocótilo e a raiz - MIHR	56
2.2.3.1.4 Método de aplicação no ápice da plântula - MAP	56
2.2.3.1.5 Método de aplicação no hipocótilo invertido - MHI	56

2.2.4	Emergência das sementes de melancia cv. Crimson Sweet e Linhagem LDRO	57
2.2.5	Avaliação do nível de ploidia em melancia	57
2.2.5.1	Contagem do número de cloroplastos e estômatos	57
2.2.5.2	Análise morfológica	57
2.2.5.3	Análise citogenética (mitótica)	58
2.2.6	Análise estatística	58
<b>2.3</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>59</b>
2.3.1	Avaliação da emergência das sementes	59
2.3.2	Avaliação de cloroplastos e estômatos	61
2.3.2.1	Avaliação do número de cloroplastos e estômatos	61
2.3.2.2	Avaliação do diâmetro polar e equatorial dos estômatos	65
2.3.3	Análise morfológica das plantas	66
2.3.4	Análise citogenética (mitótica)	73
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>
	<b>CAPÍTULO 3 – INDUÇÃO DE GAMETAS NÃO REDUZIDOS EM BOTÕES FLORAIS MASCULINOS DE PLANTAS DE MELANCIA</b>	<b>82</b>
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b>	<b>85</b>
<b>3.2</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>86</b>
3.2.1	Material vegetal	86
3.2.2	Microsporogênese	86
3.2.3	Indução de gametas não reduzidos	87
3.3.4	Análise estatística	87
<b>3.3</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>88</b>
3.3.1	Avaliação da microsporogênese	89
3.3.2	Avaliação da indução de gametas não reduzidos	89
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>94</b>
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>96</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

### A cultura da melancia e sua importância socioeconômica

A melancia pertence ao gênero *Citrullus* e à família Cucurbitaceae. Neste gênero estão incluídas cinco espécies diploides ( $2n=22$ ): *Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai, *C. colocynthis* (L) Schrad, *C. ecirrhosus* Cogn, *C. rehmi* de Winter e *C. naudinianus* (Sond.) Hook.f. (WHITAKER; DAVIS, 1962 e DANE et al., 2007). A espécie *C. lanatus* inclui a melancia cultivada para consumo humano *C. lanatus* var. *lanatus*, de ampla distribuição mundial, e *C. lanatus* var. *citroides*, uma forma silvestre encontrada no sul da África e cultivada em outros países do mundo, principalmente para alimentação animal (WHITAKER; DAVIS, 1962; MOHR, 1986).

É uma espécie anual, herbácea, de hábito de crescimento rasteiro, produz ramas que podem alcançar 3-4m e folhas com limbo triangular, recortado em três ou quatro pares de lóbulos. Apresenta gavinhas, que auxiliam na fixação da planta ao solo. A partir de cada nó se origina uma folha e uma gavinha, sendo que a partir do terceiro, cada nó também dá origem a flores. O sistema radicular é extenso do tipo pivotante, o florescimento é monoico (flores masculinas e femininas separadas), mas também ocorrem plantas andromonóicas (flores masculinas e hermafroditas) ou ginandromonóicas (flores masculinas, femininas e hermafroditas). No ápice da floração, após o início da abertura das flores, há cerca de três a cinco flores masculinas para cada flor feminina. Estas e as hermafroditas possuem ovário ínfero em formato similar à forma final do fruto (DIAS; REZENDE, 2010; FILGUEIRA, 2013). É predominantemente alógama, podendo ocorrer o sistema misto em algumas populações andromonóicas em condições de campo (FERREIRA et al., 2006). A polinização é realizada principalmente pelas abelhas, sendo necessário pelo menos 1.000 grãos de pólen depositados sobre o estigma para que se desenvolva um fruto perfeito. O fruto é uma baga indeiscente que varia quanto ao formato, tamanho, cor, espessura da casca, cor da polpa, cor e tamanho de sementes. A polpa é formada de tecido placentar, que é a principal parte comestível do fruto. As sementes são variadas na cor do tegumento – branca, creme, verde, vermelha, marrom-avermelhada, marrom e preta -, com presença ou ausência de manchas – cor secundária do tegumento, tamanho variando de muito pequeno a muito grande (DIAS; REZENDE, 2010; FILGUEIRA, 2013).

A melancia é cultivada mundialmente e o Brasil ocupa o quarto lugar dentre os países de maior produção, vindo logo após China, Iran e Turquia (FAOSTAT, 2016). Em 2016 a

produção brasileira atingiu 2.090.432 toneladas de frutos, destacando-se com as maiores produções as regiões Nordeste e Sul que alcançaram 26,08% (545,194) e 21,92% (458,226), respectivamente, desta produção. Na região Nordeste, destacam-se os estados da Bahia, Rio Grande do Norte e Pernambuco com 237.532, 135.343 e 50.097 toneladas respectivamente (IBGE, 2016). Além disso, a melancia, depois do melão, foi a cultura de maior exportação realizada pelo estado do Rio Grande do Norte em 2016 com um aumento de 31,35% toneladas em relação ao ano de 2015 (FIERN, 2016).

Dentro desta perspectiva, o cultivo da melancia apresenta significativa relevância no Nordeste brasileiro, sendo de fundamental importância economicamente, uma vez que gera emprego e renda. Além disso, seus frutos são utilizados predominantemente na alimentação humana por suas características nutricionais e nutraceuticas, sendo utilizada também na alimentação animal. Em algumas regiões, as sementes são consumidas tostadas e dessas pode-se extrair um óleo de boa qualidade, cujo conteúdo varia de 20 a 45%. A casca do fruto pode ser utilizada na fabricação de doce, bem como na alimentação de alguns animais (DIAS et al., 2001). A melancia também pode ser utilizada como alimento funcional através do princípio bioativo licopeno podendo proteger contra o câncer de próstata (CARVALHO et al., 2006).

### **Melhoramento genético da melancia para o semiárido brasileiro**

O germoplasma de melancia foi introduzido no Brasil em duas épocas distintas. A primeira introdução foi pelo tráfico de escravos há mais de 350 anos, envolvendo materiais de base genética ampla, cultivados por agricultores familiares em diferentes regiões da África (WHITAKER; DAVIS, 1962; COSTA; PINTO, 1977 e ROMÃO, 2000). Há controvérsia, pois alguns historiadores questionam que não foram propriamente os escravos, mas, os portugueses que traziam os escravos (CORREA, 2010). Posteriormente, na década de 1950, foi introduzido no Estado de São Paulo germoplasma de melancia proveniente dos Estados Unidos e do Japão, de base genética mais estreita, uma vez que era resultante de programas de melhoramento desses países (WHITAKER; DAVIS, 1962; COSTA; PINTO, 1977). Correa (2010) também afirma que a introdução de melancia ocorreu com a vinda de imigrantes de diferentes países ao longo dos anos.

Desde então, esse germoplasma que foi introduzido no Brasil, ao longo dos anos se dispersou no país durante a ocupação dos espaços interioranos e foi mantido pelos agricultores familiares. O Nordeste brasileiro representa um bom exemplo dessa estratégia e hoje o cultivo é feito em todos os Estados em maior ou menor escala e os cultivos tem

mostrado um bom potencial de produção comercial (QUEIROZ, 2016; IBGE, 2016). Suas características de clima quente e semiáridas, alta luminosidade e temperaturas do ar entre 18 °C a 30 °C são bem toleradas pelas cucurbitáceas. A melancia, por exemplo, desenvolve-se melhor durante o período seco por favorecer a formação de frutos com excelentes qualidades organolépticas (REZENDE et al., 2010). O resultado disso é percebido com a expressiva produção da cultura na região que deteve 26% da produção brasileira em 2015 (IBGE, 2016).

Vale salientar que mesmo com toda essa produção e características favoráveis na região, as cultivares existentes destinadas ao cultivo da melancia não foram desenvolvidas para as condições ambientais brasileiras (QUEIROZ et al., 2001). As cultivares produzidas em cultivos comerciais de melancia são de origem americana ou japonesa, que se adaptaram bem às condições edafoclimáticas. No entanto, deve-se considerar que entre estas, a mais plantada é a cultivar Crimson Sweet e tipos assemelhados, que é de origem americana, respondendo a praticamente por mais de 90% do fornecimento ao mercado consumidor (DIAS et al., 2010; QUEIRÓZ, 2016). Contudo, há mais de 30 doenças da melancia registradas na literatura causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides que podem afetar a cultura da melancia, limitando o seu cultivo (TERAO et al., 2010). Diante disso, a estabilidade da agricultura é dependente dos recursos genéticos vegetais, cultivares melhoradas e silvestres, pois em geral elas tornam-se ineficientes num prazo curto, sendo necessário a sua substituição (BUENO et al., 2006).

O melhoramento de plantas é um processo contínuo que mediante o estudo e a manipulação de germoplasma, objetiva e concretiza efetivamente o desenvolvimento de cultivares superiores na agricultura de uma determinada região. Tem como principais objetivos o aumento da produtividade, a qualidade dos produtos agrícolas, o desenvolvimento de cultivares para novas áreas agrícolas e a criação de cultivares resistentes a doenças (BUENO et al., 2006). Além disso, o melhoramento de plantas é o principal sustentáculo para que a agricultura possa disponibilizar alimentos, fibras, energia e lazer para a sociedade, contribuindo assim, para a segurança alimentar, para a saúde e a nutrição da população, bem como criar oportunidades de agregação de renda para as populações rurais (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Em um programa de melhoramento devem-se levar em consideração as características que sejam relevantes para os agricultores e para os consumidores. Para os primeiros, a resistência às principais doenças, a produtividade e a qualidade do produto se reveste da maior

importância e para os consumidores, a qualidade e as características nutricionais do fruto são atrativas (QUEIROZ, 2016). Assim sendo, dentre as diversas espécies cultivadas, a melancia do gênero *C. lanatus* tem sido estudada desde a década de 80 através do programa de melhoramento para áreas irrigadas do Nordeste brasileiro da Embrapa Semiárido que objetivou melhorar as características de produção, resistências às principais doenças e a qualidade do produto (QUEIROZ, 2016). Os resultados das pesquisas realizadas no citado programa de recursos genéticos e melhoramento genético, durante 26 anos, estão disponíveis em relatórios técnicos, capítulos de livros, dissertações, monografias e artigos científicos publicados em revistas nacionais e estrangeiras (EMBRAPA, 2003; EMBRAPA, 2006; QUEIRÓZ, 1993; DIAS et al., 1996; ROMÃO, 2000; DIAS et al., 2010; CARVALHO et al., 2012; GAMA et al., 2013a; SANTOS et al., 2014 e DAMACENO et al., 2016).

A disponibilidade de fontes de variabilidade genética é um aspecto muito importante para o início de um programa de melhoramento genético. O Nordeste brasileiro possui grande variabilidade para diversos caracteres de planta, frutos e resistência a doenças (QUEIRÓZ, 1993; DIAS et al., 1996; ROMÃO, 2000 e DIAS et al., 2010), que serviu de base para a formação de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, na década de 80, na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE (QUEIRÓZ et al., 1999; SILVA et al., 2010). Este Banco engloba o Banco de Germoplasma de Melancia (BG CIA), Banco de Germoplasma de Melão (BGMEL) e o Banco de Germoplasma de Cucurbita (BGC), e foi criado visando à conservação dos recursos genéticos das Cucurbitáceas. O BAG de Melancia possui, atualmente, 870 acessos (SILVA et al., 2010), incluindo cultivares comerciais, amostras da agricultura tradicional e alguns parentes silvestres da melancia (*C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis*). Uma amostra desse germoplasma foi avaliada quanto às suas características de variabilidade genética, produção, fatores nutricionais e de resistência aos principais estresses bióticos e abióticos que prejudicam a cultura. De uma maneira geral, esse programa de melhoramento de melancia visa a obtenção de resistência as principais doenças como oídio (*Podosphaera xanthi*), cancro das hastes (*Didymella bryoniae*) (Auersw.) Rehm, murcha de fusário (*Fusarium oxysporum*) Schlechtend.; Fr f.sp. *niveum* (E.F.Sm) w. C. Snyder H. N. Hans, nematoides e aos vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* - type watermelon, PRSV-w), vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus* - WMV) e vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) que possam inviabilizar o cultivo da melancia (QUEIROZ et al., 2001; TERAÓ et al., 2010).

Diversos trabalhos já foram realizados visando o desenvolvimento de híbridos triploides (SOUZA et al., 1999), resistência ao oídio (*P. xanthii*) (BORGES, 1996; DIAS et al., 1999), resistência aos vírus do gênero Potyvirus: PRSV-W, WMV, ZYMV (SILVEIRA et al., 2005; 2009), interação genótipos x ambientes na reação de progênies de melancia a alternariose (LIMA NETO, 2009), identificação da variabilidade existente entre as cultivares através da caracterização molecular de acessos de melancia (SILVA et al., 2006; SILVA, 2010), comportamento de populações de melancia para prolificidade (SILVA, 2010), capacidade de combinação de linhagens avançadas e cultivares comerciais de melancia (SOUZA et al., 2013), caracterização molecular de cultivares de melancia e variabilidade genética de acessos usando marcador microsatélite (GAMA et al., 2013a; GAMA et al., 2013b). Vários outros trabalhos relacionados a estudos de germoplasma de melancia conservados no BAG da Embrapa Semiárido poderão ser encontrados na literatura. Esses estudos possibilitaram grandes avanços e, dentre estes, o desenvolvimento da cultivar BRS OPARA que possui resistência ao oídio, o que elimina a utilização de fungicidas para esse estresse biótico, além de características internas e externas da variedade comercial Crimson Sweet (DIAS et al., 2007).

Apesar de todos esses trabalhos relatados acima, ainda há diversas áreas a serem exploradas como, por exemplo, obter novos materiais tetraploides para a produção de híbridos triploides que além de não apresentarem sementes desenvolvidas, possibilitem maior produtividade devido ao seu vigor híbrido. Além disso, os poucos híbridos triploides à venda no mercado nacional são importados e suas sementes são comercializadas por preços bastante elevados. Grande parte deles apresentam problemas de adaptação, sobretudo com relação à produção e à qualidade de frutos. Além disso, esses são bastante suscetíveis aos principais estresses bióticos da cultura nas condições ambientais brasileiras (SOUZA et al., 2001). Assim, para se avançar no programa de melhoramento da cultura é muito importante incluir os conhecimentos da biotecnologia que proporcionam também a aplicação de atividades como a cultura de tecidos, que engloba práticas como a cultura de meristemas, cultura de anteras, variação somaclonal e cultura de embriões (BUENO et al., 2006).

Considerando que a produção de melancia de forma convencional (como é praticada em vários locais no Brasil) tem um baixo valor agregado, há a necessidade de aumentar a produção por área. Nesse caso, uma possibilidade é a obtenção de híbridos, preferencialmente triploides, havendo a necessidade de obtenção de linhas endogâmicas e a produção de duplo-haploides.



## Viabilidade polínica

A estimativa da viabilidade polínica é importante para análise de fluxo gênico em plantas, porque evidencia o potencial masculino no melhoramento das espécies e pode ser usada em estudos com taxonomia, ecologia, genética e palinologia (FRESCURA et al., 2012). Além disso, o estudo da viabilidade polínica dá mais subsídios para assegurar o sucesso do uso de indivíduos superiores selecionados e produção de novas cultivares por meio da recombinação de caracteres pela hibridação controlada (POZZOBON et al., 2011). Em geral a estimativa da viabilidade polínica tem sido feita através de testes colorimétricos e germinativos em maracujá (SOUZA et al., 2002), melancia (FREEMAN et al., 2008), mamão (MUNHOZ et al., 2008), berinjela (FRANÇA et al., 2009), pimentão (MARTINS et al., 2010), abacaxi (SOARES et al., 2011), pimenta (POZZOBON et al., 2011), mandioca (VIEIRA et al., 2012), pepino (KIELKOWSKA; HAVEY, 2012) e araçá (HISTER; TEDESCO, 2016). Contudo, alguns autores relatam que parte dos métodos colorimétricos superestima a viabilidade polínica (MUNHOZ et al., 2008; VIEIRA et al., 2012).

Hister e Tedesco (2016) discutiram que, por não existir um teste de viabilidade universal com corante específico, os diversos tipos de corantes existentes devem ser testados em cada espécie, a fim de encontrar o mais adequado e que forneça resultados mais próximos ao obtido pela germinação de pólen *in vitro*. Munhoz et al. (2008), por exemplo, avaliaram a cultivar ‘Sunrise Solo’ do mamoeiro quanto à viabilidade polínica comparando diversos métodos de coloração (TTC, reativo de Alexander, carmim acético, Lugol, Sudan IV). Esses autores relataram que o teste de coloração com TTC forneceu estimativa de viabilidade de 67,5%, equivalente ao teste de germinação *in vitro* e consideraram que os demais testes superestimaram a viabilidade polínica (>90%) e que são eficientes na determinação de constituintes celulares e da integridade do grão de pólen. Para Kielkowska; Havey (2012), o corante reativo de Alexander utilizado para estimar a viabilidade polínica em pepino proporcionou uma alta detecção de viabilidade (72,9%) e germinação do pólen (69,5%). Por outro lado, Soares et al. (2011) avaliaram a morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi e descreveram que os resultados com carmim acético, em sua maioria, não corresponderam ao que foi obtido com a germinação *in vitro*, apresentando valores acima de 76% de viabilidade para todos os acessos estudados.

Já para Cardoso (2012), que trabalhou com cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro* de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis*), a viabilidade polínica estimada através

do método de coloração com carmim acético 2%, Alexander e germinação *in vitro*, demonstrou que a coloração dos pólenes com carmim acético (2%) proporcionou uma maior capacidade de distinção entre pólenes viáveis e não viáveis. Além disso, essa avaliação permitiu uma correlação mais próxima entre a determinação de viabilidade por coloração e a germinação *in vitro* de grãos de pólen. Entretanto, é possível concordar com Hister e Tedesco (2016) quando concluem que o sucesso dos métodos colorimétricos na estimativa da viabilidade depende também da espécie em estudo.

Em melancia, estudos de viabilidade polínica são escassos e principalmente com a utilização do corante carmim acético. O estudo que se tem relato foi descrito por Freeman et al. (2008) que avaliaram quatro cultivares diploides polinizadoras de plantas triploides de melancia e determinaram a viabilidade polínica com diaminobenzidine (DAB), um teste que mede a atividade da peroxidase no pólen. Nesse caso, foram relatados resultados de alta viabilidade com mais de 95% em todas as cultivares avaliadas. Para a cultura de anteras, a estimativa da viabilidade polínica é importante, uma vez que os pólenes caracterizados como viáveis, são resultado de uma meiose estável, regular e potencialmente fértil (POZZOBON et al., 2011).

### **Cultura de anteras e indução de calos**

A haploidização é uma técnica conhecida há mais de 50 anos que permite a transferência de genes de forma rápida, pelo uso de duplo-haploides homocigotos, facilitando a seleção de genótipos mais produtivos e resistentes. Essa ferramenta tem sido bastante utilizada com o objetivo de acelerar o programa de melhoramento das espécies cultivadas (GATAZKA; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, 2013). Além disso, os haploides podem ser utilizados para detectar mutações e para recuperar combinações genéticas únicas, onde se visualiza a expressão de alelos recessivos, o que tem grande aplicação nos estudos genômicos. Além disso, a produção de duplo-haploides tem permitido a produção de híbridos e sua integração em programas de melhoramento (SILVA NETO; ANDRADE, 2011). Outra vantagem na produção de duplo-haploides é a diminuição do tempo requerido para obtenção de um indivíduo homocigoto. Uma vez que, no sistema convencional de melhoramento, o tempo de obtenção de linhas puras de homocigotos através de técnicas convencionais de reprodução em melancia requer um período longo, como 10-12 anos. No entanto, com técnicas *in vitro* mais rápidas e eficazes, como "técnicas de haploidia", é possível obter 100% de linhas puras de homocigotos, conseguindo-se plantas com número de cromossomos

haploides e duplicando-se os cromossomos com colchicina. Assim, o processo de obtenção de homozigotos pode ser reduzido a um ou dois anos (BAKTEMUR et al., 2013). Entre as técnicas *in vitro*, a cultura de anteras permite a obtenção de plantas haploides, as quais, após duplicação cromossômica, resultam na produção de linhas homozigóticas duplo-haploides (GERMANÀ, 2011). Assim sendo, conseqüentemente haverá diminuição nos custos com mão de obra, irrigação e insumos agrícolas. Além de acelerar o programa de melhoramento da espécie.

Uma planta haploide contém um número gamético de cromossomos, enquanto no duplo-haploide ocorre a restauração do estado diploide de forma 100% homozigótica. Portanto, para obtenção destes, existem vários métodos disponíveis, dos quais o cultivo de anteras *in vitro* ou cultura isolada de micrósporos são os mais eficazes e amplamente utilizados (GERMANÀ, 2011). A primeira planta haploide obtida através da cultura de anteras foi da espécie *Datura innoxia* (Guha S.) e atualmente, são mais de cem espécies que estão sendo testadas e avaliadas. Na família das cucurbitáceas, plantas de abóbora (*Cucurbita pepo*) (METWALLY et al., 1998), pepino (*Cucumis sativus*) (ASHOK KUMAR et al., 2003; SONG et al., 2007 e HAMIDVAN et al., 2013) e de melancia (*Citrullus lanatus*) (ABDOLLAHI et al., 2015) foram regeneradas a partir da cultura de anteras. Em melancia a primeira planta obtida através da cultura de anteras foi em 1983, embora não se tenha obtido sucesso no desenvolvimento das plântulas após o transplântio (XUE et al., 1983). Desde então, uma quantidade razoável de trabalhos nesse sentido tem sido publicados na “China Cucurbits and Vegetables”. Contudo, o sistema de cultura haploide de melancia eficaz e estável ainda não foi estabelecido com sucesso (ZHU, YING-CHUN et al., 2010). Mais recentemente, Abdollahi et al. (2015) publicaram um trabalho que foi desenvolvido com cultura de anteras das cultivares Charleston Gray e Crimson Sweet de melancia resultando apenas na regeneração *in vitro* de 10 plantas haploides. No entanto, mesmo com alguns trabalhos já desenvolvidos, os mesmos ainda não foram completamente estabelecidos, além disso, os genótipos respondem diferentemente um dos outros aos diversos tratamentos utilizados para obtenção de plantas haploides e duplo-haploides (GERMANÀ, 2011). Para a regeneração *in vitro* a partir de anteras, uma das etapas seguidas, é a formação de calos para obtenção de uma plântula (GEORGE et al., 2008), que se diferenciam via embriogênese ou organogênese, formando uma nova planta (SANTOS; BONADESE-ZANETTINI, 2002 e GERMANÀ, 2011).

Estudos prévios de indução de calos, visando à uma regeneração eficiente, tem sido realizados com diferentes tipos de explantes e espécies (ABU-ROMMAN et al., 2013; RIAZ et al., 2016 e GOLABADI et al., 2017), inclusive com a melancia (ABDOLLAHI et al., 2015). Mediante o exposto, no Brasil não se tem registro de estudos em melancia com cultura de anteras. Assim, portanto, é necessária a realização de pesquisas com as diversas cultivares disponíveis no país, a fim de se obter protocolos para estas e que sejam mais amplos para assim atender a uma maior quantidade de cultivares disponíveis.

