**CULTURA DE TECIDOS EM MELÃO AMARELO (*Cucumis melo* L. var.
inodorus Naudin): ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA**

LILIANE CRISTINA LIBORIO STIPP

Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Fitotecnia

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto – 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Stipp, Lilliane Cristina Liborio.

Cultura de tecidos em melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* var. Naudin)
: organogênese *in vitro* e embriogênese somática / Lilliane Cristina Liborio Stipp. - -
Piracicaba, 2000.

63 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Cultura de tecido 2. Embriogênese somática 3. Melão amarelo 4. Organogênese
I. Título

CDD 635.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

ERRATA

Onde se lê:

O melão divide-se botanicamente em sete variedades, das quais três têm importância econômica (Dusi, 1992). As três principais variedades de melão são: *Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudin, variedade mais difundida no Brasil, conhecida como tipo amarelo, *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* Naudin e *Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naudin. As outras variedades apesar de não terem importância econômica, podem ser muito úteis à pesquisa, por apresentarem, de um modo geral, resistência a pragas e doenças, e outras características agronomicamente desejáveis e passíveis de serem transferidas em programa de melhoramento genético (Dusi, 1992).

Lê-se:

O melão divide-se botanicamente em seis grupos, dos quais dois têm importância econômica. Os dois principais grupos de melão são: *Cucumis melo* grupo *inodorus*, grupo mais difundido no Brasil, conhecido como tipo amarelo e, *Cucumis melo* L. grupo *cantalupensis*. Os outros grupos apesar de não terem importância econômica, podem ser muito úteis à pesquisa, por apresentarem, de um modo geral, resistência a pragas e doenças, e outras características agronomicamente desejáveis e passíveis de serem transferidas em programa de melhoramento genético (Dusi, 1992).

A DEUS,

por me ajudar a enfrentar as
dificuldades com serenidade e otimismo

OFEREÇO

Aos meus pais Lauro e Rosaly,

por me mostrarem o caminho certo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA/USP) pela orientação, constante disponibilidade e oportunidade de realização do curso.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de aprender, de passar momentos felizes e de formar amigos.

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), onde foram realizados os experimentos.

À FAPESP, pela bolsa de estudo e auxílio financeiro fornecidos ao projeto de pesquisa (Processo Nº 97/02966-5).

Aos professores do Departamento de Produção Vegetal, principalmente aos professores Dr. Keigo Minami e Dr. João Tessarioli Neto, pelo respeito, atenção e ensinamentos durante todo curso.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez (CENA/USP), pelo constante auxílio e sugestões durante toda realização do trabalho. Pela atenção e amizade.

Às empresas Agroflora e SVS do Brasil Sementes Ltda - Seminis Vegetable Seeds, pelas sementes fornecidas.

Aos estagiários e pós-graduandos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP).

À Profa. Dra Sônia Maria De Stefano Piedade (ESALQ/USP), pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao João Geraldo Brancalion, do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP), pela colaboração e serviços de computação gráfica.

À bibliotecária chefe Marília Henyei (CENA/USP) pela revisão das referências bibliográficas.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária-NAP/MEPA (ESALQ/USP), pela utilização dos equipamentos e microscópio eletrônico de varredura.

À minha grande amiga Alessandra C. B. de A. Monteiro-Hara, pelos registros fotográficos e pelo auxílio sempre que necessário. Pelo companheirismo, respeito e amizade.

Aos amigos e amigas Sílvia B. Filippi, Márcio L. Tomaz, Paulo Celso de M. Farias, Maria Angélica P. de C. Costa e Welliton A. B. de Almeida, pela amizade, convivência e apoio.

Às amigas Adriana P. Ricci e Sílvia Blumer, pela amizade e pelas longas conversas.

Às amigas Lúcia H. Albert, Francine L. Cuquel, Telma Passini, Juliana A. Fernando e ao amigo Vagner Benedito, pelo apoio e amizade.

À amiga Grasiela Ferraz Perpétuo pelo apoio, companheirismo, amizade e respeito.

Ao meu irmão Lauro Junior , pelo carinho e auxílio nas horas certas.

Aos meus pais, Lauro e Rosaly, pela oportunidade de poder estudar e por estarem sempre ao meu lado durante toda minha vida. Pelo amor, compreensão e infinita paciência.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 A cultura do melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	03
2.2 Cultura de tecidos em melão (<i>Cucumis melo</i> L.).....	08
2.3 Importância da caracterização anatômica da morfogênese <i>in vitro</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Organogênese <i>in vitro</i>	18
3.2 Embriogênese somática.....	21
3.3 Análise histológica com microscopia ótica.....	23
3.4 Análise morfológica com microscopia eletrônica de varredura.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Organogênese <i>in vitro</i>	25
4.2 Embriogênese somática.....	35
4.3 Análise histológica com microscopia ótica.....	41
4.3.1 Organogênese <i>in vitro</i>	41
4.3.2 Embriogênese somática.....	43
4.4 Análise morfológica com microscopia eletrônica de varredura.....	44
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema dos explantes de melão: segmentos de cotilédone de sementes maduras.....	19
2 Organogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>) em meio de cultura MS suplementado com BAP(1,0mg/L). a. explante inicial. b-d. desenvolvimento inicial de gemas adventícias, após 20 dias de cultivo. e-f. crescimento de gemas, após 6 semanas de cultivo. g alongamento das gemas adventícias em MS suplementado com BAP (0,2 mg/L), após duas semanas. h. gemas adventícias em fase de alongamento. i. plântula obtida, após 3 meses. Barras = 100µm (2c); 1mm (2b, 2d-f).....	29
3 Organogênese <i>in vitro</i> a partir de discos de folha de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>) em meio de cultura MS suplementado com BAP (1,0mg/L). a-b. formação inicial das gemas, após 2 semanas de cultivo. c-d. desenvolvimento e crescimento das gemas, após 4 semanas de cultivo <i>in vitro</i> . Barras = 1mm (3a-d).....	32
4 Embriogênese Somática a partir de segmentos de cotilédones de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>), em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D (5,0mg/L) + TDZ (0,1mg/L). a. segmentos de cotilédone após duas semanas em meio de indução, mostrando expansão dos explantes e início da formação de calos. b-c. embriões somáticos no estágio globular, após 6 semanas de indução. d. embrião somático em meio de cultura MS básico, sob fotoperíodo de 16 horas de luz. Barras = 1mm (4a-d).....	40

- 5 Organogênese *in vitro* a partir de segmentos de cotilédone de sementes maduras 20 dias de indução. a. formação e desenvolvimento de gemas adventícias, cultivados em meio de cultura suplementado com BAP (1,0 mg/L), após. b. corte histológico mostrando uma alta presença de áreas meristemáticas e protuberâncias. Barras = 200 μ m (5b); 1000mm (5a)..... 46
- 6 Análise histológica da organogênese *in vitro* a partir de segmentos de cotilédone de sementes maduras (a-g) e discos de folha (h-i), cultivados em meio de cultura MS suplementado com BAP (1,0 mg/L), após 20 dias da indução. a-c. protuberâncias com formação de áreas meristemáticas (ponta de seta). d. protuberância com região meristemática bifurcada (seta). e-g. estruturas semelhantes a gemas adventícias, com meristema caulinar(mc), primórdios foliares (pf) e tricomas (tr). h-i. formação de protuberâncias com protoderme definida (ponta de seta) e tricomas (tr). Barras = 100 μ m (6a-c, 6e, 6g); 200 μ m (6d, 6h-i)..... 47
- 7 Análise histológica da embriogênese somática de segmentos de cotilédone de sementes maduras, cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D (5,0 mg/L) + TDZ (0,1mg/L), por microscopia ótica. a-e. cortes histológicos mostrando embriões somáticos com diferenças morfológicas, com procâmbio (pc), protoderme (pd), mas sem meristema caulinar, com exceção da Figura 6a que apresenta meristema caulinar. f. embriões somáticos fundidos. Barras = 200 μ m (7a-f)..... 48
- 8 Análise morfológica em microscópio eletrônico de varredura da organogênese pelo cultivo *in vitro* de segmentos de cotilédone em meio de cultura MS básico suplementado com BAP (1,0mg/L). a-b. estágio inicial de formação de gemas adventícias, após duas semanas de indução. c-d. intensa formação de gemas adventícias, após 4 semanas de indução. Barras = 1mm (8a-d)..... 49

9 Análise morfológica em microscópio eletrônico de varredura da embriogênese somática pelo cultivo <i>in vitro</i> de segmentos de cotilédone em meio de cultura MS básico suplementado com 2,4-D (5,0 mg/L) + TDZ (0,1mg/L). a. fusão de embriões somáticos. b. embrião somático normal com hipocótilo (hc) longo e dois cotilédones (co) bem desenvolvidos. Barras = 200µm (9a); 1mm (9b).....	50
--	----

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Indução de organogênese <i>in vitro</i> com os reguladores vegetais 2-iP, cinetina, TDZ e a combinação TDZ + NAA, em diferentes concentrações (mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>). Média de 5 repetições, com 8 explantes cada.....	26
2 Organogênese <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>). Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).....	28
3 Organogênese <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>). Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).....	28
4 Organogênese <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de discos de folha de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>), após 4 semanas. Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).....	31
5 Organogênese <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de discos de folha de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i>), após 4 semanas. Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).....	31
6 Organogênese <i>in vitro</i> em meio de cultura MS básico suplementado com BAP (1,0 mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> var. <i>inodorus</i>). Cada repetição é constituída por 8 explantes.....	34