### **Poliploidia como ferramenta no melhoramento de plantas**

A poliploidia é um fenômeno que ocorre frequentemente em várias espécies de plantas. De acordo com a origem dos genomas **das** plantas poliploides, podem-se classificar os poliploides como aloploides, quando dois ou mais genomas são combinados através da hibridação interespecífica, e autopoliploides, quando um genoma se forma por duplicação dentro da própria espécie (TAMAYO-ORDÓÑEZ et al., 2016). Estima-se que um terço das espécies cultivadas são poliploides. Dentre elas, a alfafa, o fumo, o algodão, aveia, moranguinho e o trigo entre outras (WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003).

A autopoliploidia pode ocorrer de forma espontânea como também pode ser induzida e como em alguns casos pode ser vantajosa, diversos métodos têm sido aplicados para sua obtenção (RAMALHO et al., 2008). A poliploidia artificial pode ser vantajosa sob o ponto de vista agrônomo uma vez que, a duplicação artificial do número cromossômico poderá levar à obtenção de novos caracteres favoráveis, manter em nível satisfatório o potencial de fertilidade e aumentar as possibilidades de segregação e recombinação (BUENO et al., 2006). Muitos métodos têm sido usados efetivamente na produção de poliploides artificiais, como a regeneração através da cultura de tecidos, choque por temperatura, raio-X e o uso de agentes antimetabólicos (McCUISION; WEHNER, 2010). A poliploidização através de agentes antimetabólicos como a colchicina, a orizalina e o trifluralin já foram empregados em várias espécies de plantas como em banana (COSTA, 2010), mandioca (SILVA, 2014 e CARVALHO et al., 2016) e batata (TOMÉ et al., 2016).

Em melancia, cultivares sem sementes são produzidas a partir do cruzamento entre plantas tetraploides ( $4x=44$ ) (flor feminina) com diploides ( $2x=22$ ) (flor masculina). O cruzamento recíproco destas (flor feminina diploide) não produz sementes, sendo inviável a sua utilização. O híbrido triploide ( $3x=33$ ) resultante do cruzamento entre plantas tetraploides e diploides apresenta flor masculina estéril. Assim sendo, a flor feminina originará sementes

que uma vez plantadas irão produzir frutos sem sementes. Assim, quando se usa sementes triploides é necessário o cultivo de uma planta diploide para promover a estimulação do óvulo e formação do fruto (KIHARA, 1951; MEDINA et al., 1958 e McCUISTION; WEHNER, 2010).

A produção de plantas tetraploides em melancia se dá através da indução da duplicação cromossômica de uma planta diploide (McCUISTION; WEHNER, 2010). Mais comumente na cultura da melancia, a indução de plantas tetraploides tem sido realizada através da aplicação do agente antimitótico colchicina em sementes, ápices ou plântulas (KIHARA, 1951; MEDINA et al., 1958; SOUZA et al., 2001; JASKANI et al., 2005; NOH et al., 2012 e SHEIKH et al., 2013) e no meio de cultura através da cultura de tecidos utilizando explante do cotilédone, estrutura embrionária da semente, epicótilo e hipocótilo (COMPTON et al., 1996 e RAZA et al., 2003). A colchicina age inibindo a formação do fuso mitótico, resultando na não separação dos cromossomos homólogos e consequentemente, com a formação da membrana celular, originará uma célula com o dobro do número cromossômico (SOUZA et al., 1999). Um dos primeiros relatos de obtenção de melancia triploide utilizando a colchicina em diferentes concentrações em plantas diploides e o método de aplicação em plântulas foi publicado por Kihara (1951). Desde então, tem sido realizadas pesquisas visando a obtenção de plantas tetraploides para uso no melhoramento e consequentemente, gerar híbridos triploides. Os mais recentes foram publicados por Noh et al. (2012) e Sheikh et al. (2013) que testaram diferentes métodos de aplicação de colchicina, diretamente na semente, no ápice e no hipocótilo invertido para indução de plantas tetraploides, concluindo que o método de aplicação da colchicina a 0,2% no hipocótilo invertido foi o que gerou uma maior porcentagem na indução de tetraploides com aproximadamente 30% das plantas avaliadas. OH et al. (2015) também desenvolveram linhas tetraploides utilizando colchicina a 1% e obtiveram alta taxa de indução (82,2%). Na cultura de tecidos, Raza et al. (2003) avaliaram a indução de plantas poliploides de melancia *in vitro* utilizando a colchicina em diferentes explantes (cotilédones, embriões, hipocótilo e epicótilo), e obtiveram plantas com o dobro do conteúdo de DNA (4n) quando cultivaram os explantes cotilédone e embrião em meio suplementado com colchicina a 0,01% por quatro dias.

No entanto, estas pesquisas foram realizadas em outros países, mas no Brasil, as tentativas de indução de plantas tetraploides ainda são insuficientes. O primeiro trabalho foi realizado por Medina et al. (1958) os quais trataram sementes diploides em germinação, com solução de colchicina a 0,1% durante 8-12 horas e obtiveram mais de duas dezenas de plantas

duplicadas ( $2n=44$ ). Nesse caso, posteriormente, foram realizados cruzamentos com indivíduos diploides, obtendo assim, as sementes dos híbridos triploides, que foram plantadas juntamente com linhas diploides, gerando frutos sem sementes. Outro trabalho relatado foi o realizado pela Embrapa Semiárido em 1999, por Souza et al. (1999). Esses autores selecionaram duas linhagens com boas características agrônômicas e resistentes ao oídio para indução de plantas tetraploides. Cem sementes de cada linhagem selecionada foram imersas em uma solução de colchicina a 0,2% por 24 horas, resultando que, de 193 plantas obtidas após a indução de poliploidia, 53 (27,46%) foram identificadas como tetraploides. Desde então, não se tem informações na literatura de novas pesquisas referentes à obtenção de plantas tetraploides em melancia. Além disso, alguns fatores têm limitado o número de linhagens tetraploides disponíveis em melancia, como a baixa porcentagem de frequência de tetraploides, longo período de crescimento, baixa germinação das sementes, baixa recuperação das mudas durante o crescimento e número insuficiente de sementes para o desenvolvimento de triploides (SHEIKH et al., 2013).

Outra metodologia que pode possibilitar a obtenção de indivíduos poliploides é a indução de gametas  $2n$ . A formação de gametas não reduzidos derivados da divisão celular meiótica anormal é uma abordagem importante para a reprodução de poliploides. Este processo é considerado a principal força motriz na formação espontânea de poliploides na natureza. Mas a aplicação potencial destes gametas para a criação de plantas ainda não foi totalmente explorada (YOUNIS et al., 2014). O desenvolvimento de poliploides meióticos na natureza poderá ser altamente valioso para o melhoramento das espécies, por ser um método eficiente e efetivo para transferir características quantitativas e qualitativas de indivíduos com diversas origens genéticas (OTTO; WHITTON, 2000; RAMNNA; JACOBSEN 2003), podendo gerar novas espécies poliploides (YOUNIS et al., 2014).

No processo de formação de gametas  $2n$ , além do controle por fatores genéticos, o ambiente fisiológico também pode estimular a expressão de genes responsáveis pela formação destes gametas (RAMNNA; JACOBSEN 2003). Por exemplo, a baixa ou alta temperatura é um dos fatores ambientais que podem induzir ou estimular a formação de gametas  $2n$ , contudo a interação entre genótipos e fatores ambientais ainda não foram totalmente determinados (YOUNIS et al., 2014). Alguns trabalhos já relataram, bons resultados. Wang et al. (2012), por exemplo, trabalharam com indução de gametas  $2n$  em botões florais femininos de *Populus* (*Populus pseudo-simonii* x *Populus nigra* 'Zheyin') utilizando altas temperaturas (41 e 44 °C) e obtiveram 146 indivíduos com alta eficiência (66,7%) na produção de

triploides. Em *Rosa* sp. botões florais foram submetidos a tratamento com diferentes temperaturas (24, 30, 33 ou 36 °C) por 48 horas, resultando que o tratamento a 36 °C no tempo estabelecido, foi eficiente para aumentar o nível de ploidia com 24,5% de pólen diploide produzido (PÉRCRIX et al., 2011).

Além do fator temperatura, a indução de gametas  $2n$  em plantas é realizada também através da utilização de reagentes químicos como a colchicina,  $N_2O$ , orizalina, cafeína, trifluralin, puromycin e benzobenil (DEWITTE et al., 2010; LAI et al., 2015 e YANG et al., 2016). Dewitte et al. (2010), por exemplo, induziram pólenes  $2n$  em botões florais masculinos de *Begonia* utilizando trifluralin e  $N_2O$ , concluindo que o tratamento com  $N_2O$  foi mais eficiente para a formação de pólen  $2n$  do que o trifluralin.

O reagente colchicina tem sido relatado como um importante indutor de pólen  $2n$ . Em mandioca, Lai et al. (2015) aplicaram colchicina a 0,3% em botões florais masculinos, e a 0,15, 0,3 e 0,45% em botões femininos, obtendo gametas  $2n$ , os quais foram polinizados artificialmente, gerando duas plantas tetraploides de um total de 250 mudas, concluindo que a indução de gametas  $2n$  com colchicina em combinação com hibridização com gametas não reduzidos é uma abordagem efetiva para produção de triploide em mandioca. Em eucalipto, Yang et al. (2016) trataram botões florais masculinos de diferentes tamanhos com colchicina a 0,5% por 3 e 6 horas e obtiveram 28,71% de produção de pólen  $2n$  em botões florais de tamanho de 3,5 a 4,0 mm tratados com colchicina a 0,5% por 6 horas.

Na cultura da melancia, a colchicina tem sido aplicada para obtenção de plantas tetraploides ( $2n=4x$ ) com o objetivo de produzir híbridos triploides ou melancia sem semente e em geral, tem sido registrado a sua aplicação em sementes, ápices, plântulas e no meio de cultura de tecidos vegetais (KIHARA, 1951; MEDINA et al., 1958; SOUZA et al., 2001; JASKANI et al., 2005; NOH et al., 2012 e SHEIKH et al., 2013). Já em botões florais, a aplicação de colchicina para formação de gametas  $2n$  ainda não foi descrito na literatura. Portanto, por ser um método efetivo na obtenção de poliploides (YANG et al., 2016), vale aplicá-lo também na cultura da melancia, para a obtenção de novos materiais e a utilização de diferentes métodos que precisam ser estudados para se estabelecer um maior número de indivíduos com características de interesse para o melhoramento da espécie.

Portanto, os objetivos desse trabalho foram estimar a viabilidade polínica, avaliar as respostas de diferentes genótipos de melancia quanto à indução de calos, em tecidos de anteras utilizando reguladores de crescimento e temperatura, e induzir poliploidia mediante o

uso da colchicina em diferentes concentrações, tempos de exposição, escarificação mecânica e métodos de aplicação.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. R. et al. The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) **Brazilian Journal of Botany** v.38, n.3, p. 447–456, 2015.
- ABU-ROMMAN, S. SUWWAN, M. AL-RAMAMNEH, E. A. The influence of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of cucumber (*Cucumis sativus* L.) **Advances in Environmental Biology**, v.7, n.2, p. 339-343, 2013
- ASHOK KUMAR, H. G. et al. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. **Journal: Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 3, p. 213, 2003.
- BAKTEMUR, G. et al. 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**, 2013.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa: UFV, 2013. 523 p.
- BORGES, R. M. E. **Estudo da herança da resistência ao oídio *Sphaerotheca fuliginea* (Schelecht. ex Fr.) Poll em melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.** 1996. 46f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.
- BUENO, Luiz; MENDES, Antônio; CARVALHO, Samuel. **Melhoramento de plantas: princípios e procedimentos**. 2. ed. – Lavras: UFLA, 2006. 319 p.
- CARDOSO, J. C. **Cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro* de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.)**. 2012. 133f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012
- CARVALHO, P. et al. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira** v. 24, n. 4, p. 397-404, 2006.
- CARVALHO, F. C. Q. et al. Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. **Euphytica**, v. 190, n. 2, p. 169-180, 2012.
- CARVALHO, M. et al. Inducing autotetraploids in cassava using oryzalin and colchicine and their *in vitro* morphophysiological effects. **Genetics and molecular research: GMR**, v.15, n.2, p. 1-14, 2016.
- COMPTON, M. et al. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. **Euphytica** v.87, n. 3, p. 165-172, 1996.
- CORREA, S. M. S. Africanidades na paisagem brasileira. **INTERthesis**. UFSC-Florianópolis- SC- Brasil. v. 07, n.01, p. 96-116, 2010.



- COSTA, C. P. da; PINTO, C. A. B. P. Melhoramento da melancia. In: \_\_\_\_\_. **Melhoramento de hortaliças**. Piracicaba: ESALQ-USP, 1977. v. 2. cap. 8, p. 196-209.
- COSTA, F. H. da S. **Respostas morfológicas de bananeira submetida à poliploidização**. 2010. 134 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- DAMACENO, L. S. et al. Evaluation of the reaction of watermelon parent and F1 plants to *Meloidogyne enterolobii*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 2, p. 296-304, 2016.
- DANE, F.; LIU, J.; ZHANG, C. Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, n. 2, p. 327-336, 2007.
- DEWITTE, A. et al. Induction of 2n pollen formation in Begonia by trifluralin and N2O treatments. **Euphytica** v.171, n. 2, p. 283-293, 2010.
- DIAS, R. de C. S.; QUEIROZ, M. A. de; MENEZES, M. Fontes de resistência em melancia a *Didymella bryoniae*. **Horticultura Brasileira**, v. 14, n.1, p. 15-18. 1996.
- DIAS, R. C. de S. et al. Avaliação de resistência a *Sphaerotheca fuliginea* e a *Didymella bryoniae* em melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, p. 13-19, 1999.
- DIAS, R. C. de S. et al. Cultura da melancia. Petrolina: Embrapa Semiárido (Circular técnica, 63), 2001. 20 p.
- DIAS, R. de C. S.; QUEIROZ, M. A. de; COSTA, N. D.; SOUZA, F. F.; ALMEIDA, M. C. B.; ARAUJO, H. M.; LIBERALINO FILHO, F.; PEREIRA, A. B.; BAHIA, J.; LIMA, R. N. S.; ANJOS, J. B. dos; PEREIRA, F. A.; ALVES, D. C.; ARAUJO, J. P. BRS Opara: melancia resistente ao oídio. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 1 Folder.
- DIAS, R. de C. S.; BARBOSA, G. S.; SOUZA, F. F.; QUEIROZ, M. A. RESENDE, G. M. COSTA, N. D. Cultivares. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. (Ed.). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 30 outubro. 2016.
- DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. Socioeconomia. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. (Ed.). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 06 março 2017.
- EMBRAPA. Centro de Pesquisa do Trópico Semiárido (Petrolina –PE). **Relatório técnico do Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido – CPATSA 1991 -2002**. Petrolina, PE, 2003. 29p.
- EMBRAPA . Relatório Técnico e de Atividade 2004 – 2006/ Embrapa Semiárido. Petrolina, PE, 2006. p. ; il. (Embrapa Semiárido. Documentos, 194).
- FAOSTAT. Disponível em [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*/E](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E): Acesso em: 01 junho 2016.

- FIERN. Dados estatísticos 2016. Disponível em: [http://www.fiern.org.br/images/pdf/espaco\\_empresarial/cin/Exportacoes do RN Dezembro e acumulado 2016 .pdf](http://www.fiern.org.br/images/pdf/espaco_empresarial/cin/Exportacoes_do_RN_Dezembro_e_acumulado_2016.pdf) Acesso em: 06 março 2017.
- FERREIRA, M. A. J. et al. Pré-melhoramento de uma população de melancia com sistema misto de reprodução. **Pesquisa agropecuária tropical**, v. 36, n.2, p. 131-139, 2006.
- FILGUEIRA, Fernando Antônio Reis. **Novo manual de olericultura agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2013. 421p.
- FRANÇA, L. V. et al. Viability of eggplant pollen **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 9, n. 4, p. 320-327, 2009.
- FRESCURA, V.D. et al. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. **Biocell**, v.36, n.3, p.143-145, 2012.
- FREEMAN, J. H., OLSON, S. M., KABELKA, E. A. Pollen Viability of Selected Diploid Watermelon Pollenizer Cultivars **Hortscience** v. 43, n.1, p.274–275, 2008.
- GAMA, R. N. de S.; SANTOS, C. A. F.; DIAS, R. de C. Genetic variability of watermelon accessions based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 747-754, 2013a.
- GAMA, R. N. C. S. et al. Molecular characterization of watermelon cultivars using microsatellite markers. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 4, p. 522-527, 2013b.
- GATAZKA, J.; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. **Folia Horticulturae**. v. 25, n.1, p. 67-78, 2013.
- GEORGE, E.F., HALL, M. A., KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture** 3rd Edition Volume 1. The Background 2008
- GERMANÁ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.104, n. 3, p. 283–300, 2011.
- GOLABADI, M. et al. 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
- HAMIDVAND, Y. et al. The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.) **Internacional Journal of Agriculture and Crop Sciences**. v. 5, n.10, p.1089-1095, 2013.
- HISTER, C.A.L.; TEDESCO, S.B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.1, p.135-141, 2016.
- IBGE, 2016. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-ermanentes.html?&t=resultados> Acesso: 19 fevereiro 2018.

- JASKANI, M. J.; KWON, S. W.; KIN, D. H. Flow cytometry of DNA content of colchicine treated with watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. **Pakistan Journal of Botany**. v. 37, n. 3, p.685-696, 2005.
- KIELKOWSKA, A.; HAVEY, M. J. *In vitro* flowering and production of viable pollen of cucumber **Plant Cell Tiss Organ Cult** v.109, n.1, p.73–82, 2012.
- KIHARA, H. Triploid watermelons. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**. v. 58, n. 1, p.217-230, 1951.
- LAI, H. et al. Induction of female 2n gametes and creation of tetraploids through sexual hybridization in cassava (*Manihot esculenta*) **Euphytica** v. 201, n. 2, p. 265-273, 2015.
- LIMA NETO, I.S. 2009. 73f. **Interação genótipo x ambiente na reação de progênies de melancia à alternariose no Submédio São Francisco**. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN. 2009.
- McCUISTION, F.; WEHNER, T. C. Seedless watermelon breeding. **Cucurbit Breeding Horticultural Science**. 2010
- MEDINA, D. M.; PRADO, O. T.; MENDES, A. J. T. A. poliploidia artificial na obtenção de melancia sem semente. **Bragantia**, Campinas, v. 17, n. 5, p. 81-100, 1958.
- METWALLY, E.I. et al. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo* **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.52, p. 171–176, 1998.
- MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica **Revista Brasileira Botânica.**, v.31, n.2, p .209-214, 2008.
- MARTINS, K.C. et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum* **Ciência Rural, Santa Maria**, v.40, n.8, p.1746-1751, 2010.
- MOHR, Hubert. C. Watermelon Breeding. In: BASSET, M. J. **Breeding vegetables crops**, Westport: Avi, 1986. p. 33-66.
- NOH, J. et al. Screening Different Methods of Tetraploid Induction in Watermelon [*Citrullus lanatus* (thunb.) Manst. and Nakai] **Horticulture Environment and Biotechnology**. v.53, n.6, p.521-529, 2012.
- OH, S. A. et al. Development of tetraploid watermelon using chromosome doubling reagent treatments. **Korean Journal of Plant Resources**. v.28, n.5, p. 656-664, 2015.
- OTTO, S. P. WHITTON, J. Polyploid Incidence and Evolution. **Annual Review Genetics**. v.34, p.401-37, 2000.
- PÉCRIX, Y. et al. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3587-3597, 2011.

POZZOBON, M.T. et al. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**. v. 29, n. 2, p. 212-216, 2011.

QUEIRÓZ, M. A. de. Potencial do germoplasma de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 7-9, 1993.

QUEIROZ, M. A. et al. Genetic resources and watermelon breeding at Embrapa Semiárido. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 301-312, 2001.

QUEIRÓZ, M. A. de; DIAS, R. de C. S.; SOUZA, F. de F.; FERREIRA, M. A. J. da F.; ASSIS, J. G. A.; BORGES, R. M. E.; ROMÃO, R. L.; RAMOS, S. R. R.; COSTA, M. S. V. CRUZ, M. da; MOURA, C. L. Recursos genéticos e melhoramento de melancia no Nordeste brasileiro. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Embrapa Semiárido/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. Embrapa Semiárido, Disponível em: <http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livro/melancia.pdf>. Acesso em: 30 outubro. 2016.

QUEIRÓZ, Manoel Abílio. Melhoramento de melancia. In: NICK, C.; BORÉM, A. **Melhoramento de Hortaliças**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016. p. 305-330.

RAMALHO, Magno Antonio Patto; SANTOS, João Bosco dos; PINTO, César Augusto Brasil P.. **Genética na agropecuária**. 4ª. ed. Lavras: UFLA, 2008. 464 p.

RAMANNA, M. S.; JACOBSEN, E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement- A Review. **Euphytica** v.133, n. 1, p. 3-18, 2003.

RAZA, H. et al. *In vitro* induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content **International Journal of Agriculture Biology**., v. 5, n. 3, p. 298-302, 2003.

RESENDE, G. M.; DIAS, R. de C. S.; COSTA, N. D. Clima. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. (Ed.). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>. Acesso em: 30 outubro. 2016.

RIAZ, S. et al. Study of Dichlorophenoxyacetic Acid and 6-Benzylaminopurine Effects on Callus Development in *Cucurbita moschata*, **Molecular Plant Breeding**, v.7, n. 3, p. 1-12, 2016

ROMÃO, R. L. Northeast Brazil: A secondary center of diversity for watermelon (*Citrullus lanatus*) **Genetic Resources and Crop Evolution** v. 47, n. 2, p.207-213, 2000.

SANTOS, E. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese: Uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 165-173, 2002.

SANTOS, J. S. et al. Compatibilidade com porta-enxertos, rendimento e qualidade de frutos em cultivares de melancia triploide. **Revista Caatinga**. Mossoró, v.27, n. 2, p.141 – 147, 2014

- SHEIKH, S. et al. Phenotypic Markers for Tetraploid Watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] Following Parental Exposure to Colchicine in T0 Generation. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. v. 54, n.6, p. 524-530, 2013.
- SILVA, C. M. J. **Comportamento de populações de melancia para prolificidade**. 2010. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Horticultura Irrigada). Universidade Estadual da Bahia, Juazeiro-BA. 2010.
- SILVA, A. F.; SANTOS, C. A. F.; ARAUJO, F. P. de; LIMA NETO, F. P.; MOREIRA, J. N.; FERREIRA, M. A. J. F.; LEÃO, P. C. de S.; DIAS, R. de C. S.; ALBUQUERQUE, S. G. de. Recursos genéticos vegetais conservados na Embrapa Semiárido. In: SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Petrolina: Embrapa Semiárido cap. 8, p. 274-315. 2010.
- SILVA, M. L. et al. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, n. 4, p. 405-409. 2006.
- SILVA, M. L. **Avaliação molecular da variabilidade genética do Banco ativo de germoplasma de melancia do Nordeste brasileiro**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.
- SILVA NETO, S. P.; ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 730p.
- SILVA, P. A. K. X. **Indução de poliploidia em mandioca**. 2014. 71f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2014.
- SILVEIRA, L.M.. et al. Seleção de acessos e progênes de *Citrullus* spp. para resistência a três potyvirus. **Fitopatologia Brasileira** v. 30, n. 4, p.394 -399, 2005.
- SILVEIRA, L.M. et al. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology** v. 34, n. 2, p.123- 126, 2009.
- SOARES, T. L. et al. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. **Ciência Rural**, v. 41, n.10, p. 1744-1749, 2011.
- SONG, H. et al. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) **Plant Cell Tissue Organ Culture** v. 90, n. 3, p.245–254, 2007.
- SOUZA, F. F., QUEIRÓZ, M. A., DIAS, R. C. S. Melancia sem sementes: Desenvolvimento e avaliação de híbridos triploides experimentais de melancia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** – Encarte especial. 1999.
- SOUZA, F. F.; QUEIROZ, M. A.; DIAS, R. C. S. Desenvolvimento de híbridos triploides experimentais de melancia. **Sitientibus série Ciências Biológicas** v.1, n.2, p. 154-160, 2001.
- SOUZA, F. F.; DIAS, R. C. de; QUEIRÓZ, M. A. Capacidade de combinação de linhagens avançadas e cultivares comerciais de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 4, p. 595-601, 2013.

- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras v. 26, n. 6, p.1209-1217, 2002.
- TAMAYO-ORDÓÑEZ, M. C. et al. Advances and perspectives in the generation of polyploid plant species. **Euphytica**, v. 209, n.1, p. 1-22, 2016.
- TERAO, D.; CASTRO, C. J. M.; LIMA, M. F.; BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G. ; REIS, A.; DIAS, R. de C. S. Doenças. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. (Ed.). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 30 outubro. 2016.
- TOMÉ, L.G. O. et al. Colchicine and oryzalin effects on tetraploid induction and leaf anatomy of *Solanum commersonii* ssp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 11, p. 1973-1979, 2016.
- VIEIRA, L. J. et al. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) **Acta Botanica Brasilica** v. 26, n.2, p. 350-356, 2012.
- WANG, J. LI, DAI-LI. KANG, X.Y. Induction of unreduced megaspores with high temperature during megasporogenesis in *Populus*. **Annals of Forest Science** v. 69, n. 1, p.59-67, 2012.
- WHITAKER, T.W.; DAVIS, G. N. **Cucurbits: botany, cultivation, and utilization**. London: L. Hill, 1962. 250 p.
- WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 9, n. 1-2, p. 155-164, 2003.
- XUE, G. R.; W. Y.; YU, F.E.I. Watermelon plants derived by *in vitro* anther culture. **Plant Physiology Communications**. v. 4, p. 40-42, 1983.
- ZHU, YING-CHUN et al. Advances of Watermelon Anther Culture Technology. **China Cucurbits and Vegetables**. v. 23, n.1, p. 28-31, 2010.
- YANG, J. et al. Induction of 2n pollen with colchicine during microsporogenesis in *Eucalyptus* **Euphytica** v. 210, n.1, p.69-78, 2016.
- YOUNIS, A.; HWANG, Y.; LIM, K.; Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. **Plant Cell Reports** v.33, n. 2, p. 215-223, 2014.

**CAPÍTULO 1 - EFEITO DA TEMPERATURA E DO USO DE REGULADORES DE  
CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE MELANCIA**

## RESUMO

A indução de calos é uma das vias requeridas para regeneração de uma planta haploide através da cultura de anteras. A viabilidade polínica, o efeito de reguladores de crescimento e do pré-tratamento com frio em anteras de duas linhagens de melancia (Smile e Sugar Baby), foram avaliados com o objetivo de induzir a formação de calos. Estimou-se a viabilidade polínica utilizando-se a técnica de coloração com carmim acético a 2%. Para o cultivo *in vitro*, botões florais masculinos foram coletados e desinfestados para a retirada das anteras, que, em seguida, foram inoculadas em meio de Murashige e Skoog (MS) suplementado com 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 5,0  $\mu\text{M}$ ) ou com 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0  $\mu\text{M}$ ), em combinação com 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, associado também com um pré-tratamento das anteras a uma temperatura de (4 °C) por dois dias. Avaliaram-se a formação de calos e a oxidação nos tecidos das anteras. As duas linhagens estudadas apresentaram alto percentual de viabilidade polínica (93 a 98%). As concentrações de 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  do regulador 2,4-D estimularam uma maior formação de calos friáveis. A concentração ótima do regulador 2,4-D foi estimada em 3,78  $\mu\text{M}$  e 4,17  $\mu\text{M}$  com respectivas porcentagens de indução de calos de 64% e 52%. A combinação de 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D com BAP não promoveu aumento na resposta das anteras à indução de calos. O pré-tratamento de botões florais a 4 °C proporcionou a indução de calos, sendo as respostas das anteras quanto a indução de calos, dependente do genótipo.

**Palavras-chave:** Calogênese em anteras. *Citrullus lanatus*. Pré-tratamento com baixa temperatura. Regulador vegetal. Viabilidade polínica.



## ABSTRACT

Callus induction is one of the pathways required for haploid plant regeneration through anther culture. Pollen viability, as well as the effect of growth regulators and cold pretreatment on anthers of two watermelon lines (Smile and Sugar Baby) to induce callus formation were herein evaluated. Pollen viability was estimated through the staining technique using 2% acetic carmine. Male flower buds were collected and disinfested to allow anthers removal. These anthers were inoculated in Murashige and Skoog (MS) medium, which was supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 or 5.0  $\mu\text{M}$ ) or with 6-benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, or 2.0  $\mu\text{M}$ ), in combination with 2.0  $\mu\text{M}$  of 2,4-D, associated with anther pretreatment at 4°C, for two days, for cultivation *in vitro*. Callus formation and oxidation in anther tissues were evaluated. The two herein studied watermelon lines presented high pollen viability rate (from 93 to 98%). Concentrations 2.0 and 5.0  $\mu\text{M}$  of 2,4-D regulator stimulated higher friable callus formation. The optimal concentration of 2,4-D regulator was estimated at 3.78  $\mu\text{M}$  and 4.17  $\mu\text{M}$ , and presented callus induction rates 64% and 52%, respectively. The combination between 2.0  $\mu\text{M}$  of 2,4-D and BAP did not lead to increased anther response to callus induction. The pre-treatment applied to flower buds at 4°C enabled callus induction and the anther response to callus induction was genotype-dependent.

**Keywords:** Callogenesis in anthers. *Citrullus lanatus*. Pre-treatment at low temperature. Plant growth regulator. Pollen viability.

## 1.1 INTRODUÇÃO

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] pertence à família Cucurbitaceae, destacando-se *C. lanatus* var. *lanatus* como a melancia cultivada para consumo humano, e de ampla distribuição mundial (WHITAKER; DAVIS, 1962; MOHR, 1986). Em 2016, a China foi o maior produtor mundial de melancia, seguida pela Turquia, pelo Irã e pelo Brasil, que alcançaram juntos, aproximadamente, 76% do total produzido no mundo (FAOSTAT, 2016).

A melancia é fonte de vitaminas C e do complexo B, além de sais minerais como cálcio, fósforo e ferro, 90% de seu volume é água. É considerada hidratante e diurética, elimina resíduos do aparelho digestivo e funciona como laxante. O fruto possui quantidades abundantes de antioxidante licopeno (confere a cor vermelha), bem como é uma fonte excelente do aminoácido citrulina. Nas cultivares de polpa amarela, a cor é conferida por  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A) e por xantofilas (DIAS; RESENDE, 2010).

A obtenção de linhas puras de homozigotos através de técnicas convencionais de reprodução em melancia requer um período longo, como 10-12 anos. No entanto, com técnicas *in vitro* mais rápidas e eficazes, como "técnicas de haploidia", é possível obter 100% de linhas puras de homozigotos, conseguindo-se plantas com número de cromossomos haploides e duplicando-se os cromossomos com colchicina. Assim, o processo de obtenção de homozigotos pode ser reduzido a um ou dois anos (BAKTEMUR et al., 2013). Entre as técnicas *in vitro*, a cultura de anteras permite a obtenção de plantas haploides, as quais, após duplicação cromossômica, resultam na produção de linhas homozigóticas duplo-haploides (GERMANÀ, 2011).

Nas cucurbitáceas, vários métodos foram utilizados para indução de plantas haploides, tais como: uso de pólenes irradiados em melão (YETISIR; SARI, 2003) e em melancia (GURSOZ et al., 1991; SARI et al., 1994); emprego da ginogênese (cultura *in vitro* de óvulos e ovários) e da androgênese (cultura *in vitro* de micrósporos e anteras) (GATAZKA; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, 2013), entre outros. No processo de regeneração de plantas *in vitro*, a formação de calos é uma das vias requeridas para obtenção de uma plântula (GEORGE et al., 2008). Na androgênese, por exemplo, uma das rotas que pode ser seguida no processo de divisão é a proliferação e formação de calo que se diferencia via embriogênese ou organogênese, formando uma nova planta (SANTOS; BONADESE-ZANETTINI, 2002; GERMANÀ, 2011). Estudos prévios de indução de calos, visando à uma regeneração

eficiente, tem sido realizados com diferentes tipos de explantes em pepino (ABU-ROMMAN et al., 2013 e GOLABADI et al., 2017) e em abóbora (RIAZ et al., 2016).

Estudos sobre a viabilidade polínica são importantes e necessários para programas de melhoramento genético de uma espécie, uma vez que, podem subsidiar e direcionar futuros cruzamentos entre genótipos (VIEIRA et al., 2012). Por exemplo, cruzamentos entre plantas portadoras de polens inviáveis resultarão em plantas estéreis e em menor produção de grãos (ZANOTTO et al., 2009). Portanto, a estimativa da viabilidade de pólen é potencialmente útil para a androgênese, uma vez que a utilização da antera com o grão de pólen viável, poderá proporcionar a formação de indivíduos normais. Nesse caso, há vários métodos colorimétricos para estimar a viabilidade dos grãos de pólen, dentre eles a coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), reativo de Alexander, carmim acético, lugol, Sudan IV, entre outros (MUNHOZ et al., 2008). Contudo, trabalhos referentes a viabilidade polínica com a cultura da melancia ainda são pouco estudados.

O uso de reguladores de crescimento é outro fator que tem contribuído para o estabelecimento da cultura de anteras de muitas espécies, inclusive em melancia. Abdollahi et al. (2015), por exemplo, estudaram em duas cultivares de melancia (Charleston Gray e Crimson Sweet), o efeito do uso de fitormônios, ovário de trigo como co-cultura, e do pré-tratamento com diferentes temperaturas, em anteras para indução de calos e de embriões com o objetivo de regeneração de plantas duplo-haploides através da cultura de anteras. Em pepino (*Cucumis sativus*), Ashok Kumar et al. (2003) obtiveram calos, embriões e, conseqüentemente, plantas haploides, mediante o uso de diferentes concentrações de 2,4-D, BAP, cinetina (KIN) e thidiazuron (TDZ) como na combinação desses reguladores. Song et al. (2007) também obtiveram sucesso na androgênese em pepino, com a obtenção de calos, embriões e regeneração de plantas duplo-haploides com o uso de 2,4-D, BAP e KIN.

O pré-tratamento com temperaturas (altas e baixas) corresponde a outro fator manejado para melhorar a resposta dos tecidos das anteras para indução de plantas duplo-haploides. Segundo Germaná (2011), o pré-tratamento com o frio a 4 °C por 2-3 semanas tem sido utilizado, rotineiramente, na cultura de anteras de muitas espécies, e o seu efeito é dependente do genótipo. Entre as cucurbitáceas, alguns relatos mostram o efeito do pré tratamento das anteras a 4 °C por dois dias, obtendo bons resultados de indução de calos para a cultura do pepino (47,76% na cv. Calypso e 54,43% na cv. Green Long) (ASHOK KUMAR

et al., 2003; SONG et al., 2007) e para melancia (45,00% na cv Crimson Sweet) (ABDOLLAHI et al., 2015).

Considerando que os estudos realizados com cultura de anteras em melancia ainda são escassos no Brasil, o objetivo desse trabalho foi estimar a viabilidade polínica e verificar as respostas de diferentes genótipos de melancia quanto à formação de calos em tecidos de anteras, pela utilização de reguladores de crescimento e temperatura.

## **1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.2.1 Material vegetal**

Os materiais utilizados no presente estudo foram duas linhagens de melancia derivadas de ‘Smile’ e ‘Sugar Baby’ oriundas do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste (BGCIA) Brasileiro, – pertencente a Embrapa Semiárido.

### **1.2.2 Viabilidade polínica**

As análises foram realizadas com base no procedimento descrito por Guerra; Souza (2002). Três botões florais de cada linhagem (‘Smile’ e ‘Sugar Baby’) foram coletados no período da manhã, antes da antese, em plantas cultivadas em campo com 30 dias de cultivo. Foram fixados diretamente em solução de Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v). As fixações foram mantidas entre 2 e 24 horas à temperatura ambiente sendo, em seguida, estocadas a -20 °C até sua análise. Posteriormente, com auxílio de um estereomicroscópio, as anteras foram retiradas, obtendo-se os grãos de pólen, os quais foram distribuídos em lâmina de vidro para realização da coloração.

Com o auxílio de um microscópio, a viabilidade polínica das linhagens foi estimada a partir da coloração com carmim acético 2% e pela contagem de grãos de pólen em cinco campos aleatórios da lâmina. Avaliou-se 200 grãos de pólen de três anteras de cada botão floral. Foram considerados inviáveis os grãos de pólen não corados, de tamanho menor e com a parede citoplasmática enrugada. Com o auxílio do programa Dino Capture 2.0 o diâmetro dos grãos de pólen foi determinado, medindo-se o maior comprimento transversal do grão.

### **1.2.3 Coleta, desinfestação e condições da cultura de anteras**

Botões florais masculinos de 3 a 5 mm de comprimento das duas linhagens (‘Smile’ e ‘Sugar Baby’) foram coletados no período da manhã, antes da antese, em plantas cultivadas

em campo com 30 dias de cultivo. No laboratório, os botões florais foram lavados em água corrente por aproximadamente 5 minutos, sendo desinfestados dentro de uma câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 20% (v/v) por 15 minutos, seguido de uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, fez-se uma incisão para abertura dos botões e a retirada das anteras, que posteriormente foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, pH ajustado para  $5,9 \pm 1$ , sendo autoclavado a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1 atm, durante 25 minutos. Foram realizados dois experimentos. Para os dois experimentos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. As parcelas foram representadas por uma placa de Petri contendo 12 anteras, totalizando cinco placas e 60 anteras. No primeiro, o meio MS foi suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-diclorofenoxiacético, utilizou-se o arranjo fatorial duplo ( $2 \times 5$ ) de duas linhagens derivadas de ‘Smile’ e ‘Sugar Baby’ x cinco concentrações de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0  $\mu\text{M}$ ), totalizando 10 tratamentos. Essas concentrações foram escolhidas por adaptação dos relatos de Ashok Kumar et al. (2003) e Abdollahi et al. (2015). No segundo experimento, optou-se pela concentração de 2  $\mu\text{M}$ , por apresentar valores absolutos de porcentagem de calo induzido no primeiro experimento muito próximo àquela obtida na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ . Utilizou-se o arranjo fatorial triplo ( $2 \times 2 \times 5$ ) com duas linhagens derivadas de ‘Smile’ e ‘Sugar Baby’ x presença e ausência de pré-tratamento a frio x cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0  $\mu\text{M}$ ), totalizando 20 tratamentos. Vale ressaltar que todos os tratamentos tiveram a adição de 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ao meio.

Após a coleta, os botões florais do pré-tratamento com frio foram dispostos em placa de Petri sobre papel de filtro umedecido com água destilada autoclavada e colocados em geladeira a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por dois dias. Em seguida, após a inoculação em meio de cultura, os materiais foram incubados em uma sala de crescimento com temperatura de  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , por quatro semanas, sendo, transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade de luz de  $40 \mu\text{molm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  promovida por lâmpadas fluorescentes.

#### 1.2.4 Avaliações e análises estatísticas

Para a análise da estimativa da viabilidade polínica, avaliou-se a porcentagem dos grãos de pólen viáveis, bem como o diâmetro dos grãos de pólen viáveis e inviáveis. Os dados

foram submetidos a análise de variância (ANAVA) e para comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância, através do programa R.

As avaliações foram realizadas com quatro semanas de incubação. Avaliou-se a porcentagem de anteras que formaram calo e atribuiu-se uma escala de notas para avaliação da porcentagem de anteras oxidadas (0= 0%, 1= 1 a 30%, 2= 31 a 60%, 3= 61 a 90% e 4=91 a 100%). A cor das anteras oxidadas foi avaliada através da escala de cor para tecidos de plantas de Munsell (1977).

Os dados do primeiro experimento foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e, em seguida, os valores médios dos genótipos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância, e dos tratamentos referentes à concentração dos reguladores de crescimento, comparados por regressão com base no modelo polinomial. Para o segundo experimento, os dados não foram normalmente distribuídos. Dessa forma, esses foram analisados utilizando a estatística descritiva, cujas variáveis foram frequência de indução de calos  $\pm$  erro padrão. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R versão 3.3.2 (R CORE TEAM, 2016).

### **1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **1.3.1 Avaliação da viabilidade polínica**

Os resultados da estimativa da viabilidade polínica estão apresentados na Tabela 1. A análise com o corante carmim acético a 2% permitiu observar diferenças entre as linhagens estudadas quanto ao diâmetro dos grãos de pólen (Tabela 1). Em ambas, houve a predominância dos grãos de pólen viáveis (corados) (Figura 1A), cuja viabilidade estimada foi acima de 93% (Tabela 1). Estes resultados indicam alta fertilidade, uma vez que, a alta viabilidade polínica está correlacionada com a formação de gametas normais e balanceados que garantem o sucesso reprodutivo da espécie (MARTINS et al., 2010).

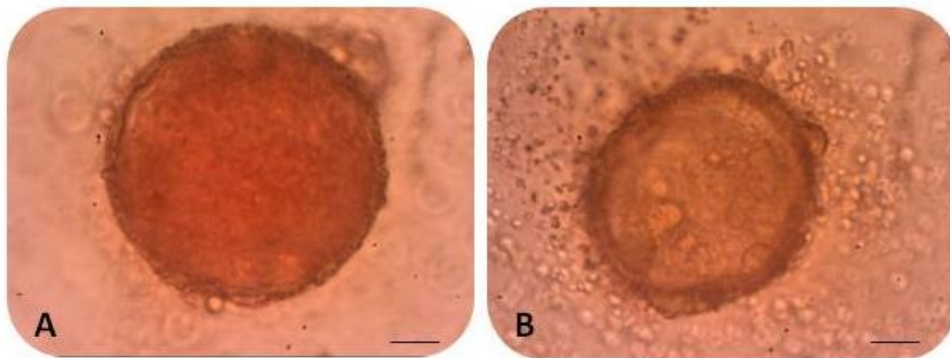
Observou-se que houve uma variação significativa no tamanho dos grãos de pólen viáveis e inviáveis entre as linhagens estudadas, tendo a Smile apresentado um maior tamanho médio, tanto dos grãos de pólen viáveis como dos inviáveis (Figura 1B; Tabela 1). Essas diferenças morfológicas podem ser resultado da variação que ocorre dentro da espécie. Nesse caso, Zanotto et al. (2009) relataram que as variações observadas entre os diversos genótipos são intrínsecas de cada acesso e esperadas, principalmente quando utilizadas dentro de um programa de melhoramento vegetal, considerando-se o fato de envolver diferentes

cruzamentos e origens distintas. Variedades diferentes de uma mesma espécie podem apresentar grande variabilidade na viabilidade do grão de pólen.

**Tabela 1.** Estimativa da viabilidade de grãos de pólen em duas linhagens de melancia (*Citrullus lanatus*) mediante a coloração com carmim acético 2%.

<b>Linhagens</b>	<b>*VP</b>	<b>**DGPV</b>	<b>***DGPIN</b>
	Média (%)	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )
Smile	93,5 a	60,41 a	51,10 a
Sugar Baby	98,0 a	55,14 b	45,22 b

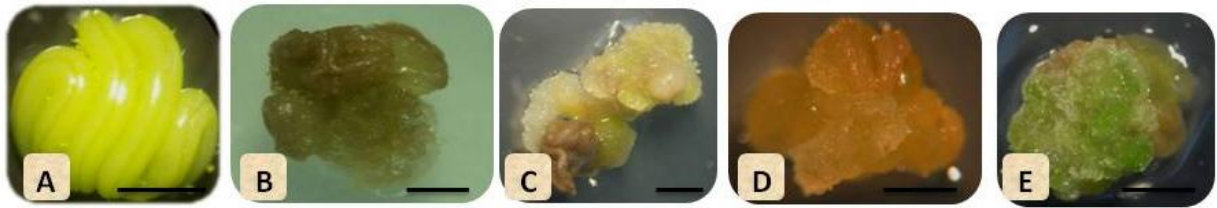
Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância \*Viabilidade polínica, \*\*Diâmetro do grão de pólen viável, \*\*\*Diâmetro do grão de pólen inviável (média).



**Figura 1.** Grãos de pólen de linhagens de melancia (*Citrullus lanatus*) mediante a coloração com carmim acético 2%. Viáveis (corados) (A), inviáveis (não corados) (B). Barras representam= 10  $\mu\text{m}$

### 1.3.2 Efeito do regulador 2,4-D na indução de calos a partir de anteras (Experimento 1)

A ANAVA revelou que não houve interação significativa entre as linhagens e as concentrações estudadas. Entretanto, houve resposta diferencial entre as concentrações do regulador 2,4-D para indução de calos (Figura 3). As anteras inoculadas em meio MS suplementado com 2,4-D (0,5; 1,0; 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) aumentaram de tamanho após 2-3 semanas, desenvolvendo, subsequentemente após mais 2-3 semanas, calos friáveis. Os calos apresentaram estrutura friável de coloração branco translúcido (Figuras 2A a 2E).



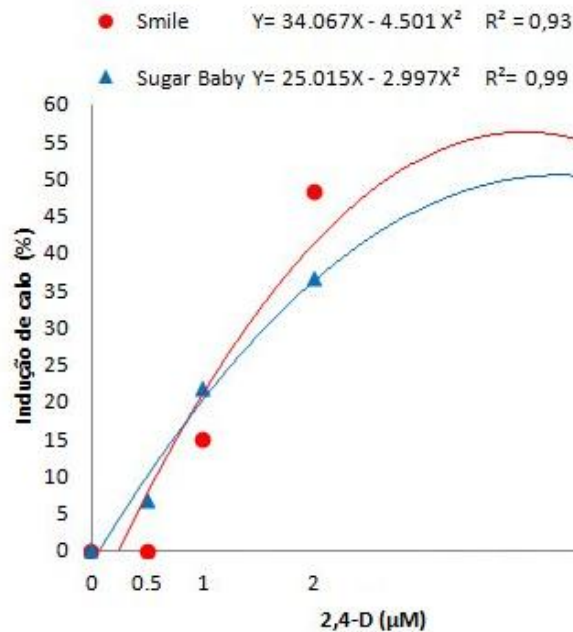
**Figura 2.** Resposta *in vitro* da indução de calos friáveis em anteras de melancia (*Citrullus lanatus*) (linhagens de Smile e Sugar Baby): (A) Antera; (B) e (C) Formação de calo a partir da cultura de anteras das linhagens de Smile e Sugar Baby em meio contendo 5,0 µM de 2,4-D; (D) e (E) Formação de calo em anteras das cvs. Smile e Sugar Baby cultivadas em meio com 2,0 µM de 2,4D + 0,0 de BAP. Barras representam= 10 mm

As anteras das duas linhagens que foram cultivadas em meio MS sem suplementação do regulador de crescimento 2,4-D não apresentaram nenhuma resposta morfogênica durante o período de quatro semanas. No entanto, em todas as concentrações do 2,4-D houve estímulo para indução de calos em anteras da linhagem Sugar Baby (Figura 3). Vale salientar que houve alto percentual de oxidação nas anteras cultivadas tanto em meio isento de regulador quanto em meio com 0,5 µM de 2,4-D para a referida linhagem (Figura 4B). Essa reação é indesejável para a cultura de tecidos uma vez que é, desencadeada no processo de injúria dos tecidos (corte), causando a liberação e a oxidação de compostos fenólicos que provocam um escurecimento no tecido do explante, inibindo o seu crescimento (MELO et al., 2001). No entanto, pode se observar que, com o aumento das concentrações do regulador 2,4-D, (1,0, 2,0 e 5,0 µM) a oxidação observada não promoveu efeito fitotóxico para impedir a formação de calos nas anteras das duas linhagens estudadas (Figuras 4A e 4B). Já para a Smile, somente a concentração de 0,5 µM de 2,4-D não proporcionou respostas nas anteras para a formação de calos (Figura 3). Com estes resultados, verifica-se que a formação de calo só ocorreu mediante a utilização do regulador 2,4-D, que é utilizado na cultura de tecidos, geralmente para a formação de calos e, para a iniciação da embriogênese somática, o qual tem sido o regulador mais utilizado em concentrações que variam de um a dez micromolar (GEORGE et al., 2008).