- 7 Embriogênese somática a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), em meio de cultura básico MS suplementado com TDZ (0,1 mg/L) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 6 semanas. Média de 5 repetições, com 9 explantes cada (%)..... 38
- 8 Embriogênese somática a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), em meio de cultura básico MS suplementado com TDZ (0,1 mg/L) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 6 semanas. Média de 5 repetições, com 9 explantes cada (%)..... 38
- 9 Embriogênese somática a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), em meio de cultura MS básico suplementado com 2,4-D (5,0 mg/L) e diferentes concentrações de TDZ, após 6 semanas. Média de 5 repetições, com 9 explantes cada (%)..... 39
- 10 Média do número de embriões somáticos obtidos em melão (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), a partir de segmentos de cotilédone, em meio de cultura básico MS suplementado com TDZ (0,1mg/L) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 6 semanas. Média de 3 repetições com 9 explantes cada (%)..... 39

CULTURA DE TECIDOS EM MELÃO AMARELO (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudin): ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Autora: LILIANE CRISTINA LIBORIO STIPP

Orientadora: Profa. Dra. BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

RESUMO

O objetivo do projeto foi o desenvolvimento, descrição e otimização de protocolos de cultura de tecidos em melão amarelo (*Cucumis melo* var. *inodorus* Naudin), organogênese e embriogênese somática, que possam ser utilizados em trabalhos de transformação genética. O projeto consistiu na indução da organogênese *in vitro*, com a obtenção de gemas adventícias, e na indução da embriogênese somática, com obtenção de embriões somáticos pelo cultivo *in vitro*. A organogênese *in vitro* foi induzida pelo cultivo *in vitro* de discos de folha e segmentos de cotilédone, obtidos diretamente de sementes maduras. A embriogênese somática foi induzida pelo cultivo *in vitro* de segmentos de cotilédone. Os explantes foram inoculados no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais, visando a obtenção de sistemas eficientes de regeneração de plantas. Para indução da organogênese *in vitro*, foram testados

os reguladores vegetais: BAP (benzilaminopurina), 2-iP (2-isopenteniladenina), cinetina, TDZ (thidiazuron) e a combinação TDZ + NAA (ácido naftaleno acético). Para indução da embriogênese somática foram testados: IAA (ácido indolacético), NAA, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 2,4-D + NAA, 2,4-D + BAP e 2,4-D + TDZ. Para a indução de gemas adventícias, o regulador vegetal mais eficiente foi BAP, nas concentrações 0,5 a 1,0mg/L. Para indução de embriões somáticos, a combinação de 2,4-D + TDZ, nas concentrações de 2,5 a 7,5 mg/L e 0,1mg/L, respectivamente, mostrou maior eficiência no processo. Foram realizadas a análise morfológica e histológica, possibilitando a descrição dos dois processos morfogênicos. Na organogênese *in vitro*, cortes histológicos mostraram a formação de muitas protuberâncias e primórdios foliares, havendo a formação de poucas gemas adventícias. Na embriogênese somática, o estudo histológico mostrou a formação de muitos embriões somáticos mal formados, sem a presença de meristema caulinar, justificando a baixa conversão dos embriões somáticos.

TISSUE CULTURE OF YELLOW MELON (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudin): *IN VITRO* ORGANOGENESIS AND SOMATIC EMBRYOGENESIS

Author: LILIANE CRISTINA LIBORIO STIPP

Adviser: Dr. BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

SUMMARY

The objective of this project was the development, description and optimization of tissue culture protocols of yellow melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*), including organogenesis and somatic embryogenesis, that can be used in studies of genetic transformation. The project consisted of the induction of organogenesis *in vitro*, with the formation of adventitious buds, and also the induction of somatic embryogenesis, with the formation of somatic embryos. *In vitro* organogenesis was induced by *in vitro* cultivation of leaf discs and cotyledon segments obtained from mature seeds. Somatic embryogenesis was induced by *in vitro* cultivation of cotyledon segments. The explants were inoculated in MS culture medium (Murashige & Skoog, 1962), supplemented with different types and concentrations of plant growth regulators, aiming to obtain efficient systems of plant regeneration. For *in vitro* organogenesis the following plant growth regulators were tested: BAP (benzylaminopurine), 2-iP (2-

isopentenyladenine), kinetin, TDZ (thidiazuron) and a combination of TDZ + NAA (naphthaleneacetic acid). For somatic embryogenesis induction the following growth regulators were used: IAA (indolacetic acid), NAA, 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid), 2,4-D + NAA, 2,4-D + BAP and 2,4-D + TDZ. The induction of adventitious buds was more efficient with BAP at concentrations of 0.5 to 1.0 mg/L. For the induction of somatic embryos, the combination of 2,4-D + TDZ at concentrations of 2.5 to 7.5 and 0.1 mg/L, respectively, showed the best efficiency. Morphological and histological analyses were done, allowing for the description of both morphogenic processes. In *in vitro* organogenesis histological sections showed the formation of many protuberances and leaf primordia, with few adventitious buds being formed. The histological study of somatic embryogenesis showed the formation of many malformed somatic embryos, lacking the shoot apical meristem, justifying the low conversion of the somatic embryos.

1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça da família *Cucurbitaceae*, produzido, principalmente, no continente asiático (China, Turquia e Irã), Estados Unidos e Espanha (FAO, 1999). No Brasil, a cultura do melão em nível comercial é relativamente recente, com a produção voltada para o mercado interno e externo, apresentando-se como um dos países do continente americano com maior potencial de produção e exportação de melão para o mercado europeu (Dusi, 1992; Deulofeu et al., 2000).

A variedade mais importante, no país, é o melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), ocupando 70% da produção total nacional. A produção brasileira concentra-se nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Pernambuco (FNP Consultoria & Comércio, 1999). Contudo, apesar da produção se concentrar na região Nordeste, os frutos são exportados para a região Sudeste, maior consumidora, fato este que eleva o preço final do produto ao consumidor. Dos frutos comercializados em São Paulo, 50% são importados do Rio Grande do Norte, 16% do Ceará e 7% da Bahia (Oliveira, 1998).

De um modo geral, a cultura é conduzida com alto nível de tecnologia, por ser um produto que alcança cotações que compensam os investimentos e também pela necessidade de se obter frutos de boa qualidade para atender as exigências do mercado externo (Makishima, 1991). Assim, é necessário o desenvolvimento de variedades melhoradas, resistentes a doenças e pragas, híbridos com melhor vigor, aumento da produtividade e principalmente fruto

adequado ao mercado externo, com brix mais alto, menor tamanho e resistência ao transporte e armazenamento (Dusi, 1991).

Desenvolver um programa de pesquisa, com cultura de tecidos vegetais é de muita utilidade, uma vez que esse método de propagação de plantas, permite a obtenção de plantas idênticas e sadias, além da obtenção de novas variedades, pela manipulação genética.

A cultura de tecidos vegetais é usada com sucesso em várias cucurbitáceas, como abobrinha (Chee, 1991), pepino (Chee, 1990; Punja et al., 1990), melancia (Srivastava et al., 1989; Compton & Gray, 1993) e melão (Dirks & Van Buggenum, 1989; Tabei et al., 1991). No meloeiro, a morfogênese *in vitro* pode ser obtida tanto por organogênese *in vitro* (Moreno et al., 1985 ; Kathal et al., 1988; Dirks & Van Buggenum, 1989; Niedz et al., 1989; Ficcandenti & Rotino, 1995; Molina & Nuez, 1995; Singh et al., 1996) como por embriogênese somática (Oridate & Oosawa, 1986; Homma et al., 1991; Tabei et al., 1991; Oridate et al., 1992; Gray et al., 1993). No entanto, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura foram realizados com *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* ou *Cucumis melo* L. var. *reticulatus*, havendo poucos trabalhos com *Cucumis melo* L. var. *inodorus*.

O objetivo do trabalho de pesquisa foi o desenvolvimento, descrição e otimização de protocolos de cultura de tecidos via organogênese *in vitro* e embriogênese somática em melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudin), que possam ser utilizados em trabalhos de transformação genética.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do melão (*Cucumis melo* L.)

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça da família *Cucurbitaceae*, sendo que o seu centro de origem é bastante discutido, não estando ainda bem esclarecido. Contudo, a África Tropical parece ser o centro primário de origem, transferindo-se para a Ásia Tropical, estabelecendo-se como centro secundário a Índia, Irã, Sul da antiga URSS e China (Whitaker & Davis, 1962). Introduzido no Brasil, pelos europeus, no estado do Rio Grande do Sul, maior produtor nacional até 1966, seu cultivo se disseminou por diversas localidades do território brasileiro, como Noroeste do estado de São Paulo, nordeste do Brasil e estado do Pará (Ferreira et al., 1982).

A produção mundial de melão é de 17.648.000 toneladas, aproximadamente, concentrando-se, principalmente, no continente asiático (China, Turquia e Irã), Estados Unidos e Espanha (FAO, 1999). No Brasil, essa hortaliça ocupa cerca de 10.000ha, com uma produção anual estimada em 180.000 toneladas, sendo que 40 a 50% dessa produção é exportada. A produtividade média alcançada pelos produtores e empresas exportadoras está em torno de 30 a 35 t/ha (Deulofeu et al., 2000).

O melão divide-se botanicamente em sete variedades, das quais três tem importância econômica (Dusi, 1992). As três principais variedades de melão são: *Cucumis melo* var. *inodorus* Naudin, variedade mais difundida no

Brasil, conhecida como tipo amarelo, *Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naudin e *Cucumis melo* var. *reticulatus* Naudin. As outras variedades apesar de não terem importância econômica, podem ser muito úteis à pesquisa, por apresentarem, de um modo geral, resistência a pragas e doenças, e outras características agronomicamente desejáveis e passíveis de serem transferidas em programa de melhoramento genético (Dusi, 1992).