Na análise da regressão polinomial em função das concentrações do regulador 2,4-D, a curva foi ascendente ajustando-se ao modelo quadrático para as duas linhagens (Smile e Sugar Baby) com o coeficiente de determinação  $R^2$  maior que 93%. Nesse caso, para as linhagens Smile e Sugar Baby, a concentração ótima do regulador de crescimento 2,4-D foi estimada em 3,78 e 4,17 µM, com o percentual de obtenção de calos também estimado de 64% e 52%, respectivamente (Figura 3). As anteras das duas linhagens (Smile e Sugar Baby) iniciaram



uma resposta a indução de calos de 15 a 21%, respectivamente, quando foram estimuladas com 1,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Figura 3). Além disso, apresentaram comportamento quadrático, ou seja, na medida em que, aumentou as concentrações do regulador, houve aumento na porcentagem de indução de calos até a concentração ótima de 3,78 e 4,17  $\mu\text{M}$  para Smile e Sugar Baby, respectivamente (Figura 3).



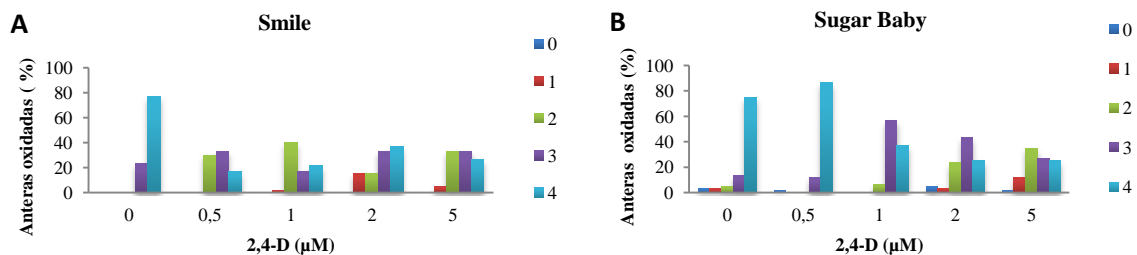
**Figura 3.** Indução de calos friáveis em anteras das linhagens de Smile e Sugar Baby de melancia em função das diferentes concentrações de 2,4-D (Experimento 1).

Analisando a maior formação de calos friáveis obtida nas anteras das duas linhagens estudadas pelas concentrações do regulador 2,4-D, observa-se que 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  induziram um maior percentual médio de calos, acima de 38% (Figura 3). Este resultado foi superior ao obtido por Ashok Kumar et al. (2003), quando cultivaram anteras de duas cultivares de pepino em meio suplementado com 2,4-D nas concentrações de 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$ , obtendo um percentual médio acima de 25% de indução de calos. Outro resultado semelhante foi encontrado por Abdollahi et al. (2015) quando avaliaram o cultivo de anteras de melancia da cultivar Charleston Gray, também utilizando a auxina 2,4-D, observando 31,67% (2,0  $\mu\text{M}$ ) e 25,0% (5,0  $\mu\text{M}$ ) de indução de calos. Pelo resultado obtido nesse trabalho, a ação do 2,4-D para indução de calos foi positiva para as duas linhagens estudadas, confirmando a importância desse regulador na indução de calos em culturas de anteras (SONG et al., 2007).

**Tabela 2.** Percentual de calos friáveis em anteras de linhagens de melancia (*Citrullus lanatus*) utilizando o regulador de crescimento 2,4-D (Experimento 1)

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Anteras inoculadas	Frequência de indução de calos friáveis (%)	
2,4-D	Nº	Smile	Sugar Baby
0,0	60	0,00	0,00
0,5	60	0,00	6,67
1,0	60	15,00	21,66
2,0	60	48,36	38,33
5,0	60	50,00	48,34
<b>Médias</b>		<b>23,42 a</b>	<b>23,00 a</b>

Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância



**Figura 4.** Distribuição de frequências para oxidação de anteras de linhagens derivadas de Smile e Sugar Baby de melancia (*Citrullus lanatus*) cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de 2,4-D. Linhagem derivada de Smile (A) e Linhagem derivada de Sugar Baby (B). 0) 0%; 1) 1-30%; 2) 31-60%; 3) 61-90%; 4) 91-100% de anteras oxidadas (Experimento 1).

### 1.3.3 Efeito de BAP em combinação com 2,0 $\mu\text{M}$ de 2,4-D e da temperatura como pré-tratamento (Experimento 2)

O efeito do BAP em combinação com 2,4-D (2,0  $\mu\text{M}$ ), bem como da presença e ausência de pré-tratamento a 4 °C por dois dias na indução de calos em anteras de melancia estão relacionados na Tabela 3. Analisando os resultados obtidos entre as duas linhagens, a Smile apresentou percentuais médio superiores de obtenção de calos em anteras tanto na ausência como na utilização do pré-tratamento a 4 °C por dois dias, com um aumento na indução de calos de 52,50% e 240,24%, respectivamente, em relação a Sugar Baby (Tabela 3). Este resultado deve-se ao fato de que o genótipo é um dos fatores que pode influenciar na

resposta *in vitro* do pólen, devido aos fatores endógenos. Ou seja, diferentes cultivares dentro de uma espécie podem apresentar diversas respostas e por isso, devem ser avaliadas (GERMANÀ, 2011). Ashok Kumar et al. (2003), por exemplo, trabalhando com pepino também encontraram diferenças entre as cultivares (Calypson e Green Long) para a respostas das anteras à indução de calos. Shalaby (2007), avaliou a indução *in vitro* de haploides a partir da ginogênese em 12 genótipos de abóbora, encontrando diferentes respostas entre os mesmos para indução de embriões e plântulas. Golabadi et al. (2017) testaram dois genótipos na cultura de ovário de pepino e obtiveram diferenças significativas na porcentagem da embriogênese e na indução de calos.

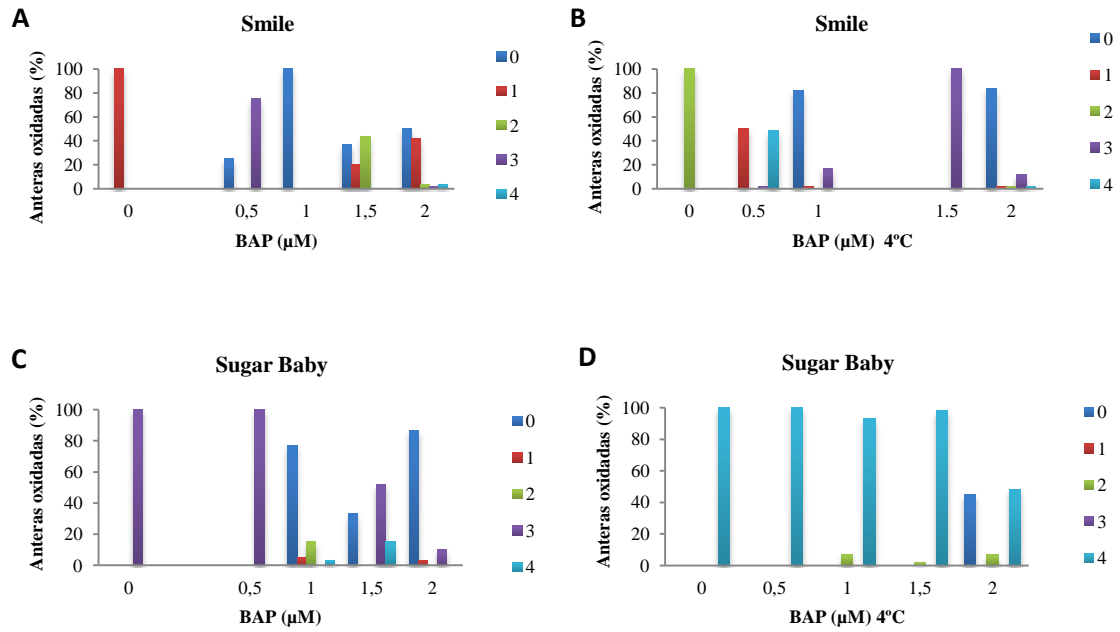
Para as duas linhagens avaliadas ('Smile' e 'Sugar Baby'), as concentrações do regulador de crescimento BAP utilizadas em combinação com 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D não foram eficientes para aumentar a obtenção de percentuais de indução de calos friáveis (Tabela 3). Este resultado permite inferir que a combinação de BAP com 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D não foi eficaz para o aumento da indução de calos nas linhagens estudadas. Uma vez que, no tratamento controle (ausência do pré-tratamento a 4 °C) das duas linhagens, as maiores porcentagens de indução de calos de 20% e 25%, foram obtidas apenas com o uso de 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Tabela 3). Entretanto, para a linhagem derivada de Smile houve resposta das anteras para indução de calos em todas as concentrações de BAP em combinação com 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, embora com valores menores quando comparado com o 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Verifica-se também que a oxidação observada nas anteras não interferiu na indução de calos (Figuras 5A e 5B). Já para a linhagem Sugar Baby, não ocorreu o mesmo. Para esta, além do tratamento controle, houve resposta das anteras à indução de calos de aproximadamente 10%, a qual foi promovida pela combinação entre 2,4-D (2,0  $\mu\text{M}$ ) e BAP (0,5  $\mu\text{M}$ ). No entanto, este resultado não é considerado como positivo quando comparado com o tratamento controle, o qual continha 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Tabela 3). Embora se observando quase a totalidade das anteras com oxidação na escala de 61% a 90%, houve resposta das anteras nessa combinação, sendo superior às demais (Figura 5C). Entretanto, estes resultados diferem dos obtidos por Abdollahi et al. (2015) que relataram o efeito da combinação do 2,4-D com BAP em anteras da cultivar Charleston Gray de melancia, sendo o mesmo positivo com respostas de 75% a 88% de indução de calos. Da mesma forma em outro estudo com anteras de pepino, Ashok Kumar et al. (2003), avaliando duas cultivares (Calypso e Green Long) também obtiveram bons resultados (26% a 47%) utilizando a mesma combinação de reguladores de crescimento. Contudo, no presente trabalho, as plantas doadoras dos botões florais masculinos foram

infestadas pelo inseto Tripes (*Thrips tabaci*), o qual possivelmente pode ter adentrado no interior da antera e causado necrose no tecido sem sintomas aparente (Dados não mostrados). Isto pode ter interferido também nos resultados obtidos.

Comparando os resultados das anteras das duas linhagens submetidas ao pré-tratamento com 4 °C por dois dias, observa-se que as anteras da linhagem derivada de Smile responderam mais a indução de calos do que a linhagem Sugar Baby com um percentual médio de 11,33% (240,24%), de indução de calos friáveis contra 3,33% na linhagem de Sugar Baby. Essa resposta diferencial quanto ao efeito do pré-tratamento das anteras com frio provavelmente é dependente do genótipo, conforme já relatado anteriormente por Germanà (2011). Pode-se observar também que há uma maior oxidação das anteras da linhagem derivada de Sugar Baby (Figura 5D) do que da linhagem de Smile (Figura 5B), o que possivelmente tenha interferido no resultado observado, uma vez que a oxidação fenólica interfere no desenvolvimento do explante (MELO et al., 2001). Contudo, Ashok Kumar et al. (2003) e Song et al. (2007), trabalhando com cultura de anteras de pepino, encontraram resultados benéficos com a utilização do pré-tratamento com baixas temperaturas. Além disso, em melancia, Abdollahi et al. (2015) avaliaram o cultivo de anteras da cultivar Crimson Sweet submetidas também ao pré-tratamento a 4 °C por dois dias e obtiveram percentagens de calogênese de até 45%, demonstrando que o efeito da baixa temperatura pode influenciar de forma positiva na cultura de anteras dessa espécie.

**Tabela 3.** Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) em combinação com 2,0 µM de 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e da baixa temperatura como pré-tratamento na indução de calos friáveis em anteras de linhagens de melancia (Experimento 2)

Regulador de crescimento (µM)	Anteras inoculadas (N°)	Frequência de indução de calos friáveis (%)			
		Média ± erro padrão Pré-tratamento (4°C)			
		Smile		Sugar Baby	
		Ausência	Presença	Ausência	Presença
BAP					
0,0	60	20,00 ± 3,33	0,00	24,99 ± 2,64	0,00
0,5	60	8,34 ± 8,33	4,99 ± 3,33	9,99 ± 8,08	0,00
1,0	60	8,34 ± 8,33	28,33 ± 10,07	0,00	8,33 ± 0,21
1,5	60	3,32 ± 2,04	6,66 ± 3,12	0,00	1,66 ± 0,19
2,0	60	13,34 ± 4,25	16,66 ± 4,46	0,00	6,66 ± 0,19
<b>Média</b>		<b>10,66 ± 5,51</b>	<b>11,33 ± 6,38</b>	<b>6,99 ± 5,46</b>	<b>3,33 ± 2,06</b>



**Figura 5.** Distribuição de frequências para oxidação de anteras de linhagens de melancia (*Citrullus lanatus*) cultivadas em meio contendo 2,0 μM de 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e com temperatura a 4 °C como pré-tratamento. Anteras oxidadas da Linhagem derivada de Smile sem pré-tratamento (A) e com pré-tratamento (B) Anteras oxidadas da Linhagem derivada de Sugar Baby, sem pré-tratamento (C) e com pré-tratamento (D). 0) 0%; 1) 1-30%; 2) 31-60%; 3) 61-90%; 4) 91-100% de anteras oxidadas.

## CONCLUSÕES

Foi possível estimar a viabilidade polínica com carmim acético a 2%, bem como observar diferenças quanto ao tamanho dos grãos de pólen das linhagens avaliadas.

O regulador de crescimento 2,4-D foi eficiente para induzir a formação de calos nas anteras das duas linhagens avaliadas.

A combinação de 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D com BAP não aumenta a frequência de indução de calos nas anteras das linhagens estudadas.

As respostas das anteras ao pré-tratamento com temperatura a 4 °C e uso dos reguladores 2,4-D (2,0  $\mu\text{M}$ ) com BAP dependem das linhagens estudadas.

## REFERENCIAS

- ABDOLLAHI, M. R. et al. The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) **Brazilian Journal of Botany** v.38, n.3, p.:447–456, 2015.
- ABU-ROMMAN, S. SUWWAN, M. AL-RAMAMNEH, E. A. The influence of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of cucumber (*Cucumis sativus* L.) **Advances in Environmental Biology**, v.7, n.2, p. 339-343, 2013.
- ASHOK KUMAR, H.G. MURTHY, H.N PAEK, K.Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. **Scientia Horticulturae**. v.98, n.3, p. 213–222, 2003.
- BAKTEMUR, G.; TAŞKIN, H.; BÜYÜKALACA, S. Comparison of Different Methods for Separation of Haploid Embryo Induced through Irradiated Pollen and Their Economic Analysis in Melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*). **The Scientific World Journal**, 2013.
- DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. Socioeconomia. In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. (Ed.). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 06 março 2017.
- FAOSTAT 2016. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E.%20>. Acesso em: 19 fevereiro 2018.
- GATAZKA, J., NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. **Folia Horticulturae**. v.25, n.1, p. 67-78, 2013.
- GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tissue Organ Culture** v.104, n.3, p.:283–300, 2011.
- GEORGE, E.F., HALL, M. A., KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture** 3rd Edition Volume 1. The Background 2008.
- GOLABADI, M. et al. 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.
- GUERRA, M.; SOUZAS, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: **Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto**, 2002.
- GURSOZ, N., ABAK, K. PITRAT, M. RODE, J.C. DUMAS DE VAULX, R. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). **Cucurbit Genetics Cooperative Report** v.14, p.109-110, (article 38) 1991.
- IBGE. 2016 Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default>. Acesso em: 19 fevereiro 2018.
- MARTINS K. C. et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum* **Ciência Rural, Santa Maria**, v.40, n.8, p.1746-1751, ago, 2010.

- MELO, B. et al. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syngonium oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, Nov/Dez., 2001.
- MOHR, Hubert. C. Watermelon Breeding. In: BASSET, M. J. **Breeding vegetables crops**, Westport: Avi, 1986. p. 33-66.
- MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised médium for rapid growth and bio-assay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** v.15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica** v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.
- MUNSELL, A. H. **Munsell color charts for plant tissues**. Macbeth Division of Kollmorgen Instruments Corporation, Baltimore v. 405, p. 1-20, 1977.
- POZZOBON, M.T. et al. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira** v. 29, n.2, p. 212-216, 2011.
- R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- REETZ, E. R.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. Anuário brasileiro de fruticultura 2015. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 104 p.
- RIAZ, S. et al. Study of Dichlorophenoxyacetic Acid and 6-Benzylaminopurine Effects on Callus Development in *Cucurbita moschata*, **Molecular Plant Breeding**, v.7, n.3, p. 1-12, 2016.
- SANTOS, E. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese: Uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 165-173, 2002.
- SARI, N. et al. Induction of Parthenogenetic Haploid Embryos after Pollination by Irradiated Pollen in Watermelon **Hortscience** v.29, n.10, p.1189–1190, 1994.
- SHALABY, T. A. Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) **Scientia Horticulturae** v.115, n. 1, p. 1-6, 2007.
- SONG, H. et al. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.) **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.90, n. 3, p.245–254, 2007.
- YETISIR, H., SARI, N. A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization **Scientia Horticulturae** v.98, n. 3, p. 277–283, 2003.
- VIEIRA, L. J. et al. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 350-356, 2012.



ZANOTTO, M. et al. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de triticales. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, Edição Especial, v. 33, p. 2078-2082, 2009.

WHITAKER, T.W.; DAVIS, G. N. **Cucurbits**: botany, cultivation, and utilization. London: L. Hill, 1962. 250 p.

## **CAPÍTULO 2 - INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM GENÓTIPOS DE MELANCIA**

## RESUMO

Em melancia indivíduos tetraploides são utilizados para o desenvolvimento de híbridos triploides ou sem sementes. O objetivo deste trabalho foi induzir poliploidia em genótipos de melancia utilizando diferentes concentrações de colchicina, dois tempos de exposição, escarificação mecânica e métodos de aplicação. Sementes da cultivar Crimson Sweet, foram tratadas com colchicina (0,0; 0,1 e 0,2%) por 24 h e 48 h, com e sem escarificação. Para a linhagem LDRO, utilizou-se a colchicina (0,0; 0,1 e 0,2%), por 24 h e 48 h e diferentes métodos de aplicação de colchicina a 0,2%: a) direto na semente (MDS) com e sem escarificação, b) sementes com emissão da radícula (MER), c) no ponto de inserção entre o hipocótilo e a raiz (MIHR), d) no ápice da plântula (MAP) e e) no hipocótilo invertido (MHI). Em casa de vegetação, fez-se o plantio e a avaliação dos experimentos. Para os dois genótipos coletaram-se pontas de raízes para contagem do número cromossômico. Além de, avaliar a germinação, altura da plântula, diâmetro do hipocótilo, comprimento da raiz, massa fresca e seca da parte aérea e da raiz e para a LDRO; o número de cloroplastos por célula guarda de estômatos foliares e número e diâmetro equatorial e polar dos estômatos. Para Crimson Sweet, o maior percentual de indução foi de 29% em plantas tratadas com colchicina a 0,2% por 48 h, sem escarificação. Para LDRO, foi observada uma frequência de plantas com células tetraploides de 50% e 70%, utilizando colchicina a 0,2% por 24 h e 48 h, e nos métodos de aplicação, MDS com escarificação e MHI observou-se uma frequência de 10% e 25%.

**Palavras-chave:** Citogenética. *Citrullus lanatus*. Duplicação cromossômica em melancia. Melancia sem semente.

## ABSTRACT

Tetraploid watermelon individuals are used to develop triploid or seedless hybrids. The aim of the current study is to induce polyploidy in watermelon genotypes by using different colchicine concentrations, at two exposure times, mechanical scarification and application methods. Crimson Sweet cultivar seeds were treated with colchicine (0.0%; 0.1% and 0.2%) for 24 h and 48 h, with and without scarification. Colchicine at doses 0.0%, 0.1% and 0.2% for 24 and 48 h, as well as different 0.2% colchicine application methods were used: a) direct in the seed method (DSM, with and without scarification), b) radicle emission method (REM), c) hypocotyl and root insertion point method (HRIM), d) at the apex of the seedling method (ASM) and e) inverted hypocotyl method (IHM). Experiments were planted and assessed in greenhouse. Root tips of the two genotypes were collected for chromosome-number counting. Besides assessing germination, seedling height, hypocotyl diameter, root length, shoot fresh and dry mass of LDRO, we assessed the number of chloroplasts per leaf stomatal cell guard and the number and equatorial and polar diameter of stomata. The highest induction rate of Crimson Sweet was 29% in plants treated with 0.2% colchicine for 48h, without scarification. Tetraploid cell frequency 50% and 70% in LDRO was recorded at 0.2% colchicine for 24 and 48h; the DSM (with scarification) and IHM application methods recorded 10% and 25% frequency, respectively.

**Keywords:** Cytogenetics. *Citrullus lanatus*. Chromosome Duplication in watermelon. Watermelon with seeds.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A melancia é uma das frutas de maior representatividade no Brasil, sendo a sétima mais exportada em 2016 e no primeiro semestre de 2017, atrás de bananas, mamões, mangas, maçãs, limões, laranjas e melão. Ainda no primeiro semestre de 2017, o país movimentou US\$ 7,28 milhões com os embarques de melancia, onde 15,1 mil toneladas foram enviados para os compradores internacionais (ABRAFRUTAS, 2018). Nesse cenário destaca-se a melancia sem sementes, cuja produção no Nordeste do Brasil, concentram-se especialmente nos estados do Rio Grande Norte e Ceara. Este tipo de melancia é muito apreciado por um segmento de mercado mais exigente, e, devido ao seu tamanho reduzido, torna-se ideal para consumo em famílias pequenas, pois associa o desejo de consumo com a facilidade de ocupar pouco espaço nos refrigeradores. Além disso, a rentabilidade também é um importante fator que atraem os produtores para o cultivo da melancia sem sementes. Em 2012, a melancia sem semente representou 90% do total que foi comercializado nos Estados Unidos (LEVI et al., 2014).

Plantas tetraploides ( $4n=44$ ) de melancia são utilizadas para produção de híbridos triploides ou melancia sem semente (NOH et al., 2012). O cruzamento entre uma planta tetraploide (feminina) ( $4n=44$ ) e uma diploide (masculina) ( $2n=22$ ), resultará na produção do híbrido triploide ( $2n=3x=33$ ) (KIHARA, 1951), que ao ser cultivado produzirá frutos sem sementes.

A falta de plantas tetraploides adequadas tem dificultado progressos no sentido do desenvolvimento de uma ampla gama de cultivares de melancia sem semente de boa qualidade (JASKANI et al., 2005). Isso se deve principalmente, ao pequeno número de linhas tetraploides e a falta de diversidade destas para o programa de melhoramento, associado a seleção de linhas diploides inadequadas (NOH et al., 2012).

Alguns fatores limitam o número de linhagens tetraploides disponíveis em melancia, como: a baixa porcentagem de plantas 100% tetraploides, longo período de crescimento, baixa germinação das sementes, baixa recuperação das mudas durante o crescimento e número insuficiente de sementes para o desenvolvimento de triploides (SHEIKH et al., 2013). Além desses fatores, a variação na frequência de células tetraploides em um mesmo indivíduo é um aspecto que tem dificultado a obtenção de plantas tetraploides.

O método de obtenção de plantas tetraploides foi estabelecido por Kihara (1951). Este utiliza geralmente, o antimitótico colchicina em diferentes concentrações cuja ação evita a formação das fibras do fuso acromático durante a divisão celular e, conseqüentemente, os cromossomos duplicados não se movimentam para os polos da célula. Assim, com a formação da membrana celular, a célula terá o dobro do número de cromossomos (SOUZA et al., 1999).

Desde 1951, tem sido realizada a indução de tetraploidia em melancia com o objetivo de se obter híbridos triploides (KIHARA, 1951). Os trabalhos mais recentes foram realizados utilizando o reagente colchicina *in vitro* por Raza et al. (2003), em meristemas de plântulas; por Jaskani et al. (2005) adotando 0,2, 0,4 e 0,6% da solução de colchicina por três dias consecutivos; por Noh et al. (2012) que utilizaram diferentes métodos de duplicação cromossômica, direto na semente, hipocótilo invertido e no ápice aplicando a 0,1 e 0,2% e por Sheikh et al. (2013), que também aplicaram o antimitótico a 0,1 e 0,2% em diferentes partes da planta (diretamente na semente, ápice e hipocótilo invertido).

No Brasil, Medina et al. (1958), obtiveram mais de vinte plantas de melancia duplicadas ( $2n=44$ ) utilizando a colchicina a 0,1% em 754 sementes diploides em início de germinação ( $2n=22$ ), durante 8-12 horas de exposição. Em 2001, outro relato foi registrado por Souza et al. (2001) que trataram sementes de três linhagens de melancia com solução de colchicina a 0,2% por 24 horas e obtiveram sete (2,7%) plantas tetraploides. Estas plantas foram cruzadas com linhas diploides e geraram híbridos triploides ou sem semente. Entretanto, há necessidade de aumentar a frequência de linhas tetraploides para o desenvolvimento de novas linhagens com maior variabilidade sendo, portanto, necessário a realização de novas pesquisas.

Considerando que os genótipos respondem de forma diferenciada aos tratamentos com colchicina e diante da necessidade de obtenção de genótipos que, aliado a tetraploidia, apresentem resistência ao oídio, este trabalho teve como objetivo avaliar a indução de plantas poliploides artificiais de melancia, utilizando diferentes concentrações de colchicina, em dois tempos de exposição e com ausência e presença de escarificação mecânica em sementes, bem como diferentes métodos de aplicação.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e em casa de vegetação de Recursos Genéticos Vegetais e Melhoramento de Plantas da Embrapa Semiárido Petrolina-PE. Foram realizados três experimentos:

### 2.2.1 Indução de poliploidia em melancia cv. Crimson Sweet (Experimento 1)

Nesse experimento, utilizou-se a melancia diploide cultivar Crimson Sweet no intuito de selecionar a melhor concentração, tempo de exposição e avaliar o efeito da escarificação das sementes na indução de plantas poliploides. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x2x2 (três concentrações de colchicina: 0,0%, 0,1% e 0,2%; dois tempos de exposição ao antimitótico: 24 e 48 horas; e escarificação mecânica: ausência e presença), totalizando 12 tratamentos, com 20 repetições e a unidade experimental constituída, por uma semente.

Para as sementes que receberam o tratamento de escarificação, utilizou-se uma lixa de gramatura 150, para abertura de um pequeno orifício na região superior do tegumento (local oposto ao de emissão da radícula). Em seguida, todas as sementes foram submetidas às diferentes concentrações de colchicina, por 24 e 48 horas, onde permaneceram no escuro, a temperatura ambiente.

Após os tratamentos, as sementes foram lavadas por três vezes consecutivas e colocadas para germinar em recipientes plásticos (0,5 L) perfurados na base inferior, contendo substrato comercial para hortaliças. Quando as plântulas apresentaram os cotilédones expandidos, coletaram-se as extremidades das raízes principais e secundárias para a contagem de cromossomos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até 35 dias após a semeadura (início da floração), ocasião em que foi realizada a análise morfológica das plantas.

### 2.2.2 Indução de poliploidia em sementes da Linhagem Diploide com Resistência ao Oídio (LDRO) da Embrapa Semiárido (Experimento 2)

Utilizou-se a linhagem de melancia diploide com resistência ao oídio, desenvolvida pela Embrapa Semiárido ES 17.31620.001 (LDRO), no intuito de obter plantas com elevada frequência de células tetraploides em genótipo resistente ao oídio (*Podospaera xanthii*) e com menor tamanho de frutos desenvolvidos no programa de melhoramento da Embrapa

Semiárido. Nesse experimento, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x2 (três concentrações de colchicina: 0,0%, 0,1% e 0,2%; e dois tempos de exposição ao antimitótico: 24 e 48 horas), totalizando seis tratamentos, com 14 repetições e a unidade experimental constituído por uma semente.

### 2.2.3 Indução de poliploidia em sementes e plântulas de linhagem de melancia da Embrapa Semiárido (Experimento 3).

Neste experimento, sementes e plântulas da linhagem LDRO foram submetidas a 0,2% de colchicina, dose essa utilizada em função de ensaios preliminar. Foram utilizados de cinco métodos de aplicação do produto adaptados de Medina (1958) e Noh et al. (2012), descritos logo a seguir. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 tratamentos, 10 repetições e a unidade experimental composta por uma planta. Os tratamentos consistiram de diferentes métodos de aplicação de colchicina onde: T1 = 0,0% de colchicina na semente, T2 = 0,0% de colchicina na semente escarificada, T3 = 0,2% de colchicina na semente, T4 = 0,2% de colchicina na semente escarificada, T5 = 0,2% de colchicina em semente com emissão da radícula, T6 = 0,2% de colchicina em plântulas no ponto de inserção entre o hipocótilo e a raiz, T7 = 0,2% de colchicina no ápice da plântula, T8 = 0,2% de colchicina por imersão de toda parte aérea da plântula. Apenas os tratamentos realizados na semente, receberam escarificação.

Após os tratamentos, as mudas de melancia permaneceram em casa de vegetação para realização das avaliações.

#### 2.2.3.1 Descrição dos métodos utilizados para aplicação da colchicina

##### 2.2.3.1.1 Método de aplicação direto na semente - MDS

Esse método envolveu os tratamentos T1, T2 (controle), os quais foram imersos em água destilada e os T3 e T4, onde das 80 sementes da linhagem LDRO utilizadas, 40 foram escarificadas e outras 40 não foram escarificadas. Posteriormente, as sementes que seriam submetidas à indução de poliploidia foram colocadas em solução de colchicina a 0,2% por 48 horas, em temperatura ambiente no escuro, enquanto que, as sementes do tratamento controle permaneceram em água destilada pelo mesmo período e condição ambiental. Após o tempo estabelecido, as sementes foram lavadas por três vezes consecutivas e postas para germinar em recipientes plásticos com capacidade de 500 mL, perfurados, contendo substrato comercial para hortaliças.



#### 2.2.3.1.2 Método de aplicação em sementes com emissão da radícula- MER

Nesse método, sementes da linhagem 'LDRO' foram postas para germinar em placas de Petri, forradas com duas folhas de papel umedecido, em BOD a 30 °C e ao iniciarem a emissão da radícula, foram colocadas na solução de colchicina a 0,2% por até 6 horas. Após o tempo estabelecido, as mesmas foram lavadas por três vezes consecutivas e postas em recipientes plásticos com capacidade de 500 mL, perfurado, contendo, substrato comercial para hortaliças.

#### 2.2.3.1.3 Método de aplicação no ponto de inserção entre o hipocótilo e a raiz - MIHR

Dez plântulas de melancia linhagem 'LDRO' com cotilédones expandidos, foram tratadas com solução de colchicina a 0,2%. Três gotas consecutivas foram aplicadas no ponto entre o hipocotilo e a raiz. Em seguida, as plântulas foram transferidas para potes de vidro, contendo algodão e papel de filtro umedecidos com água destilada e autoclavada, que foram vedados com folhas de alumínio e plástico filme. Posteriormente, foram incubadas a 30 °C por 15 horas no escuro. Após o tempo estabelecido, as plântulas foram lavadas por três vezes consecutivas e postas em recipientes plásticos com capacidade de 500 mL perfurados, contendo substrato comercial para hortaliças.

#### 2.2.3.1.4 Método de aplicação no ápice da plântula - MAP

Dez sementes de melancia linhagem 'LDRO' foram postas para germinar em recipientes plásticos com capacidade de 500 mL, perfurado, contendo, substrato para hortaliças. Quando as plântulas apresentavam cotilédones totalmente expandidos, foram aplicados três gotas da solução de colchicina a 0,2% no ponto de crescimento de cada plântula (ápice) de melancia. Aplicou-se a primeira gota, nove horas depois a segunda e 15 horas após aplicou-se a terceira gota. Em seguida, 30 minutos após a última aplicação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação.

#### 2.2.3.1.5 Método de aplicação no hipocótilo invertido - MHI

Dez sementes de melancia linhagem 'LDRO' foram postas para germinar em recipientes plásticos com capacidade de 500 mL, perfurado, contendo, substrato para hortaliças. Quando as plântulas apresentavam cotilédones totalmente expandidos, as plantas tiveram sua parte aérea imersas em solução de colchicina a 0,2% por duas vezes consecutivas. Em seguida, as mesmas foram colocadas em potes de vidro com algodão e papel filtro

umedecidos com água destilada e autoclavada, seguido da vedação do recipiente com folhas de alumínio e plástico filme. Posteriormente, as mudas foram incubadas a 30 °C por 15 horas no escuro. Após o tempo estabelecido, as plântulas foram lavadas por três vezes consecutivas.

#### 2.2.4 Emergência das sementes de melancia cv. Crimson Sweet e Linhagem LDRO

Para todos os Experimentos (1, 2 e 3), a avaliação da emergência, foi realizada a partir do quinto dia após a semeadura, finalizando-se ao 10º dia. Consideraram-se como plântulas emergidas aquelas que apresentaram todas as estruturas de desenvolvimento de uma plântula (hipocótilo e cotilédones). Contou-se o número de plântulas emergidas todos os dias pela manhã. Os dados foram expressos em porcentagem de plantas emergidas.

#### 2.2.5 Avaliação do nível de ploidia em melancia

##### 2.2.5.1 Contagem do número de cloroplastos e estômatos

O número de cloroplastos e estômatos foi determinado na linhagem LDRO, no segundo e terceiro experimentos. A contagem de cloroplastos foi feita nas duas células-guarda de cada estômato, tanto nos cotilédones (experimentos 2 e 3), quanto na segunda folha definitiva (experimento 3). A análise consistiu na retirada, com o auxílio de uma pinça, da cutícula presente na epiderme inferior da folha, pois é o local na planta de melancia, onde se concentram a maior parte dos estômatos. Posteriormente, a cutícula foi colocada em uma lâmina com uma gota de água destilada, coberta com lamínula e observada ao microscópio óptico Leica. Para a contagem do número de estômatos, adotou-se a objetiva de 20x. A contagem do número de cloroplastos foi feita aleatoriamente nas células-guardas de dez estômatos, e com a média, classificou-se preliminarmente, as plantas como: diploides (< 16), tetraploides (16-20) e diferentes níveis de ploidias (>20) (COMPTON et al., 1996; MCCRUITION; ELMSTROM, 1996; SOUZA et al., 2001 e NOH et al., 2012). Também foram determinados, os diâmetros equatoriais e polares dos estômatos, com auxílio do programa DinoCapture 2.0 na objetiva de 40x e expressos em µm.

##### 2.2.5.2 Análise morfológica

Aos 35 dias após o plantio, as plantas de melancia das cultivares Crimson Sweet e LDRO foram submetidas às avaliações morfológicas. Foram determinados: a altura da parte aérea e o comprimento da raiz com auxílio de uma régua; diâmetro do hipocótilo no ponto de inserção da raiz com paquímetro; e a matéria fresca e seca, tanto da parte aérea como da raiz.

Nesta avaliação, as plântulas foram separadas em parte aérea e raiz, onde esta última foi lavada em água corrente para retirada do excesso do substrato e enxugadas com papel toalha. Em seguida, as partes foram pesadas para determinar a massa fresca e colocadas em sacos de papel para secagem em estufa a 60 °C até atingir o peso constante ( $\pm 3$  dias). Em seguida, fez-se a pesagem do material seco em uma balança de precisão.

Adicionalmente, no experimento 3, devido a natureza dos métodos de aplicação da colchicina, foram realizadas as seguintes avaliações: diâmetro do ponto de inserção acima do cotilédone, número de folhas definitivas e comprimento e largura da segunda folha definitiva.

### 2.2.5.3 Análise citogenética (mitótica)

No experimento 1, o nível de ploidia das plantas controle e aquelas submetidas ao tratamento com colchicina a 0,2%, foi identificado pela contagem do número cromossômico. Para tanto, após a emergência das plântulas e com os cotilédones expandidos, fez-se a coleta de pontas de raízes das plântulas para análise citogenética (mitótica). Para os Experimentos 2 e 3, após o décimo segundo dia de aplicação dos diferentes tratamentos, as pontas das raízes foram coletadas para análise citogenética (mitótica).

As pontas das raízes coletadas imediatamente foram pré-tratadas com a solução de 8-Hidroxiqiloneína (8-HQ) a 0,002 M durante 24 horas, a aproximadamente a 8 °C. Em seguida, foram fixadas na solução de Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v). A fixação foi mantida em temperatura ambiente por 2 a 24 horas, em seguida estocadas a -20 °C até a sua utilização. As lâminas foram preparadas após lavagem em água destilada por 5 minutos e hidrolisadas em HCl 5N por 25 minutos (mitose). Em seguida foram esmagadas em ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula, secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e montadas em meio com Entellan (GUERRA; SOUZA, 2002). As melhores células foram capturadas com câmera Leica FX-350, usando software Leica QFish. acoplado a um microscópio de epifluorescência Leica DM2000. Fez-se a contagem do número cromossômico em cinco células em metáfase nítidas e com cromossomos bem espalhados. Para identificação do número cromossômico, foi preparada uma lâmina e examinadas cinco metáfases por indivíduo.

### 2.2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade das variâncias de Bartlett a 5% de significância. Aqueles em que se verificou

distribuição normal e homogeneidade das variâncias foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para aqueles que não atenderam as pressuposições para a ANAVA, fez-se a estatística não-paramétrica, aplicando-se o teste Kruskal-Wallis a 5% de significância e para as comparações múltiplas utilizou-se o pacote Dunn.test (DINNO, 2017). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R versão 3.3.2 (R CORE TEAM, 2016).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Avaliação da emergência das sementes

Na Tabela 1, encontra-se a porcentagem de emergência das sementes de melancia cv. Crimson Sweet em função do tratamento com colchicina em diferentes concentrações e tempos de exposição. Houve diferença significativa na emergência das sementes em função da aplicação de colchicina nas concentrações de 0,1% e 0,2% com redução de 10% e 8,8% respectivamente. Não foi observada diferença significativa para o fator tempo de exposição das sementes à colchicina (24 e 48 horas) e para o fator escarificação das sementes.

**Tabela 1.** Emergência de sementes de melancia cultivar Crimson Sweet em função do tratamento com colchicina em diferentes concentrações, tempos de exposição e escarificação mecânica (Experimento 1)

<b>Colchicina (%)</b>	<b>Emergência(%)</b>
<b>0,0</b>	100,0 a*
<b>0,1</b>	90,0 b
<b>0,2</b>	91,2 b
<b>Tempo (horas)</b>	
<b>24</b>	92,5 a
<b>48</b>	95,0 a
<b>Escarificação</b>	
<b>CE**</b>	92,5 a
<b>SE</b>	95,0 a

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de significância \*\*CE=Com escarificação, SE=Sem escarificação.

No Experimento 2, ao submeter as sementes da linhagem LDRO às diferentes concentrações e tempo de exposição a colchicina, constatou-se que não houve interação significativa entre os fatores, nem para os fatores isolados (Tabela 2). O mesmo foi observado

no experimento 3, quando as sementes de LDRO foram tratadas com colchicina e com ausência e presença de escarificação (Tabela 3).

Medina (1958) ao induzir a tetraploidia em melancia cv. Keckley Sweet Lesburg também verificou redução na germinação das sementes, variando de 52% a 78%. A redução na emergência das sementes após o tratamento com colchicina, observada no presente trabalho em ‘Crimson Sweet’, pode ser devido ao efeito tóxico do alcaloide, que, em tecidos meristemáticos mais sensíveis, pode causar injúrias químicas, em diminuição da emergência (SOUZA et al., 2001). Além disso, a colchicina interfere no metabolismo da planta (DERMEN, 1940), o que pode resultar em uma emergência mais lenta.

**Tabela 2.** Emergência de sementes da linhagem LDRO da Embrapa Semiárido, submetidas às diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição (Experimento 2)

Colchicina (%)	Emergência (%)		
	24 h	48 h	Média*
0,0	87,5	81,3	84,4 a
0,1	87,5	75,0	81,2 a
0,2	66,7	72,9	69,8 a
<b>Média</b>	<b>80,5 A</b>	<b>76,4 A</b>	

\*Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem pelo teste Tukey a 5% de significância.

**Tabela 3.** Emergência de sementes da linhagem LDRO da Embrapa Semiárido, submetidas aos diferentes métodos de aplicação de colchicina a 0,2% (Experimento 3)

Colchicina (%)	Emergência (%)
0,0	100,0 a*
0,2	92,5 a
Escarificação	
CE**	97,5 a
SE	95,0 a

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste Dunn a 5% de significância. \*\*CE=Com escarificação, SE=Sem escarificação.

### 2.3.2 Avaliação de cloroplastos e estômatos

#### 2.3.2.1 Avaliação do número de cloroplastos e estômatos

No experimento 2, para o número de cloroplastos e de estômatos nos cotilédones, não houve interação significativa entre os fatores concentração e tempo de exposição a colchicina (Tabela 4). Entretanto, as concentrações de colchicina utilizadas afetou significativamente o número de cloroplastos nos cotilédones. Nota-se, na Tabela 4, que houve um aumento do número de cloroplastos de 24,4% e 48,2% para as concentrações de colchicina de 0,1% e 0,2%, respectivamente. É importante considerar que, o número de cloroplastos em plantas diploides (Figura 1A), tetraploides (Figura 1B) e mixoploides podem variar em função do genótipo. Jaskani et al. (2007) encontraram em diferentes linhas de melancia, número de cloroplastos variando de 5 a 7 por par de células guardas em diplóides e de 10 a 12 para tetraploides. E Koh (2002) encontraram em melancia ‘Moodeungson’ número de cloroplastos por estômatos variando de 12 (diploides) a 22,8 (tetraploides) e, em alguns casos, variou de abaixo de 8 ou de 13-15, sendo esses considerados como mixoploides, confirmados pela citometria de fluxo.

**Tabela 4.** Número de cloroplastos e estômatos nos cotilédones em plântulas de melancia da linhagem LDRO, submetidas a diferentes concentrações e tempo de exposição a colchicina (Experimento 2)

Colchicina (%)	**Número de cloroplastos nos cotilédones			*Número de estômatos nos cotilédones		
	Tempo de exposição (horas)			Tempo de exposição (horas)		
	24	48	Média	24	48	Média
0,0	11,7	11,9	11,8 b	42,6	42,9	42,7 a
0,1	13,9	15,5	14,7 a	42,8	35,5	38,9 a
0,2	15,3	19,8	17,5 a	41,2	36,9	39,0 a
<b>Média</b>	13,5 A	15,7 A		42,2 A	38,4 A	
<b>CV (%)</b>	-			21,6		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem pelo teste de \*Tukey e \*\*Dunn a 5% de significância.



**Figura 1.** Estômatos foliares de plantas de melancia da linhagem LDRO, diploide (A), tetraploide (B) e com deformação (C). Barras representam= 10  $\mu$ m

No experimento 3, a análise nos cotilédones e na segunda folha definitiva, revelou que houve efeito significativo entre os métodos de aplicação da colchicina no número de cloroplastos e de estômatos (Tabela 5). A aplicação de 0,2% de colchicina em sementes com emissão da radícula proporcionou aumento de 105,5% no número de cloroplastos. No método de aplicação de 0,2% de colchicina diretamente na semente com ou sem escarificação, houve um incremento no número de cloroplastos de 79,7% e 69,4%, respectivamente, sendo aqueles que mais se aproximaram dos valores, que classificam plantas como tetraploides, ou seja, entre 16 e 20 cloroplastos/células guardas.

Na folha definitiva, os tratamentos que apresentaram um maior número de cloroplastos, foram aqueles com aplicação de colchicina 0,2% na semente (SE e CE), no hipocótilo invertido e em sementes com emissão da radícula (Tabela 5). Este último foi o que mais se aproximou do número de cloroplastos, que contem nas células guardas de plantas tetraploides (16,0 a 20,0) (Figura 2B). A contagem do número de cloroplastos é um indicador simples e eficiente durante a fase inicial de triagem para duplicação cromossômica. Entretanto, este não deve ser utilizado isoladamente, deve ser acompanhado de outros métodos mais eficiente para determinação do nível de ploidia, como a citogenética e a citometria de fluxo (JASKANI et al., 2005).