Das cinco cultivares de *Cucumis melo* L. produzidas no Brasil (Amarillo, Piel de Sapo, Galia, Cantaloupe e Orange Flesh), o tipo amarelo, é a mais importante, sendo que 7200ha são destinados ao cultivo desta variedade, ao contrário do restante do mundo em que as principais variedades cultivadas são de melão cantaloupe e melão reticulado/Galia. O Brasil é quinto maior produtor mundial de melão amarelo. O principal produtor deste tipo de melão é a Espanha (Oliveira, 1998; Deulofeu et al., 2000). No Brasil, no entanto, se verifica um crescimento no consumo interno e exportação das outras variedades de melão. O aumento na área cultivada de melão Galia e Piel de Sapo tem sido em torno de 20% ao ano (Deulofeu et al., 2000).

A cultura em nível comercial é relativamente recente, com a produção voltada para mercado interno e externo e a produção brasileira está concentrada nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco (Dusi, 1991; FNP Consultoria & Comércio, 1999), entretanto, apesar da região Nordeste ser o grande produtor, o consumo maior dos frutos de meloeiro é feito na região sudeste, obrigando a exportação para os centros consumidores, causando um enorme aumento no preço final do produto ao consumidor. No aspecto social, representa para região Nordeste, a geração de cerca de 20.000 a 30.000 empregos diretos, sem levar em conta aqueles relacionados com transporte, comercialização e venda de insumos. Dos frutos comercializados em São Paulo, 50% são importados do Rio Grande do Norte, 16% do Ceará e 7% da Bahia, e ainda cerca de 95% do melão exportado para o mercado

internacional é produzido no Rio Grande do Norte (Oliveira, 1998, Deulofeu et al., 2000).

A exportação é destinada principalmente para o Reino Unido, Alemanha, Holanda, Países Nórdicos e Argentina (FNP Consultoria & Comércio, 1999; Deulofeu et al., 2000). A concentração da produção brasileira ocorre no mesmo momento que o frio prejudica a produção espanhola, que tem uma redução na oferta nos meses de novembro a fevereiro, possibilitando a entrada do fruto brasileiro no mercado europeu nestes meses (Deulofeu et al., 2000).

As plantas de melão são de hábito rasteiro, de haste sarmentosa. Das axilas do ramo principal desenvolvem-se três ou quatro ramos secundários, que logo igualam em desenvolvimento, podendo atingir 2 a 3 metros de comprimento. Desses ramos, nascem outros menores, curtos, que darão origem à flor feminina, ou seja, ao futuro fruto (Bernardi & Mendonça, 1971). As folhas são ásperas, como toda parte área da planta, devido à elevada presença de pêlos absorventes, característica marcante desta cultura (Maroto, 1995).

Dentre as hortaliças produzidas no centro-sul é o melão que exige temperaturas mais altas, noturnas e diurnas, tanto no ar como solo, durante todo seu ciclo cultural (Filgueira, 1981). Sendo originário de regiões tropicais, o melão requer climas mais quentes e secos, sendo que o teor de açúcares dos frutos está diretamente relacionado com as condições climáticas da produção (Dusi, 1992). As condições climáticas que exercem influência substancial sobre a produção e qualidade dos frutos são: temperatura, luminosidade, umidade do solo e do ar, sendo que temperaturas elevadas, associadas a alta luminosidade e baixa umidade, proporcionam as condições climáticas necessárias para a boa produtividade da cultura e para obtenção de frutos de ótima qualidade (NID MELÃO 1.0, 1994).

Para o meloeiro, temperaturas ideais para germinação das sementes, variam no intervalo ótimo entre 24 a 32°C; para conseguir um bom desenvolvimento vegetativo, em função dos cultivares o intervalo térmico mais adequado varia entre 18 e 20°C; para polinização, temperaturas inferiores a 18°C podem afetar e finalmente, para maturação dos frutos é exigido temperaturas entre 24 a 30°C. Aumentos bruscos de temperatura durante a maturação podem provocar, em determinadas variedades, decomposição da polpa, por acelerar exageradamente a maturação. Temperaturas baixas podem impedir a polinização e causar um aborto e queda de frutos pequenos. Temperaturas baixas, diferenças térmicas excessivas entre dia e noite, excesso de irrigação com alta insolação, encharcamentos durante a maturação podem provocar alterações que comprometam a qualidade final do fruto. A umidade relativa ótima para esta cultura encontra-se na faixa entre 60 a 70% (Maroto, 1995; Borrego, 1997).

O meloeiro é uma das cucurbitáceas mais exigentes em termos de solo. Assim, se desenvolvem bem em solos franco-arenosos e areno argilosos, leves, soltos e com bom arejamento, pois requer quantidade apreciável de oxigênio no solo. O melão não se adapta a solos argilosos, excessivamente pesados (Filgueira, 1981). Dusi (1992) relata que o melão pode ser cultivado em diferentes tipos de solo, entretanto os que tem boa aeração e permitem satisfatório desenvolvimento radicular, bem como possuem pH entre 6,4 e 7,2, alta fertilidade e boa capacidade de retenção de água, promovem melhor desenvolvimento da cultura.

Os requisitos nutricionais do meloeiro, nas condições de clima e solo do Brasil, carecem do apoio de informações geradas. Além da intolerância à acidez, também sabe-se que o melão é muito exigente em cálcio, daí as respostas muito favoráveis às aplicações de calcário finamente moído, feitas de acordo com a análise do solo. Também quanto a disponibilidade de

macronutrientes, o meloeiro é muito mais exigente do que outras cucurbitáceas. O fósforo é o nutriente que promove aumentos mais evidentes na produtividade, seguindo-se do nitrogênio. O potássio influencia na qualidade dos frutos, notadamente no sabor. Os dois micronutrientes que parecem afetar a cultura no Brasil, são o molibdênio e o boro, cuja deficiência pode ser corrigida, sendo que o boro está relacionado com a qualidade e firmeza dos frutos e o molibdênio com a coloração da casca (Filgueira, 1981; Dusi, 1992). As deficiências e toxicidade extremas dos nutrientes, causam frequentemente expressivos prejuízos ao produtor de melão, quando não identificados, e corrigidos em tempo hábil (NID MELÃO 1.0, 1994).

A implantação do cultivo de melão pode ser pela semeadura direta ou por transplantio, havendo, neste caso, a necessidade de transplantar o torrão, já que esta hortaliça é intolerante ao transplante de raiz nua, (Pascual, 1995). A semeadura pode ser feita em sulcos ou em covas (Bernardi & Mendonça, 1971; Figueira, 1981; Dusi, 1992; Trani et al., 1996). O transplante deve ser realizado quando as mudas estiverem no estágio de 2 a 3 folhas verdadeiras (Pascual, 1995; Guillamón et al., 1997). O transplantio é mais vantajoso uma vez que evita problemas de germinação devido à temperatura e permite um cultivo homogêneo (Guillamón et al., 1997). No estado de São Paulo, o plantio de melão pode ser feito, com sucesso, em duas épocas: fevereiro-março e agosto-setembro. Regiões do Nordeste, em que há condições favoráveis de clima e solo, cultiva-se o melão quase o ano inteiro (Bernardi & Mendonça, 1971).

Os tratos culturais, visando oferecer melhores condições de desenvolvimento das plantas e de seus frutos são intensivos. Os principais tratos culturais dessa cucurbitácea são: desbaste de plantas, irrigação, desbaste de frutos, condução dos ramos e controle de plantas daninhas, pragas e doenças (Filgueira, 1981; Dusi, 1992).

Os frutos do meloeiro têm excelente aspecto, sabor e aroma, tendo grande aceitação em nosso mercado, onde alcançam cotações altamente compensadoras (Bernardi & Mendonça, 1971; Filgueira, 1981). Na comercialização, observa-se que os consumidores de melão, pelo menos no centro-sul, são aqueles de maior poder aquisitivo, dentre os consumidores de produtos olerícolas (Bleonroth, 1994). Portanto o desenvolvimento de tecnologias que visem o controle de qualidade e conservação pós-colheita do melão não acompanham o ritmo de produção. A adoção de técnicas de conservação que permitam a manutenção da qualidade do melão é de interesse geral, pois prolonga seu período de comercialização (Souza et al., 1994)

2.2 Cultura de tecidos vegetais em melão (*Cucumis melo* L.)

A literatura apresenta eficientes protocolos de regeneração de plantas *in vitro*, em diversas cucurbitáceas, como abobrinha, pepino, melancia e melão (Dirks & Van Buggenum, 1989; Srivastava et al., 1989; Chee, 1990; Punja et al., 1990; Chee 1991; Compton & Gray, 1993; Tabei et al., 1991). O sucesso da técnica de cultura de tecidos requer o desenvolvimento de um protocolo para regeneração de plantas através de células ou diretamente do explante (Niedz et al., 1989). Na cultura do melão, a regeneração de plantas *in vitro* pode ser tanto por organogênese *in vitro*, isto é, pelo desenvolvimento de gemas adventícias (Moreno et al., 1985; Kathal et al., 1988; Dirks & Van Buggenum, 1989; Niedz et al., 1989; Tabei et al., 1991; Ficcadenti & Rotino, 1995; Molina & Nuez, 1995) como por embriogênese somática, isto é, pelo desenvolvimento de embriões somáticos a partir do tecido cultivado (Oridate & Oosawa, 1986; Homma et al., 1991; Tabei et al., 1991; Oridate et al., 1992; Gray et al., 1993), entretanto a taxa de regeneração é menor. A indução e desenvolvimento dos dois processos

(organogênese *in vitro* e embriogênese somática) são determinados pelo tipo e concentração de reguladores vegetais e dos explantes utilizados (Tabei et al., 1991).