**Tabela 5.** Número de cloroplastos em células guardas e estômatos em plântulas de melancia da linhagem LDRO submetidas aos diferentes métodos de tratamento para indução de poliploidia (Experimento 3)

Métodos	**Número de cloroplastos em células guardas		*Número de estômatos	
	Cotilédones	*2º Folha definitiva	Cotilédones	2º Folha definitiva
<b>0,0 MDS SE</b>	12,7 de	10,0 cd	42,4 ab	21,6 ab
<b>0,0 MDS CE</b>	12,4 e	9,6 d	42,6 ab	24,6 ab
<b>0,2% MDS SE</b>	21,5 b	14,4 ab	23,2 d	33,1 a
<b>0,2% MDS CE</b>	22,3 b	15,4 a	19,8 d	23,9 ab
<b>0,2% MER</b>	26,1 ab	16,6 a	26,6 cd	28,8 ab
<b>0,2% MIHR</b>	13,7 cd	10,6 cd	51,8 a	31,0 ab
<b>0,2% MAP</b>	13,0 cde	12,5 bc	42,1 ab	16,5 b
<b>0,2% MHI</b>	14,9 c	16,2 a	37,9 bc	31,2 ab
<b>CV (%)</b>	-	13,5	22,3	35,7

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de \*Tukey e \*\*Dunn a 5% de significância. MDS SE = método de aplicação direto na semente sem escarificação, MDS CE = método de aplicação direto na semente com escarificação, MER = método de aplicação em sementes com emissão da radícula; MIRH = método de aplicação no ponto de inserção entre o hipocótilo e a raiz, MAP = método de aplicação no ápice da plântula e MHI = método de aplicação por imersão da parte aérea ou hipocótilo invertido.

A análise dos cloroplastos permite uma redução no número de amostras, a serem avaliadas em análises mais laboriosas e demoradas como a citogenética. Sua realização nos cotilédones pode antecipar a identificação de possíveis plantas tetraploides, resultando em menor tempo que essas mudas permanecem em bandejas, além de menor área a ser ocupada em campo. Entretanto, a quantidade de cloroplastos existentes nas células guardas de cotilédones e de folha definitiva, pode ser semelhante ou diferente, a depender do genótipo. No presente trabalho, o número de cloroplastos nas células guardas da folha definitiva diminuiu em quase todos os tratamentos avaliados, enquanto que as células guardas dos cotilédones apresentaram mais cloroplastos, principalmente naqueles em que as sementes foram imersas em solução de colchicina a 0,2% (6 e 48 horas). Nesses tratamentos, também foram observados alteração na estrutura dos estômatos (deformação) (Figura 2C). Este fato pode ter ocorrido devido à presença permanente da colchicina durante a fase inicial de germinação, potencializando o efeito do reagente e conseqüentemente, causando toxicidade.

A contagem do número de cloroplastos por estômato foliar tem sido utilizada para identificar plantas tetraploides em melancia (McCUITION; ELMSTROM, 1993; COMPTON et al., 1996; SOUZA et al., 2001 e NOH et al., 2012), por ser uma técnica simples e rápida para obtenção dos resultados. Compton et al. (1996), por exemplo, relatam que através da contagem do número de cloroplastos, obtiveram plantas tetraploides a partir da



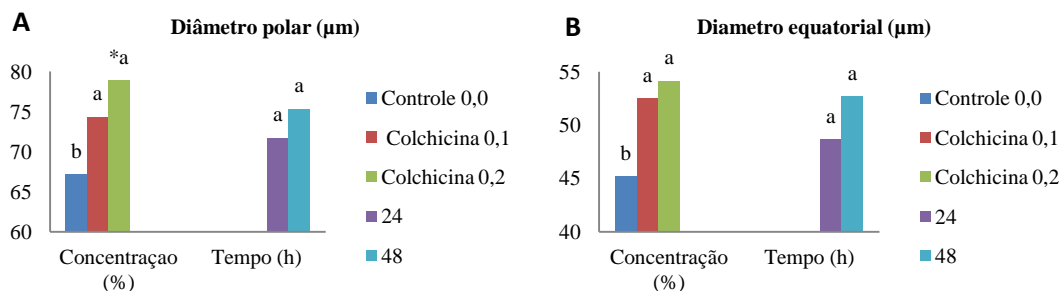
cultura de tecidos, as quais foram cruzadas com polinizadores diploides, gerando assim, híbridos triploides. Souza et al. (2001) também obtiveram híbridos triploides de melancia, identificando-os pela contagem do número de cloroplastos e análise morfológica. Entretanto, Noh et al. (2012), trabalhando com diferentes métodos na obtenção de plantas tetraploides em cinco cultivares de melancia, compararam a análise de contagem do número de cloroplastos em estômatos foliares com a análise de citometria de fluxo, os quais identificaram em 649 plantas, 28,7% e 10,9% de plantas tetraploides, respectivamente. Com estes resultados, observaram que a porcentagem de obtenção de plantas tetraploides utilizando a contagem de número de cloroplastos, foi reduzida, quando se fez a citometria de fluxo, sendo confirmadas 25,2%. Os autores relatam ainda que a avaliação isolada pela contagem do número de cloroplastos apresenta a desvantagem na identificação de mixoploides e de altas ploidias, o que poderá acarretar erro na detecção de plantas tetraploides devido a sobreposição e discrepâncias nos resultados, sugerindo que a avaliação deve ser realizada em conjunto com outras técnicas para uma melhor confirmação e precisão dos resultados.

Quanto ao número de estômatos, observou-se variação tanto nos cotilédones e como na folha definitiva (Tabela 5). Entretanto, nos cotilédones, houve diminuição no número de estômatos quando a colchicina foi aplicada na semente com emissão da radícula e em sementes com e sem escarificação, destacando-se estes últimos com reduções de 53,6% e 45,3%, respectivamente. Na folha definitiva, o número de estômatos das plantas tratadas com colchicina foi semelhante aos das plantas controle (Tabela 5). A densidade estomática é um indicativo de poliploidização, uma vez que, estes geralmente, exibem uma densidade mais baixa do que as diploides (HODGSON et al., 2010). Porém, esta é uma característica que pode ser influenciada pelo ambiente, e pode estar sujeita a subjetividade no momento da análise individual (SOUZA; QUEIROZ, 2004). Além disso, no presente trabalho, a constatação de resposta semelhante para o número de cloroplastos e de estômatos nos cotilédones, entre as plantas diploides (controle) e poliploides, nos tratamentos cuja colchicina foi aplicada em plântulas (MIHR, MAP e MHI), pode ser devido à colchicina atuar de forma mais eficiente, em tecidos em processo de divisão celular (WAN et al., 1989). Nesse caso, os cotilédones já formados translocam substâncias de reservas para os pontos de crescimento das plantas jovens (RAVEN et al., 1996), como exemplo, o meristema apical. Desse modo, provavelmente a colchicina que permaneceu nos cotilédones não foi suficiente para provocar alterações no número de estômatos e de cloroplastos. Tais alterações foram observados nos cotilédones dos tratamentos cuja forma de aplicação da colchicina foi na semente (MDS e

MER), onde os cotilédones estavam ainda em processo de divisão celular, sendo esta provavelmente a forma mais eficiente para induzir a poliploidia. Enquanto que, a aplicação pelo método de gotas na inserção entre o hipocótilo e a raiz, pode não ter funcionado devido à reduzida quantidade de células em processo de divisão, nesse local. Além do pouco tempo de contato do produto com o tecido.

### 2.3.2.2 Avaliação do diâmetro polar e equatorial dos estômatos

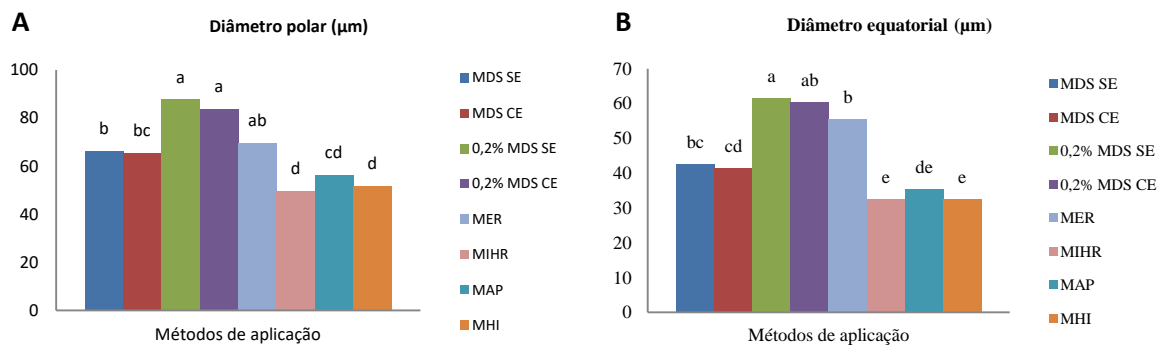
No Experimento 2, houve aumento significativo nos diâmetros polar e equatorial para os estômatos presente nos cotilédones das plantas de LDRO tratadas com colchicina em diferentes concentrações (Figuras 2A e 2B). O tratamento com 0,2% de colchicina aumentou o diâmetro polar e equatorial dos estômatos em, aproximadamente, 19,7% e 20,0%, respectivamente. Enquanto que, os diâmetros dos estômatos não foram influenciados pelo tempo de exposição ao alcaloide (Figuras 2A e 2B).



**Figura 2.** Diâmetros polar (µm) (A) e equatorial de estômatos (µm) (B), de plantas de melancia submetidas ao tratamento com colchicina em diferentes concentrações e dois tempos de exposição (cotilédones). Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de \*Dunn a 5% de significância (Experimento 2).

Do mesmo modo no Experimento 3, os diâmetros polares e equatoriais dos estômatos foram significativamente influenciados pelo método de tratamento com colchicina (Figuras 3A e 3B). Percebe-se que houve o aumento de ambos os diâmetros estomáticos (polar e equatorial), nos tratamentos em que se utilizou a colchicina a 0,2% com e sem escarificação, bem como no tratamento de emissão da radícula (0,2% por 6 horas). Essa variação não foi percebida nos tratamentos de aplicação no ápice da plântula, no hipocótilo invertido e no ponto de inserção entre hipocótilo e raiz (Figuras 3A e 3B). Nota-se que os tratamentos que apresentaram alteração nos diâmetros estomáticos, foram aqueles submetidos à aplicação da colchicina diretamente na semente. Provavelmente, por apresentarem uma grande quantidade de células indiferenciadas (meristemáticas), estes tenham sido mais afetados pela ação da

colchicina. Esses aumentos nos diâmetros dos estômatos observados no presente trabalho podem estar diretamente relacionados com o aumento no nível de ploidia, pois, alguns autores relatam que o tamanho dos estômatos provavelmente está relacionado com o tamanho do genoma (HODGSON et al., 2010), e, conseqüentemente, considerado como um bom indicativo de indução de poliploidização (TOMÉ et al., 2016).



**Figura 3.** Diâmetro polar (A) e equatorial de estômatos (B), de plantas de melancia que foram submetidas a diferentes métodos de aplicação de colchicina a 0,2% da linhagem LDRO (cotilédones). Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Dunn a 5% de significância (Experimento 3).

### 2.3.3 Análise morfológica das plantas

No Experimento 1, como não houve homogeneidade e nem distribuição normal dos dados de massa fresca da parte aérea e da raiz, massa seca da raiz e altura de plantas aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis. Enquanto que, para a variável massa seca da parte aérea, comprimento da raiz, e diâmetro do hipocótilo, aplicou-se a análise de variância (ANAVA).

Constatou-se que, para a cultivar Crimson Sweet, houve diferença significativa entre as concentrações de colchicina para todas as características morfológicas analisadas (Tabela 6). A concentração de colchicina de 0,2% proporcionou redução na massa fresca da parte aérea (21,7%), na massa fresca (48,0%) e seca da raiz (40,0%) e, na altura das plântulas (25,0%). Na concentração de 0,1% de colchicina, foi observada alteração apenas na massa fresca da raiz e na altura das plantas, com redução de 11,8% e 8,5%, respectivamente. Quanto ao tempo de exposição à colchicina, menor massa seca da raiz e altura das plantas foi observada no tempo de 48 horas, sendo inferiores as plantas que ficaram por 24 horas em 27,3% e 6,7%, respectivamente. A massa fresca da parte aérea e da raiz não foram influenciados pelo tempo de exposição à colchicina. No método de escarificação mecânica (CE) também se constatou que as plântulas apresentaram menor massa fresca da parte aérea (10,6%) e da raiz (18,6%) e, altura de planta (8,1%), em relação àquelas que não foram

escarificadas. Provavelmente o método CE favoreceu a entrada de colchicina e maior contato com os tecidos em crescimento, resultando em redução nos parâmetros de crescimento seja pela redução no processo de divisão celular ou pelo efeito fitotóxico da colchicina.

**Tabela 6.** Análise morfológica de plântulas de melancia cultivar Crimson Sweet submetidas a diferentes concentrações de colchicina, em dois tempos de exposição e escarificação mecânica (Experimento 1)

<b>Colchicina (%)</b>	<b>MFPA (mg)</b>	<b>MFR (mg)</b>	<b>MSR (mg)</b>	<b>AP (cm)</b>
<b>0,0</b>	3,55 a*	2,54 a	0,10a	18,78 a
<b>0,1</b>	3,70 a	2,24 b	0,11a	17,18 b
<b>0,2</b>	2,78 b	1,31 c	0,06b	14,09 c
<b>Tempo (horas)</b>				
<b>24</b>	3,49 a	2,16 a	0,11a	17,42 a
<b>48</b>	3,24 a	1,98 a	0,08b	16,26 b
<b>Escarificação</b>				
<b>CE**</b>	3,19 b	1,88 b	0,09a	16,14 b
<b>SE</b>	3,53 a	2,23 a	0,09a	17,45 a

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de significância. MFPA = massa fresca da parte aérea, MFR = massa fresca da raiz, MSR = massa seca da raiz, AP = altura de plântulas. \*\* CE= com escarificação, SE=sem escarificação

Ainda no Experimento 1, houve interação significativa entre os fatores concentração e tempo de exposição a colchicina, concentração de colchicina e escarificação mecânica da semente e, tempo de exposição e escarificação mecânica, para as variáveis massa seca da parte aérea, comprimento da raiz e diâmetro do hipocótilo. Observou-se que para todos os fatores estudados, a concentração a 0,2% proporcionou diminuição dos valores referentes à matéria seca da parte aérea, comprimento da raiz e do diâmetro do hipocótilo (Tabela 7). Houve redução da massa seca da parte aérea e do comprimento da raiz, com o tratamento das sementes de ‘Crimson Sweet’ com 0,2% de colchicina, independente do tempo de exposição, sendo mais expressivo com 48 horas (51,4% e 41,4%, respectivamente) e sob escarificação mecânica (51,4% e 48,3%, respectivamente). A concentração de 0,1% de colchicina por 48 horas também promoveu redução da massa seca da parte aérea (25,7%) e da raiz (18,3%) (Tabela 7). O diâmetro do hipocótilo das plântulas de melancia ‘Crimson Sweet’ aumentaram significativamente com a aplicação de colchicina por 24 horas e sem escarificação mecânica,

tanto na concentração de 0,1% (21,7%) quanto na concentração de 0,2% (17,3%) de colchicina (Tabela 7). O tratamento de colchicina nas sementes por 48 horas não influenciou o diâmetro do hipocótilo das plântulas.

**Tabela 7.** Análise morfológica de plântulas de melancia cultivar Crimson Sweet submetidas a diferentes concentrações de colchicina, em dois tempos de exposição e escarificação mecânica (Experimento 1)

Colchicina (%)	Massa seca da parte aérea (mg)				Comprimento da raiz (cm)				Diâmetro do hipocótilo (mm)			
	Tempo (horas)		Escarificação		Tempo (horas)		Escarificação		Tempo (horas)		Tempo (horas)	
	24	48	CE	SE	24	48	CE	SE	24	SE	CE	SE
<b>0,0</b>	0,35aA *	0,35 aA	0,35 aA	0,35 aA	46,62 aA	35,93 aB	41,27 aA	41,27 aA	3,69 aA	3,69bA	3,80 aA	3,80 aA
<b>0,1</b>	0,35 aA	0,23 bB	0,26 bB	0,31 aA	46,44 aA	29,34 bB	34,58 bB	40,36 aA	3,99 aB	4,49 aA	3,68 aA	3,81 aA
<b>0,2</b>	0,21 bA	0,17 cB	0,17cB	0,21 bA	27,31 bA	24,89 bA	21,33 cB	29,98 bA	3,65 aB	4,33 aA	3,87 aA	3,66 aA

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

Em relação ao nível de ploidia, nas plantas de ‘Crimson Sweet’ tratadas com colchicina em diferentes concentrações, com exceção do diâmetro do hipocótilo, houve diferença significativa entre os níveis de ploidia para as características MFPA, MFR, MSPA, MSR, APA e CR, permitindo a distinção para os caracteres morfológicos de plântulas (Tabela 8). Constatou-se que, as plantas tetraploides, em relação às diploides apresentaram diminuição da massa fresca (27,7%) e seca da raiz (41,0%), da massa seca da parte aérea (25,8%), da altura da planta (14,4%) e do comprimento radicular (27,9%). Observou-se também que, para estes mesmos caracteres, as plântulas com células tetraploides não se diferenciaram das mixoploides. Sendo, portanto, difícil a sua identificação e diferenciação a nível morfológico de plântula através destes caracteres (Tabela 8). Pelo diâmetro do hipocótilo (DH), não foi possível a discriminação dos grupos de ploidia.

Os menores valores de massa fresca e massa seca, tanto para raiz quanto para a parte aérea, bem como, para a altura e comprimento do sistema radicular, observados para a cultivar ‘Crimson Sweet’ no presente trabalho, pode estar relacionado com a maior porcentagem de plantas poliploides. Pois, embora, a indução de poliploidia favoreça o aumento no crescimento de plantas, no tamanho da folha, das hastes, dos estômatos e dos órgãos florais (SUMARJI; SUPARNO, 2017), nesse tipo de planta, o desenvolvimento inicial é mais lento, provavelmente devido à redução na velocidade de germinação das sementes provocado pela colchicina.

**Tabela 8.** Avaliação de caracteres morfológicos em plântulas de melancia cv. Crimson Sweet obtidas pela indução de poliploidia com colchicina em diferentes concentrações, tempos de exposição e escarificação (Experimento 1)

Caracteres	Diploide	Tetraploide	Mixoploide	CV%
MFPA	3,55 a*	3,12 ab	2,68 b	25,67
MFR	2,31 a	1,67 b	1,22 b	40,74
MSPA	0,31 a	0,23 b	0,19 b	31,49
MSR	0,10 a	0,06 b	0,06 b	47,07
APA	17,74 a	15,18 b	13,87 b	17,74
CR	38,76 a	27,96 b	25,87 b	34,81
DH	3,84 a	3,91 a	3,99 a	14,97

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. MFPA = massa fresca da parte aérea, MFR = massa fresca da raiz, MSPA = massa seca da parte aérea, MSR = massa seca da raiz, APA = altura de plântula, CR = Comprimento da raiz e, DH = diâmetro do hipocótilo.

Para a linhagem LDRO no Experimento 2, houve interação significativa entre os fatores concentrações de colchicina e tempo de exposição, apenas para a massa seca da parte aérea. As

demais variáveis foram ou não influenciadas por esses fatores isoladamente. A massa seca da parte aérea das plântulas tratadas com 0,1% de colchicina por 24 horas foram 27,5% superior àquelas que permaneceram por até 48 horas em contato com o alcaloide (Tabela 9). Do mesmo modo, as plântulas tratadas com 0,1% de colchicina exibiram massa fresca da raiz 45% superior as diploides.

O tratamento com colchicina aumentou a massa seca da raiz, tanto na concentração de 0,1% (198,2%) quanto na concentração de 0,2% (105,3%) de colchicina. Esta última concentração, também influenciou o diâmetro das plântulas que aumentaram em 12,7%. Por outro lado, a altura das plantas não foi influenciada por nenhum fator. Souza e Queiroz (2004) também encontraram aumento nas características morfológicas de plantas tetraploides, confirmado, posteriormente, pela obtenção de frutos triploides.

No Experimento 2, a divergência dos resultados, observado no experimento com ‘Crimson Sweet’, pode estar relacionada ao fato de que, a resposta das plantas à colchicina é variável em função de diversos fatores, dentre eles o genótipo (NOH et al., 2012). Mas é importante considerar, que a colchicina utilizada, no presente experimento, embora da mesma marca daquela utilizada para ‘Crimson Sweet’, pertencem a lotes diferentes, o que pode ter potencializado o efeito da colchicina, devido a alguma alteração na fórmula de fabricação.

**Tabela 9.** Análise morfológica de plantas da linhagem LDRO submetidas ao tratamento com colchicina em diferentes concentrações e tempos de exposição (Experimento 2)

	**MFR	**MSR	*APA	*DH	**MFPA	*MSPA	
Colchicina (%)						Tempo (horas)	
						24	48
0,0	7,1 b	0,6 c	59,0 a	4,8 b	20,4 a	2,8 aA	2,7 aA
0,1	12,9 a	1,7 a	58,9 a	4,9 b	20,5 a	3,2 aA	2,5 aB
0,2	10,0 b	1,2 b	62,2 a	5,4 a	21,0 a	2,5 aA	3,1 aA
Tempo (horas)							
24	7,3 b	0,6 b	63,6 a	4,8 b	20,7 a		
48	13,1 a	1,6 a	56,6 a	5,2 a	20,6 a		
CV (%)	-	-	27,5	9,99	-	23,4	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de \*Tukey e \*\*Dunn a 5% de significância. MFR = massa fresca da raiz, MSR = massa seca da raiz, APA = altura de plântula, DH = diâmetro do hipocótilo, MFPA = massa fresca da parte aérea, MSPA = massa seca da parte aérea.



No experimento 3, ao submeter a linhagem de melancia LDRO a diferentes métodos de aplicação da colchicina 0,2%, constatou-se diferença significativa para altura de plantas, diâmetro do hipocótilo, número de folha definitiva e largura da folha definitiva (Tabela 10). Entretanto, o diâmetro do epicótilo e o comprimento da folha definitiva não foram influenciados pela colchicina, independentemente do método de aplicação. Para a altura de plântula, verificou-se que, todas as plantas tiveram seu desenvolvimento afetado negativamente pela colchicina, independentemente do método de aplicação. Destacando-se com menor altura, as plantas onde a colchicina foi aplicada via semente com emissão da radícula por seis horas e pelo método do hipocótilo invertido, sendo inferiores as plantas não tratadas em 53,6 % e 51,6%, respectivamente.

Quanto ao diâmetro do hipocótilo das plântulas, todos os métodos, apresentaram-se semelhante ao das plantas não tratadas com colchicina. Houve redução no número de folhas definitivas das plantas tratadas com colchicina pelo método direto na semente, com e sem escarificação e, para o método do hipocótilo invertido e método com emissão da radícula. A colchicina interfere não só na divisão celular, mas no metabolismo da planta (DERMEN, 1940), e, como já mencionada anteriormente, afeta a velocidade de germinação e o desenvolvimento inicial das mudas, o que pode resultar em redução de algumas características de crescimento, como constatado no presente trabalho.

Embora tenham ocorrido variações nas características morfológicas das plantas submetidas à colchicina nos três experimentos, é uma avaliação de extrema importância quando se induz poliploidia. Isso também é considerado por Souza e Queiroz (2004), que afirmaram que a análise morfológica por possibilitar a distinção entre indivíduos poliploides e diploides, permite uma considerável redução do número de plantas submetidas à análise citogenética ou aos testes de progênie, reduzindo custos e acelerando o processo de seleção.

**Tabela 10.** Análise morfológica de plântulas de melancia da linhagem LDRO submetidas aos diferentes métodos de aplicação de colchicina para indução de tetraploidia (Experimento 3)

<b>Métodos</b>	<b>Altura da plântula (cm)</b>	<b>**Diâmetro do hipocótilo (mm)</b>	<b>**Diâmetro do epicótilo (mm)</b>	<b>**NF D</b>	<b>**CFD (cm)</b>	<b>**LFD (cm)</b>
<b>0,0 MDS SE</b>	23,9 a	2,3 b	3,2 a	4,5 a	3,5 a	3,6 c
<b>0,0 MDS CE</b>	23,7 a	2,4 ab	3,2 a	4,1 ab	3,7 a	4,1 bc
<b>0,2% MDS SE</b>	14,3 bc	2,8 a	3,2 a	2,7 d	4,3 a	4,5 ab
<b>0,2% MDS CE</b>	14,5 bc	2,7 a	3,5 a	2,8 cd	4,4 a	4,9 a
<b>0,2% MER</b>	11,0 c	2,4 b	2,9 a	3,6 bc	3,4 a	3,8 c
<b>0,2% MIHR</b>	15,9 b	2,3 bc	3,6 a	4,0 ab	4,1 a	4,3 ab
<b>0,2% MAP</b>	18,2 b	2,6 ab	3,4 a	4,5 a	3,7 a	3,9 bc
<b>0,2% MHI</b>	11,5 c	2,2 bc	3,4 a	2,8 cd	2,9 a	3,2 c
<b>CV (%)</b>	16,2	-	-	-	-	-

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey e \*\*Dunn a 5% de significância. MDS SE = método de aplicação direto na semente sem escarificação, MDS CE = método de aplicação direto na semente com escarificação, MER = método de aplicação em sementes com emissão da radícula; MIRH = método de aplicação no ponto de inserção entre o hipocótilo e a raiz, MAP = método de aplicação no ápice da plântula e MHI = método de aplicação por imersão da parte aérea ou hipocótilo invertido.

#### 2.3.4 Análise citogenética (mitótica)

Em 'Crimson Sweet' (Experimento 1), verificou-se que as plantas tratadas com colchicina apresentaram células diploides, tetraploides e mixoploides (Tabela 11).

Constatou-se que, a maior frequência de plantas tetraploides foi observada em plantas provenientes de sementes tratadas com 0,2% de colchicina, seguido das sementes tratadas com 0,1% de colchicina por 48 horas e sem escarificação (Tabela 11). Também se obteve em 0,2% de colchicina, por 24 horas, independente da presença ou ausência da escarificação, plantas com células tetraploides, porém em frequência inferior. Dados aproximados de plantas de melancia tetraploides (2,7%), foram observados por Souza et al. (2001), analisando um conjunto de dados morfológicos de plantas, cujas sementes foram submetidas à colchicina a 0,2% por 24 horas.

No presente trabalho, a exposição das sementes a colchicina por 48 horas foi mais eficiente em induzir plantas tetraploides, provavelmente, devido ao fato de que, por a colchicina atuar em células em divisão e, na planta encontram-se células diferenciadas e indiferenciadas, um maior período de contato com o produto, pode dar o tempo necessário para que um número maior de células se diferencie, com o tecido ainda em contato com produto.

Observou-se também uma frequência elevada de plantas com células mixoploides em ambas as concentrações (0,1% e 0,2%) da solução de colchicina. O maior percentual destas foi verificado no tratamento a 0,2% por 48 horas, submetido à escarificação. Provavelmente, a escarificação mecânica, aliada à maior concentração e ao tempo de exposição, pode ter potencializado o efeito da colchicina e, assim, tenha induzido a uma maior formação de plantas com células mixoploides, com células diploides e tetraploides; diploides, tetraploides e com outras ploidias. Jaskani et al. (2005), avaliando a indução de plantas tetraploides em melancia com a aplicação de 0,2, 0,4 e 0,6% de solução de colchicina em plântulas, também obtiveram plantas mixoploides (34,0%), identificando-as pela análise de citometria de fluxo.

Vale ressaltar que, os resultados obtidos neste Experimento 1 são referentes à identificação do número cromossômico (análise mitótica) e Medina et al. (1958) relataram que a determinação de plantas tetraploides ( $2n=44$  cromossomos), nas raízes, nem sempre é uma indicação de que os cromossomos de todas as células da planta foram duplicados. Várias plantas podem ter apenas uma parte duplicada e, portanto, somente com o conjunto de dados relativos ao número cromossômico, tamanho de estômatos, de grãos de pólen, formato dos frutos, número e tamanho das sementes, pode-se concluir, com maior segurança, sobre o efeito parcial ou total do tratamento.

**Tabela 11.** Frequência das diferentes ploidias obtidas em sementes de melancia cv. Crimson Sweet submetidas à imersão em colchicina, em dois períodos de exposição, com e sem escarificação mecânica (Experimento 1)

Ploidia	Frequência (%)											
	24h						48h					
	0,0		0,1%		0,2%		0,0		0,1%		0,2%	
	*CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE
<b>2x</b>	100	100	87,5	80,0	35,3	46,7	100	100	86,7	84,6	23,0	17,7
<b>4x</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	6,6	0,0	0,0	0,0	15,4	7,7	29,4
<b>Mixoploide</b>	0,0	0,0	12,5	20,0	58,8	46,7	0,0	0,0	13,3	0,0	69,3	52,9

\*CE= com escarificação, SE= sem escarificação

Na linhagem LDRO (Experimento 2), através da contagem do número de cloroplastos, considerou-se nove plantas como sendo tetraploides (Tabela 12). Contudo, com a análise de contagem do número cromossômico, não foi possível confirmar estes resultados, sendo observado plantas com células diploides, tetraploides e mixoploides (Tabela 12).

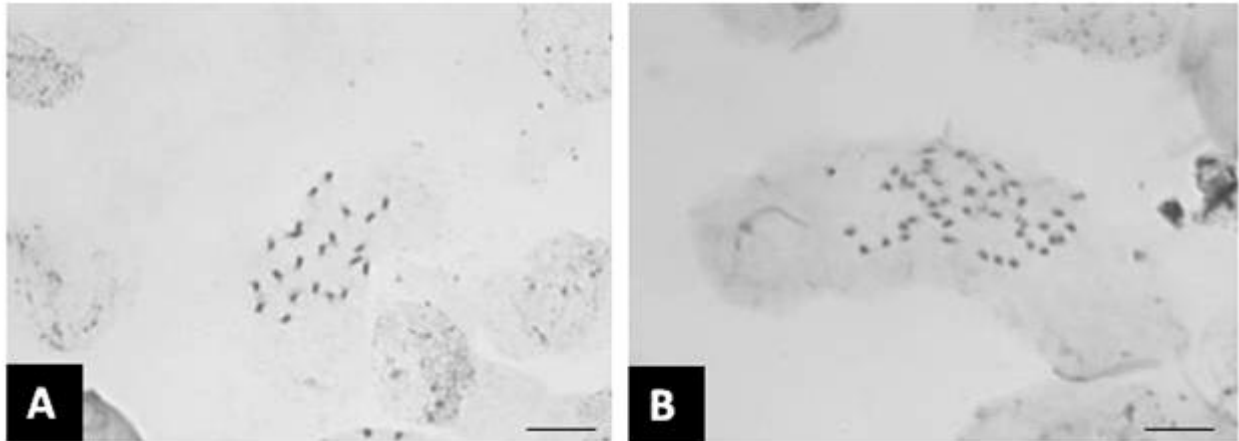
Embora, pela análise citogenética não tenha sido observado plantas 100% tetraploides, houve uma frequência de plantas com células tetraploides em 70% das plantas que foram tratadas com colchicina a 0,2% por 48 horas. É importante ressaltar que, a indução de poliploidia é fácil, mas obter plantas totalmente tetraploides é muito difícil. Isto se deve ao fato, de a colchicina atuar de forma eficiente somente sobre células que estão em divisão. Desse modo, a duplicação geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoploides. Em consequência, surge o problema relativo à reversão total ou parcial à condição diploide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido a proliferação das células diploides remanescentes, que se multiplicam a taxas superiores aquelas das células tetraploides (ROTH, 1984). Por isso tem-se variado bastante a forma de aplicação da colchicina buscando uma forma mais eficiente do tratamento.

Uma vez identificado em que parte da planta predominam as células tetraploides, por citometria de fluxo, pode-se utilizar técnicas para torna-las totalmente tetraploides, como, por exemplo, realizando ciclos sucessivos de seleção, ou polinização onde as flores masculinas e femininas sejam provenientes do mesmo ramo, ou ainda via enxertia.

Também é importante ressaltar que, a contagem do número cromossômico deve ser realizada em células que apresentem cromossomos bem espalhados e separados, sem sobreposições para que possam ser definidos e contados, evitando assim equívocos na obtenção dos resultados (Figuras 4A e 4B) (BAKRY et al., 2007).

**Tabela 12.** Número de plantas de melancia da linhagem LDRO com diferentes níveis de ploidia e frequência de plantas com células tetraploides após o tratamento com colchicina em diferentes concentrações e tempo de exposição (Experimento 2)

Colchicina (%)	Amostras	Numero de cloroplastos (cotilédones)				Análise citogenética (mitótica)				Frequência de plantas com células tetraploides
		2x	4x	>4x	4x(%)	2x	4x	>4x	4x(%)	%
<b>0,0 24h</b>	10	10	0	0	0	10	0	0	0	0
<b>0,1 24h</b>	10	10	0	0	0	1	0	9	0	30 (40 - 80)
<b>0,2 24h</b>	10	5	5	0	50	1	0	9	0	50 (20 - 80)
<b>0,0 48h</b>	10	10	0	0	0	10	0	0	0	0
<b>0,1 48h</b>	10	6	4	0	40	3	0	7	0	22 (20 - 60)
<b>0,2 48h</b>	10	3	4	3	40	2	0	8	0	70 (20 - 40)
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>44</b>	<b>9</b>	<b>3</b>		<b>27</b>	<b>0</b>	<b>33</b>		



**Figura 5.** Metáfase mitótica de plantas de melancia (*Citrullus lanatus*) da cv. Crimson Sweet, diploide (A) e tetraploide (B). Barras representam = 10 $\mu$ m

Ao submeter a linhagem LDRO a diferentes métodos de tratamento com colchicina 0,2% (Experimento 3), constatou-se pela contagem do número de cloroplastos nas folhas definitivas, que nos tratamentos a 0,2% MDS SE e CE, nos métodos de aplicação no hipocótilo invertido e sementes com emissão da radícula, um total de 11 plantas apresentaram valores médios de 16 a 20 cloroplastos por estômatos, sendo identificadas como tetraploides (Tabela 13). No entanto, pela contagem do número cromossômico, não se confirmou a indução de plantas com células tetraploides, portanto, foram identificadas plantas com células diploides ( $2n=22$ ) e com diferentes números cromossômicos (mixoploides) para a linhagem LDRO (Tabela 13). Embora, tenham apresentado características morfológicas alteradas pelo tratamento com colchicina a 0,2% nos diferentes métodos avaliados.

Vale ressaltar que Noh et al. (2012) avaliaram os mesmos métodos utilizados neste trabalho em cinco genótipos de melancia e identificaram plantas como tetraploides através da contagem do número de cloroplastos, as quais foram confirmadas pela citometria de fluxo. Os autores relataram que o melhor método de indução foi o de aplicação no hipocótilo invertido, com a obtenção de 29,5% de plantas tetraploides. Entretanto, observou-se que neste trabalho, pela contagem do número de cloroplastos em plantas submetidas ao tratamento no hipocótilo invertido, identificou-se seis plantas, as quais não se confirmou pela contagem do número cromossômico realizado em pontas de raízes (Tabela 13). Contudo, como a aplicação do tratamento foi realizada na parte aérea da plântula, sugere-se que a análise de citometria de fluxo para este caso, poderia confirmar ou descartar o nível de ploidia destas. Pois a eficiência do tratamento com colchicina para induzir tetraploidia varia em função de alguns fatores tais como, genótipo, método de aplicação e concentração. Portanto, são requisitos indispensáveis em qualquer programa de melhoramento genético para duplicação cromossômica: a escolha das cultivares a serem utilizadas; a variação na

concentração; tempo de exposição e formas de aplicação dos antimitóticos (RODRIGUES et al., 2011).

**Tabela 13.** Número de plantas de melancia da linhagem LDRO com diferentes níveis de ploidia e frequência de plantas com células tetraploides após o tratamento com colchicina em diferentes concentrações e tempo de exposição (Experimento 3)

Métodos	Amostras	Número de cloroplastos (FD)				Análise citogenética (mitótica)				Frequência de plantas com células tetraploides
		2x	4x	>4x	4x(%)	2x	4x	>4x	4x(%)	%
<b>0,0 MDS SE</b>	10	10	0	0	0	10	0	0	0	0
<b>0,0 MDS CE</b>	10	10	0	0	0	10	0	0	0	0
<b>0,2% MDS SE</b>	10	8	2	0	20	5	0	5	0	0
<b>0,2% MDS CE</b>	10	9	1	0	10	3	0	6	0	10 (25)
<b>0,2% MER</b>	10	3	2	0	0	2	0	2	0	0
<b>0,2% MIHR</b>	10	10	0	0	0	5	0	3	0	0
<b>0,2% MAP</b>	10	10	0	0	0	6	0	2	0	0
<b>0,2% MHI</b>	10	2	6	0	75	4	0	4	0	25 (40-50)
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>62</b>	<b>11</b>	<b>0</b>		<b>45</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	

MDS SE = método de aplicação direto na semente sem escarificação, MDS CE = método de aplicação direto na semente com escarificação, MER = método de aplicação em sementes com emissão da radícula; MIRH = método de aplicação no ponto de inserção entre o hipocótilo e a raiz, MAP = método de aplicação no ápice da plântula e MHI = método de aplicação por imersão da parte aérea ou hipocótilo invertido.

Essa variação em resposta à indução de poliploides observado no presente trabalho, também pode ser observada no trabalho descrito por Noh et al. (2012), que avaliaram cinco cultivares de melancia quanto à indução de tetraploidia por diferentes métodos de aplicação e obtiveram variação nas respostas entre os genótipos avaliados. Por exemplo, o método de aplicação direto na semente com a solução de colchicina a 0,2% permitiu através da contagem do número de cloroplastos e citometria de fluxo identificar plantas tetraploides somente em uma das cultivares estudadas. Já o método de aplicação da colchicina (0,2%) no hipocótilo, considerado pelos autores como o melhor método para indução de plantas tetraploides, apresentou bons resultados em quatro dos genótipos avaliados.

Diante disso, faz-se necessário a avaliação de diferentes metodologias de aplicação, nos diversos genótipos disponíveis que apresentem características de interesse para o programa de melhoramento genético da cultura. E, também associar os diferentes métodos para análise da ploidia. Pois como já mencionado, apenas um parâmetro não é seguro para predizer se uma planta é

ou não tetraploide. Assim, a tetraploidia pode não ocorrer de forma generalizada na planta; a amostra coletada na raiz para análise citogenética pode não ser representativa da real ploidia da planta como um todo e, desse modo, comete-se equívocos. É importante lembrar que, a confirmação se uma linha está homogênea para tetraploidia ou não, é a avaliação do resultado do cruzamento entre o possível tetraploide com o genitor diploide, que resultará em plantas triploides, que produzirão frutos sem sementes.

## CONCLUSÕES

Foi possível obter duplicação cromossômica em células de plantas da cultivar Crimson Sweet.

Na linhagem LDRO, a duplicação cromossômica ocorreu em algumas células das plantas.

A resposta de plantas de melancia à duplicação cromossômica pode variar de acordo com o genótipo.

A concentração de colchicina a 0,2% por 48 horas sem escarificação mecânica é eficiente para indução de duplicação cromossômica em melancia, entretanto, depende do genótipo.

A análise de contagem de número de cloroplastos é uma ferramenta eficiente para ajudar na identificação dos níveis de ploidia, de forma precoce, reduzindo o número de plantas que serão avaliadas em outros métodos de maior complexidade.

A análise citogenética é trabalhosa, contudo, permite identificar com maior precisão os diferentes níveis de ploidia.



## REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados. Dados e estatísticas do setor: Estatísticas das exportações de frutas no 1º Semestre de 2017 Disponível em [http://www.abrafrutas.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=258:estatisticas-das-exportacoes-de-frutas-no-1-semester-de-2017&catid=95&lang=pt-br&Itemid=259](http://www.abrafrutas.org/index.php?option=com_content&view=article&id=258:estatisticas-das-exportacoes-de-frutas-no-1-semester-de-2017&catid=95&lang=pt-br&Itemid=259): Acesso: 25 fevereiro 2018
- BAKRY, F. et al. In liquid medium colchicine treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, v. 62, n. 1, p. 3-12, 2007.
- COMPTON, M. E; GRAY, D. J; ELMSTROM, G. W. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured in vitro. **Euphytica** v.87, n. 3, p. 165-172, 1996.
- DERMEN, H. Colchicine polyploidy and technique. **Botanical Review**. v. 6, n. 11, p. 599-635, 1940.
- DINNO, A (2017). dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.4. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>
- GUERRA, M., SOUZAS, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: **Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto**, 2002.
- HODGSON, J. G. et al. Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog? **Annals of Botany**. v. 105, n. 4, p. 573-584, 2010
- JASKANI, M. J.; KWON S. W.; KIM, D. H. Flow cytometry of DNA content of colchicine treated with watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. **Pakistan Journal of Botany**. v.37, n. 3, p. 685-696, 2005.
- KIHARA, H. Triploid watermelon, **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.58, n. 1, p.217-230, 1951.
- KOH, G. C. Tetraploid production of Moodeungsan watermelon. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**., v. 43, n. 6, p. 671-676, 2002.
- LEVI, A. et al. USVL-360, Novel watermelon tetraploid germplasm line. **HortScience**. v. 49, n. 3, p. 354-357, March, 2014
- MEDINA, D. M.; PRADO, O. T. MENDES, A. J. T. A poliploidia artificial na obtenção de melancia sem semente. **Bragantia**, Campinas, v. 17, n. 5, p. 81-100, 1958.
- MCCUISTION, F. ELMSTROM, G. W. Identifying polyploids of various cucurbits by stomatal guard cell chloroplast number. Proc. Fla. State **Horticultural Society**. v.106, p. 155-157, 1993.
- NOH, J. et al. Screening Different Methods of Tetraploid Induction in Watermelon [*Citrullus lanatus* (thunb.) Manst. and Nakai] **Horticulture Environment Biotechnology**. v. 53, n.6, p.521-529, 2012.
- R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAVEN, Peter. H.; EVERT, Ray. F.; EICHHORN, Susan. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 172, 226.

RAZA, H. et al. *In vitro* induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content Int. **Journal Agriculture Biology**., v. 5, n. 3, p. 298-302, 2003.

RODRIGUES, F. A. et al. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 62, p. 13476-13481, 2011.

ROTH, P.S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla*** S.T. Blake. 1984. 78p. Dissertação (mestrado em Engenharia Florestal) – Escola superior de Agronomia “Luiz de Querioz”, Piracicaba. 1984.

SOUZA, F. F., QUEIRÓZ, M. A., DIAS, R. C. S. Melancia sem sementes. Desenvolvimento e avaliação de híbridos triploides experimentais de melancia. **Biociência** **10**(1): 1-10, 1999.

SOUZA, F.F., QUEIRÓZ, M. A., DIAS, R. C. S. Desenvolvimento de híbridos triploides experimentais de melancia. **Sitientibus. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA**, v. 1, n.2, p. 154-160, 2001.

SOUZA, F. de F.; QUEIRÓZ, M.A. de. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.22, n. 3, p.516-520, 2004.

SHEIKH, S. et al. Phenotypic markers for tetraploid watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] following parental exposure to colchicine in T<sub>0</sub> generation. **Horticulture Environment Biotechnology**. v.54, n.6, p. 524-530, 2013.

SUMARJI; SUPARNO The Effectiveness of Colchisin Giving on Watermelon Ploidization (*Citrullus vulgaris* Schard) **International Journal of Applied Environmental Sciences** ISSN 0973-6077 v. 12, n. 11, p. 1951-1967, 2017.

TOMÉ, L. G. et al. Colchicine and oryzalin effects on tetraploid induction and leaf anatomy of *Solanum commersonni* ssp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 11, p. 1973-1979, 2016.

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOL M, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 6, p. 889-892, 1989.

**CAPÍTULO 3 – INDUÇÃO DE GAMETAS NÃO REDUZIDOS EM BOTÕES FLORAIS  
MASCULINOS DE PLANTAS DE MELANCIA**

## RESUMO

A indução de gametas não reduzidos possibilita a formação de novas combinações genéticas, bem como a produção de plantas poliploides. O objetivo deste trabalho foi analisar a microsporogênese e avaliar o uso da colchicina para indução de grãos de pólen não reduzidos em botões florais masculinos de plantas de melancia (*Citrullus lanatus*) cultivar Crimson Sweet. Botões florais masculinos foram submetidos a aplicação de uma solução de colchicina a 0,5% durante os tempos de 24 h ou 48 h. Foram observados em 27 botões florais masculinos de diâmetro entre 1,5 e 2,0 mm, células mãe dos grãos de pólen, tétrades e micrósporos recém formados. Observou-se também que os diâmetros dos botões florais que apresentaram células mãe dos grãos de pólen eram muito próximos a 1,5 mm, tamanho limite utilizado para a indução de gametas não reduzidos. Botões florais tratados apresentaram grãos de pólen com formato elíptico com diâmetro médio de 57,44  $\mu\text{m}$ , enquanto os botões florais provenientes do tratamento controle apresentaram diâmetro médio de 47,31  $\mu\text{m}$ . Os maiores grãos de pólen produzidos (“gigantes”) apresentaram diâmetros entre 75 e 100  $\mu\text{m}$  (média de 87,5  $\mu\text{m}$ ), o que representa praticamente o dobro dos valores de um grão de pólen normal. A porcentagem de botões florais masculinos tratados com sucesso na geração de gametas não reduzidos foi de 16,07% para o tempo de duração de 24 h e de 10,25% para 48 h, os quais em trabalhos futuros poderão ser úteis em programas de melhoramento genético da cultura da melancia para obtenção de híbridos triploides ou melancia sem semente.

**Palavras-chave:** *Citrullus lanatus*. Microsporogênese. Pólen  $2n$  em melancia. Poliploidia em botões florais.

## ABSTRACT

Unreduced gamete induction allows forming new genetic combinations and producing polyploid plants. The aim of the current study is to analyze the microsporogenesis and to assess the use of colchicine in order to induce unreduced pollen grains in male floral buds of watermelon plants (*Citrullus lanatus*) of cultivar Crimson Sweet. Male floral buds were subjected to 0.5% colchicine solution for 24 or 48 hours. Pollen grain mother cells, tetrads and newly-formed microspores were observed in 27 male floral buds whose diameters ranged from 1.5 and 2.0 mm. The diameters of flower buds presenting pollen grain mother cells were very close to 1.5 mm, which is the size limit used to induce unreduced gametes. Treated flower buds presented elliptical pollen grains with mean diameter 57.44  $\mu\text{m}$ , whereas flower buds subjected to the control treatment presented mean diameter 47.31  $\mu\text{m}$ . The diameters of the largest pollen grains (“giant”) produced in the current study ranged from 75 to 100  $\mu\text{m}$  (mean 87.5  $\mu\text{m}$ ), which is almost twice the values recorded for regular pollen grains. The percentage of male floral buds successfully treated in the generation of unreduced gametes recorded 16.07% (24-h duration) and 10.25% (48-h duration). These male floral buds may be used in breeding programs to help generating triploid hybrids or seedless watermelons.