A organogênese *in vitro* em *Cucumis melo* L. é obtida, com eficiência a partir de vários explantes. Os explantes mais utilizados são segmentos de cotilédone obtidos diretamente de sementes maduras ou de seedlings germinados *in vitro* (Moreno et al., 1985; Dirks & Van Buggenum, 1989; Chee, 1991; Tabei et al., 1991; Ezura et al., 1992; Singh et al., 1996; Ogawa et al., 1997; Gaba et al., 1999). Os segmentos de cotilédone de seedlings germinados *in vitro*, são coletados de seedlings com 3 a 8 dias de idade (Niedz et al., 1989; Shetty et al., 1992; Ficcadenti & Rotino, 1995; Molina & Nuez, 1995; Singh et al., 1996; Ezura et al., 1997). A eficiência de regeneração dos explantes de cotilédone é bem maior na região proximal, enquanto que a região distal e os lados dos explantes apresentam uma baixa formação de gemas (Gonsalves et al., 1994), demonstrando a polaridade na indução de gemas adventícias. Os segmentos de cotilédones variam de 3 a 5 mm de largura x 3 a 5 mm de comprimento, sendo que aproximadamente 1 mm da parte basal e apical são descartados (Ezura et al., 1992).

Outros explantes são utilizados na indução da organogênese *in vitro*, como segmentos de hipocótilo ou de folhas. Os segmentos de hipocótilo utilizados como explante na obtenção da organogênese são de seedlings germinados *in vitro*, com idade de 10 dias, sendo cortados com 10 mm de comprimento, sendo que houve pouca ou ausência de formação de gemas adventícias (Tabei et al., 1991). Molina & Nuez (1995) utilizaram segmentos de hipocótilo (10 mm) de seedlings também germinados *in vitro*, no entanto estes segmentos foram colocados verticalmente no meio de cultura, havendo uma considerável indução de brotos. Discos de folha são utilizados com sucesso na indução da organogênese *in vitro* em melão. Discos de folha são obtidos de

seedlings germinados *in vitro* ou de plantas jovens cultivadas em casa-de-vegetação, havendo uma boa resposta na formação de gemas e na regeneração de plantas (Kathal et al., 1988; Dirks & Van Buggenum, 1989; Molina & Nuez, 1995; Tabei et al., 1991).

O meio de cultura utilizado é o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com reguladores vegetais que determinam a eficiência do processo. Segundo Moreno et al. (1985), a combinação de cinetina e auxina estimulam a morfogênese em *Cucumis melo* L.. Niedz et al. (1989), apresentam BAP (benzilaminopurina) como sendo mais eficiente na indução da organogênese. A combinação BAP e 2-iP (2-isopenteniladenina) possibilitou a obtenção de gemas através de segmentos de folhas jovens (Kathal et al., 1988). Singh et al. (1996) também utilizam a combinação BAP e 2-iP, tendo uma baixa formação de gemas quando comparado com o tratamento com apenas o regulador BAP. Calos e gemas são obtidos da combinação de BAP (1,2 mg/L) com IAA (ácido indolilacético) (0,9 mg/L), mas a auxina não é essencial para a indução (Niedz et al., 1989). A quantidade de auxina no caso, 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) (0 - 0,01 mg/L), quando for baixa determina a formação de gemas, formadas diretamente de explantes (Tabei et al., 1991). Organogênese *in vitro* foi relatada por Ficcadenti & Rotino (1995), sendo que utilizaram meio de cultura contendo BAP, com ou sem ABA (ácido abscísico), ou TDZ. A combinação BAP e NAA (ácido naftalenoacético) também é utilizada com eficiência na indução de gemas adventícias (Ezura et al., 1997; Ogawa et al., 1997). As concentrações mais eficientes de BAP, para indução da organogênese, geralmente, são baixas, variando de 0,1 a 1,0 mg/L, sendo que este regulador vegetal é mais eficaz no processo organogênico em melão (Niedz et al., 1989; Chee, 1991; Shetty et al., 1992; Ficcadenti & Rotino, 1995; Singh et al., 1996).