**Keywords:** *Citrullus lanatus*. Microsporogenesis.  $2n$  pollen in watermelon. Polyploidy in floral buds.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Poliploides são indivíduos que possuem mais de dois conjuntos de cromossomos por núcleo da célula, podendo apresentar maior vigor e, em alguns casos, superarem os seus parentais diploides em vários aspectos. Essas características do poliploide têm sido alvo de estudo de vários melhoristas de plantas, os quais induzem novos poliploides ou usam poliploides naturais para obter cultivares melhoradas, buscando níveis mais elevados de produtividade, melhor qualidade do produto e aumento da resistência para os estresses bióticos e abióticos (SATTLER et al., 2016). Nos sistemas naturais, os poliploides surgem geralmente através da produção de gametas que não tiveram o número cromossômico reduzido, e, portanto, são designados de gametas não reduzidos e surgem mais comumente através de irregularidades na meiose (BROWNFIELD; KOHLER, 2011 e YOUNIS et al., 2014). Por outro lado, a indução artificial de gametas não reduzidos através da duplicação total ou parcial do número de cromossomos é uma maneira efetiva de obter poliploides (YANG et al., 2016). Neste sistema, diferentes abordagens são empregados para produção de pólen  $2n$ , incluindo a hibridação interespecífica, manipulação do meio ambiente, ou pelo tratamento com substâncias inibitórias da formação de feixe acromático como o óxido nitroso, trifluralin, colchicina e orizalina. Esses produtos químicos podem estimular a produção de grãos de pólen  $2n$  viáveis (WANG et al., 2012; YOUNIS et al., 2014 e YANG et al., 2016). A identificação dos gametas não reduzidos geralmente é realizada mais na meiose masculina do que na feminina, e, frequentemente, realizada pela correlação nas medidas de tamanho dos grãos de pólen, ou pela presença de díades e tríades ao final da meiose II (SCHIFINO-WITTMANN; DALL' AGNOL, 2001). Contudo, o completo entendimento do modo de ação, concentração ótima de substâncias indutoras, e os estádios de desenvolvimento ainda são pouco conhecidos (YOUNIS et al., 2014).

A indução eficiente de gametas não reduzidos em diferentes culturas e suas consequências genéticas poderá abrir novos caminhos para o melhoramento de plantas, uma vez que as plantas produzidas por esta técnica são de qualidade superior e podem apresentar tolerância contra estresses bióticos e abióticos (YOUNIS et al., 2014). Dewitte et al. (2010), por exemplo, trabalharam com o uso de trifluralin a 10, 100 e 1000  $\mu\text{M}$  e o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) em forma de gás sobre pressão para tratar botões florais masculinos de *Begônia* com o objetivo de induzir a formação de pólen  $2n$ . Nesse caso, foi observado um aumento no tamanho do grão de pólen para ambos os tratamentos, fato que está relacionado principalmente ao aumento do conteúdo de DNA. Em eucalipto (*Eucalyptus urophylla*), foi relatado que o uso de colchicina a 0,5% por 6 horas em botões florais masculinos resultou na geração de 28,71% de grãos de pólen  $2n$  (YANG et al., 2016). Da mesma forma, botões florais masculinos de mandioca (*Manihot esculenta*) tratados com colchicina a 0,3%

e dimetil sulfoxido (DMSO) a 1% resultaram na indução de 10,79% de gametas não reduzidos (LAI et al., 2015).

Em programas de melhoramento genético da cultura da melancia (*Citrullus lanatus*), utiliza-se tradicionalmente o sistema artificial de duplicação cromossômica na mitose, com o intuito de se obter linhagens tetraploides ( $2n=4x=44$ ) que quando cruzadas com uma linhagem diploide ( $2n=22$ ) obtém-se um indivíduo triploide ( $2n=3x=33$ ) que originará frutos de melancia sem semente, (KIHARA, 1951; MEDINA et al., 1958; SOUZA et al., 2001; RAZA et al., 2003 e NOH et al., 2012). A utilização de gametas não reduzidos para obtenção de plantas poliploides pode ser uma alternativa para os métodos de duplicação de cromossomos mitóticos usados em diferentes programas de melhoramento, permitindo a geração de novos genótipos poliploides (YOUNIS et al., 2014), além de apresentar mais potencial de diversidade genética e heterose (CONSIGLIO et al., 2004).

A ocorrência de poliploides sexuais espontâneos ou artificiais na cultura da melancia ainda não foram encontrados ou relatados na literatura. Portanto, o desenvolvimento de uma metodologia para indução de gametas não reduzidos em plantas de melancia, poderá contribuir com novas perspectivas na obtenção de materiais tetraploides ou provenientes do cruzamento direto de uma planta com gametas não reduzidos (poliploide) com outra de pólen reduzido (normal) (diploide), o qual poderá gerar um material triploide ou sem semente. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso da colchicina como agente para indução de grãos de pólen não reduzidos em botões florais de plantas de melancia (*Citrullus lanatus*) cultivar Crimson Sweet.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Material vegetal**

O experimento foi realizado com a cultivar diploide ( $2n=22$ ) Crimson Sweet de melancia, sob condições de casa de vegetação na Embrapa Semiárido. Sementes foram colocadas para germinar em recipientes plásticos (0,5 L de capacidade) perfurados na base inferior, contendo substrato comercial para hortaliças. Após a emissão da primeira folha definitiva, as plântulas foram transferidas para vasos de 2 L até a finalização do experimento.

### **3.2.2 Microsporogênese**

Foi realizado, uma avaliação dos botões florais masculinos das plantas com aproximadamente 35 dias de cultivo, buscando avaliar as fases de desenvolvimento dos botões florais e identificar aqueles que estivessem em pré-meiose. Para isso, botões florais masculinos de

diferentes diâmetros (entre 1,5 e 6,0 mm) foram coletados, fixados em solução de Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v), mantidos em temperatura ambiente por 2-24 horas, sendo, posteriormente, estocados a -20 °C até a sua utilização. Para as análises da microsporogênese, lâminas foram preparadas após lavagem dos botões em água destilada por 5 minutos e hidrolisadas em HCl 5N por 5 minutos. Em seguida, as anteras foram isoladas, esmagadas entre lâmina e lamínula em ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula, secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e montadas em meio Entellan (GUERRA; SOUZA, 2002). As melhores células foram capturadas com câmera Leica FX-350, usando software Leica QFish. acoplado a um microscópio de epifluorescência Leica DM2000. Para identificação das fases de desenvolvimento do botão floral foram preparadas duas lâminas e examinadas cinco células por indivíduo.

### 3.2.3 Indução de gametas não reduzidos

Botões florais com diâmetros entre 1,5 e 6,0 mm de trinta e três plantas no mesmo estágio de desenvolvimento foram tratados com solução de colchicina a 0,5% por 24 horas ou 48 horas. A aplicação da colchicina foi realizada mediante o envolvimento dos botões florais com chumaços de algodões umedecidos com a solução do antimitótico. Para manter a umidade do chumaço de algodão durante o tempo estabelecido do tratamento, todos os botões florais contendo a solução de colchicina foram também cobertos com folhas de papel alumínio. Após o tempo de exposição estabelecido, os chumaços de algodão juntamente com as folhas de papel alumínio foram retirados. Em seguida, os botões florais foram lavados com água destilada para retirada do resíduo da solução de colchicina. Cerca de 240 botões florais masculinos foram tratados e coletados na pré-antese para análise citológica, como descrito por Vieira et al. (2012). Botões florais não tratados serviram de grupo controle, os quais foram cobertos com chumaços de algodão umedecidos com água destilada e posteriormente, cobertos com folhas de alumínio.

O diâmetro dos grãos de pólen foi medido com auxílio do programa Dino Capture 2.0. Nesse caso, quando pelo menos 1% dos grãos de pólen provenientes de botões florais tratados com colchicina apresentava tamanho médio significativamente maior (grãos de pólen “gigantes”) que aqueles oriundos de botões florais não tratados, o tratamento foi considerado como sendo bem sucedido (DEWITTE et al., 2010). Os tratamentos e a metodologia de aplicação adotados foram adaptados de Lai et al. (2015) e Yang et al. (2016).

### 3.2.4 Análise estatística



O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (2x2), duas concentrações de colchicina (0,0% e 0,5%) e dois tempos de exposição (24 e 48 horas), totalizando quatro tratamentos e 8 repetições.

Foi avaliado o diâmetro transversal em 50 grãos de pólen de cada botão floral coletado e os dados foram expressos em  $\mu\text{m}$ .

Para avaliação das diferenças entre a duração do tratamento, a produção eficiente de grãos pólen de tamanho aumentado, incluindo a proporção de botões florais com pelo menos 1% de grãos de pólen com diâmetros de maior tamanho ou “gigantes”, utilizou-se a análise de variância ANAVA, como descrito por Yang et al. (2016). Aplicou-se o teste de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk e de homogeneidade das variâncias de Bartlett a 5% de significância. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico R versão 3.3.2 (R CORE TEAM 2016).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em plantas de melancia da cultivar Crimson Sweet, o florescimento ocorre aos 35 dias de cultivo a partir do terceiro nó da planta, onde cada nó dá origem a flores. Em geral, as flores masculinas localizam-se separadamente das femininas na mesma planta. Durante a floração, as flores abrem entre 1 e 2 horas após o aparecimento do sol, e se fecham no mesmo dia à tarde, para não mais abrirem, tendo ou não ocorrido a polinização (DIAS; RESENDE, 2010). Nas plantas de melancia da cultivar Crimson Sweet foram encontrados botões florais masculinos no ápice do ramo com tamanhos variando de 1,5 a 4,0 mm de diâmetro (Figura 1 A). A partir do primeiro nó em diante, observou-se um aumento de forma crescente dos diâmetros dos botões florais, os quais variaram de 4,01 mm até 6,0 mm (Figura 1 B).

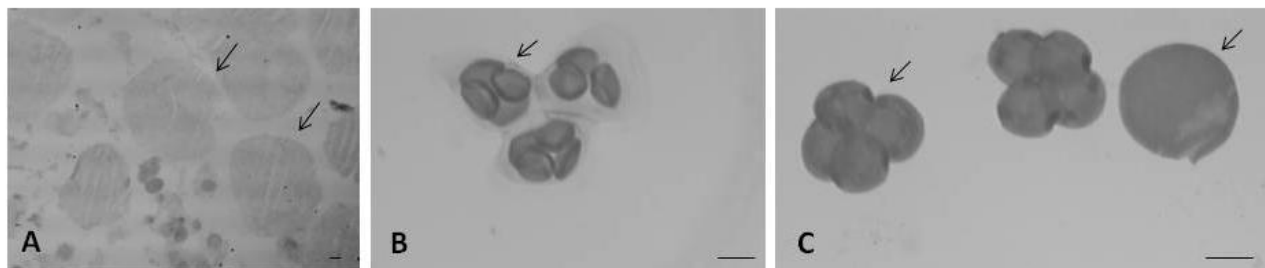


**Figura 1.** Morfologia do ápice caulinar (A) e morfologia dos botões florais masculinos (B) em plantas de melancia cultivar Crimson Sweet com diferentes diâmetros: 1= 2,01-2,5 mm; 2= 2,5-3,0 mm; 3= 3,01-3,5 mm; 4= 3,51-4,0 mm; 5= 4,01-4,50 mm; 6= 4,51-5,0 mm; 7= 5,5-6,0 mm

### 3.3.1 Avaliação da microsporogênese

Foi possível observar em 27 botões florais masculinos de diâmetro entre 1,5 e 2,0 mm, células mãe dos grãos de pólen, tétrades e micrósporos recém-formados (Figuras 2A, 2B e 2C). Observou-se também que o diâmetro dos botões florais que apresentaram células mãe dos grãos de pólen eram muito próximo a 1,5 mm, enquanto o diâmetro daqueles em que observaram tétrades e micrósporos estavam mais próximos a 2,0 mm de diâmetro. Esses dados mostram que a meiose nessa espécie ocorre de maneira muito rápida, sendo difícil determinar o exato momento de sua ocorrência em relação ao pequeno intervalo de tamanho dos botões florais avaliados (ou seja, entre 1,5 e 2,0 mm). Entretanto, foi possível concluir que a indução de gametas não reduzidos (tratamento com colchicina) deveria ser realizada em botões florais com diâmetro  $\leq 1,5$  mm, pois os mesmos ainda não iniciaram o processo de meiose.

O conhecimento dos estádios de desenvolvimento da microsporogênese são fundamentais para o sucesso na obtenção de gametas não reduzidos. Em mandioca, por exemplo, Lai et al. (2015), induziram a formação de gametas  $2n$  em micrósporos no estágio de desenvolvimento entre a prófase I e a metáfase I, produzindo 10,79% de gametas não reduzidos. Em eucalipto, Yang et al. (2016) também verificaram que o tratamento nos estádios de diplóteno para diacinese e metáfase I para telófase eram os mais adequados para duplicação do número cromossômico.



**Figura 2.** Relação entre o tamanho do botão floral e o desenvolvimento dos estádios da microsporogênese em plantas de melancia da cultivar Crimson Sweet. Célula mãe de grãos de pólen em botão floral masculino com 1,5 mm de diâmetro (A), tétrades em botão floral masculino com 2,0 mm de diâmetro (B) e tétrades e micrósporos recém-formados em botões florais masculino com 2,0 a 2,5 mm (C). Barras representam = 10  $\mu$ m.

### 3.3.2 Avaliação da indução de gametas não reduzidos

Foram analisados 134 botões florais masculinos tratados com colchicina a 0,5%, sendo 56 para o tempo de exposição de 24 horas e 78 para o de 48 horas. Mediu-se um total de 6.700 grãos de pólen para determinar o tamanho do diâmetro dos mesmos. No grupo controle (botões florais não tratados), avaliou-se um total de 36 botões florais, sendo medidos 1.800 grãos de pólen (Tabela 1). Embora alguns botões florais não tenham sobrevivido ao tratamento por causa do efeito tóxico da

colchicina, a maior porcentagem de sucesso na indução de gametas não reduzidos foi obtida no tratamento com colchicina a 0,5% por 24 horas (16,07%), quando comparado ao tratamento por 48h (10,25%) (Tabela 1).

O tratamento com colchicina a 0,5% em botões florais em plantas de melancia da cultivar Crimson Sweet resultou em grãos de pólen elípticos com diâmetro médio de 57,44  $\mu\text{m}$ , enquanto os botões florais provenientes dos tratamento controle apresentaram diâmetro médio de 47,31  $\mu\text{m}$  (Figura 3A; Tabela 2). Esse valor representa um aumento médio de 21,41% no tamanho dos diâmetros dos grãos de pólen tratados. Se forem isolados os dados apenas dos maiores grãos de pólen reduzidos (grãos de pólen “gigantes”) observa-se que os diâmetros variaram aproximadamente entre 75 e 100  $\mu\text{m}$  (média de 87,5  $\mu\text{m}$ ), o que representa praticamente o dobro dos valores de um grão de pólen normal (Figuras 3B e 3C). Os valores obtidos neste trabalho, assemelham-se aos obtidos por Medina et al. (1958), que trabalharam com a indução de tetraploidia em sementes de melancia, e avaliaram os diâmetros médios dos grãos de pólen produzidos em plantas tetraploides e diploides. Esses autores observaram uma variação no diâmetro dos grãos de pólen de plantas tetraploides entre 71,47 e 100,49  $\mu\text{m}$ , e para as plantas diploides entre 60,01 e 81,38  $\mu\text{m}$ , representando um aumento médio de aproximadamente 22%. Portanto, comparando os valores encontrados neste trabalho, confirma-se que houve aumento no tamanho do diâmetro dos grãos de pólen tratados com colchicina. Esse aumento pode estar relacionado ao aumento do conteúdo de DNA ou do nível de ploidia, conforme demonstrado anteriormente para outras espécies (DEWITTE et al., 2010; YOUNIS et al., 2014).



**Figura 3.** Determinação do efeito do tratamento com uso de colchicina a 0,5% em botões florais de melancia da cultivar Crimson Sweet para indução de gametas não reduzidos. Grãos de pólen normais (não tratado) (A); Grãos de pólen não reduzidos (“gigantes”) com  $\approx 75 \mu\text{m}$  de diâmetro (seta), notar presença de grãos de pólen menores e não corados (inviáveis) (B); Grãos de pólen não reduzidos (“gigantes”) com  $\approx 100 \mu\text{m}$  de diâmetro (seta) (C). Barras representam = 10 $\mu\text{m}$

**Tabela 1.** Efeito do tratamento com colchicina a 0,5% na formação de gametas não reduzidos em botões florais masculinos de melancia cultivar Crimson Sweet (*Citrullus lanatus*).

Tempo de exposição (h)	Botões florais tratados	Numero de Botões florais analisados	Nº de botões florais tratados com sucesso*	Porcentagem de botões florais tratados com sucesso (%)
24	98	56	9	16,07
48	139	78	8	10,25

\*Quando pelo menos 1% dos grãos de pólen provenientes de botões florais tratados com colchicina apresentavam tamanho médio maior (grãos de pólen “gigantes”) que aqueles oriundos de botões florais não tratados.

Na análise de variância (ANAVA) verificou-se diferença significativa entre os diâmetros médios dos grãos de pólen normais (controle) e dos grãos de pólen tratados (Tabela 2). Isto demonstra que o tratamento com a colchicina a 0,5% por 24 h e 48 h induziu ao aumento do tamanho do grão de pólen, conforme já relatado para outras espécies como, begônia, mandioca e eucalipto (DEWITTE et al., 2010; LAI et al., 2015 e YANG et al., 2016). Entretanto, não se observou diferença significativa para o fator duração do tratamento e nem interação entre estes e as concentrações de colchicina (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito do tratamento com colchicina na formação de gametas não reduzidos em botões florais masculinos e diâmetro de 1,5 a 6,0 mm de plantas de melancia cv. Crimson Sweet (*Citrullus lanatus*).

Colchicina (%)	Diâmetro médio dos grãos de polens (µm)
0,0	*47,31 b
0,5	57,44 a
Duração do tratamento (horas)	
24	56,26 a
48	56,22 a
CV(%)	9,93

\*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Embora sejam preliminares, os resultados permitem inferir que o diâmetro adequado para a indução de gametas não reduzidos está em torno de 1,5 mm, uma vez que correspondem com a fase de início da divisão meiótica. Vale ressaltar que, para um estudo posterior, faz-se necessário a determinação exata da fase meiótica bem como a correlação desta com o diâmetro do botão floral, para se determinar efetivamente o diâmetro adequado para a produção de pólen 2n.

O tratamento com colchicina a 0,5% por 24 e 48 horas em botões florais masculinos de plantas de melancia na cultivar Crimson Sweet foi eficiente para produção de grãos de pólen com diâmetro aumentado (gametas não reduzidos), os quais em trabalhos futuros poderão ser úteis em programas de melhoramento genético da cultura da melancia para obtenção de híbridos triploides ou para produção de melancia sem semente.

## CONCLUSÕES

O diâmetro do botão floral masculino adequado para a indução de gametas não reduzidos da cultivar de melancia Crimson Sweet está em torno de 1,5 mm.

O tratamento com colchicina a 0,5% por 24 horas ou 48 horas em botões florais masculinos da cultivar de melancia Crimson Sweet foi eficiente para aumentar o tamanho dos grãos de pólen.

## REFERÊNCIAS

- BROWNFIELD, L.; KOHLER, C. Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 5, p. 1659-1668, 2011.
- CONSIGLIO, F. et al. Exploitation of genes affecting meiotic non-reduction and nuclear restitution: Arabidopsis as a model? **Sexual Plant Reproduction** v. 17, n. 2, p. 97–105, 2004.
- DEWITTE, A. et al. Induction of 2n pollen formation in Begonia by trifluralin and N<sub>2</sub>O treatments. **Euphytica** v.171, n. 2, p. 283-293, 2010.
- DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. Socioeconomia In: DIAS, R. de C. S.; RESENDE, G. M. (Ed.). **Sistema de produção de melancia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 10 dezembro 2017.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: **Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto**, 2002.
- KIHARA, H. Triploid watermelon, **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.58, n. 1, p.217-230, 1951.
- LAI, H. et al. Induction of female 2n gametes and creation of tetraploids through sexual hybridization in cassava (*Manihot esculenta*). **Euphytica** v.201, n. 2, p. 265-273, 2015.
- MEDINA, D. M.; PRADO, O. T. MENDES, A. J. T. A poliploidia artificial na obtenção de melancia sem semente. **Bragantia**, Campinas, v. 17, n. 5, p. 81-100, 1958.
- NOH, J. et al. Screening different methods of tetraploid induction in watermelon [*Citrullus lanatus* (thunb.) Manst. and Nakai] **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. v.53, n.6, p.521-529, 2012.
- R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAZA, H. et al. *In vitro* induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content Int. **Journal Agriculture Biology**, v. 5, n. 3, p. 298-302, 2003.
- SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta** v. 243, n.2, p.281-296, 2016.
- SCHIFINO WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.9, n. 1-2, p. 155-164, 2003.
- SOUZA, F.F., QUEIRÓZ, M. A., DIAS, R. C. S. Desenvolvimento de híbridos triplóides experimentais de melancia. **Sitientibus. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA**, v. 1, n.2, p. 154-160, 2001.
- VIEIRA, L. J. et al. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica** v.26, n. 2, p. 350-356, 2012.

WANG, J. LI, DAI-LI. KANG, X.Y. Induction of unreduced megaspores with high temperature during megasporogenesis in *Populus*. **Annals of forest science** v.69, n. 1, p. 59-67, 2012.

YANG, J. et al. Induction of 2n pollen with colchicine during microsporogenesis in *Eucalyptus*. **Euphytica** v.210, n. 1, p. 69-78, 2016.

YOUNIS, A.; HWANG, Y.; LIM, K.; Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. **Plant Cell Reports** v.33, n. 2 p. 215-223, 2014.



## CONCLUSÃO GERAL

Foi possível estimar a viabilidade polínica com carmim acético a 2%, bem como observar diferenças quanto ao tamanho dos grãos de pólen das linhagens avaliadas.

O regulador de crescimento 2,4-D foi eficiente para induzir a formação de calos nas anteras das duas linhagens avaliadas.

A combinação de 2,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D com BAP não aumenta a frequência de indução de calos nas anteras das linhagens estudadas.

As respostas das anteras ao pré-tratamento com temperatura a 4 °C e uso dos reguladores 2,4-D (2,0  $\mu\text{M}$ ) com BAP dependem das linhagens estudadas.

Foi possível obter duplicação cromossômica em células de plantas da cultivar Crimson Sweet.

Na linhagem LDRO, a duplicação cromossômica ocorreu em algumas células das plantas.

A resposta de plantas de melancia à duplicação cromossômica pode variar de acordo com o genótipo.

A concentração de colchicina a 0,2% por 48 horas sem escarificação mecânica é eficiente para indução de duplicação cromossômica em melancia, entretanto, depende do genótipo.

A análise de contagem de número de cloroplastos é uma ferramenta eficiente para ajudar na identificação dos níveis de ploidia, de forma precoce, reduzindo o número de plantas que serão avaliadas em outros métodos de maior complexidade.

A análise citogenética é trabalhosa, contudo, permite identificar com maior precisão os diferentes níveis de ploidia.

O diâmetro do botão floral masculino adequado para a indução de gametas não reduzidos da cultivar de melancia Crimson Sweet está em torno de 1,5 mm.

O tratamento com colchicina a 0,5% por 24 horas ou 48 horas em botões florais masculinos da cultivar de melancia Crimson Sweet foi eficiente para aumentar o tamanho dos grãos de pólen.