Após a indução, os explantes são transferidos para meio de cultura MS, suplementado com uma dose reduzida ou na ausência do regulador vegetal, pela maioria dos autores, propiciando o alongamento das gemas adventícias obtidas (Dirks & Van Buggenum, 1989; Niedz et al., 1989; Chee, 1991; Singh et al., 1996). Entretanto, Kathal et al. (1988) que induziram gemas adventícias na combinação BAP + 2iP, utilizaram MS suplementado com BAP (0,2 mg/L), para o alongamento dessas, enquanto que Tabei et al. (1991), transferem para meio MS, com metade das concentrações de sais minerais, adicionando ainda ácido giberélico- GA_3 (0,2 mg/L). Ficcadenti & Rotino (1995) também utilizam um regulador vegetal diferente daquele utilizado na indução, para alongar as gemas (1 mg/L de zeatina em MS básico). Gemas adventícias são multiplicadas e alongadas em meio de cultura contendo BAP, na mesma concentração utilizada para indução do processo.

Dificuldades na transferência das plântulas *in vitro* para o campo pode ser observada na cultura do melão (Moreno et al., 1985; Oridate & Oosawa, 1986; Tabei et al., 1991). Entretanto, Singh et al. (1996) apresenta um protocolo eficiente de regeneração de plantas *in vitro*, com a transferência, com sucesso, para o campo, sendo que as plantas se desenvolveram, apresentando flores e frutos normais.

Gaba et al.(1999) apresentaram o estudo da anatomia e histologia da organogênese *in vitro*, de melão cv. Galia, obtida a partir de segmentos de cotilédono de seedlings germinados *in vitro*, com 3 dias de idade. Pode-se observar a formação de muitas protuberâncias e pequenas folhas, sem a presença de gemas adventícias. A primeira gema foi histologicamente encontrada somente após 22 dias da indução, sendo um caso praticamente isolado. Portanto, constataram que a produção de protuberâncias e folhas é um fenômeno comum em melão, por isso grande parte das estruturas, não se

desenvolvem em plantas. Este trabalho comprova a importância de se realizar a análise histológica dos processos morfogênicos *in vitro*.

A embriogênese somática em melão também é induzida a partir de diversos explantes. Os explantes que apresentam melhores resultados são segmentos de cotilédones (Oridate & Oosawa, 1986; Homma et al, 1991; Tabei et al., 1991; Gray et al., 1993; Gray, 1996). Células em suspensão a partir de segmentos de cotilédone germinados *in vitro* foram utilizadas como explantes (Kageyama et al., 1991).

Apesar de menos eficientes no processo embriogênico, embriões somáticos também podem ser obtidos a partir de hipocótilos, folhas e protoplastos. Hipocótilos são obtidos de seedlings com idade de 10 dias, sendo cortados em segmentos de 8 mm de comprimento, obtendo uma baixa frequência de embriões somáticos (Tabei et al., 1991). Segmentos de hipocótilo de 5mm, obtidos de seedlings com 7 dias de idade não desenvolveram embriões somáticos (Oridate & Oosawa, 1986). Discos de folhas jovens, de plântulas de 3 semanas de idade são utilizados como explantes, havendo formação e desenvolvimento de embriões somáticos (Tabei et al., 1991). Protoplastos isolados a partir de cotilédones e folhas também podem ser utilizados, sendo a regeneração de plantas obtida a partir da embriogênese somática (Debeaujon & Branchard, 1992).

A indução dos embriões somáticos é realizada em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) pela maioria dos autores, suplementado com um regulador vegetal, que é essencial no processo embriogênico do melão. Auxinas, como 2,4-D, são muito importantes e empregadas na embriogênese somática, mas citocininas (BAP) também são importantes (Oridate & Oosawa, 1986). A quantidade de auxina, no caso 2,4-D, determina a formação de gemas adventícias ou a formação de embriões somáticos, se a concentração for elevada, obtêm-se calos que formam os embriões (Tabei et al., 1991). Para

indução da embriogênese somática, a concentração de BAP mais eficiente é 0,1 mg/L (Oridate & Oosawa, 1986; Tabei et al., 1991), mas associada à presença de uma auxina. Homma et al. (1991) demonstram que 2,4-D (2 e 4 mg/L) associado a 0,1 mg/L BAP é mais eficiente que diferentes concentrações de NAA associado a 0,1 mg/L de BAP. A combinação de duas auxinas (2,4-D e NAA) e uma citocinina (BAP) foi utilizada com eficiência na indução da embriogênese somática a partir de células em suspensão de segmentos de cotilédones germinados *in vitro*, porém houve a formação de muitos embriões somáticos anormais (Kageyama et al., 1991). A combinação 2,4-D (5mg/L) e TDZ (0,1mg/L) também é utilizada com eficiência na indução da embriogênese somática em melão (Gray et al., 1993; Gray, 1996).

Oridate & Oosawa (1986) transferiram calos embriogênicos, induzidos em meio com 2,4-D + BAP, para meio de cultura MS líquido, suplementado com 30 g/L de sacarose, sem reguladores vegetais, para que os embriões somáticos possam se desenvolver. Embriões somáticos também são desenvolvidos em meio MS sólido, com metade das concentrações de sais minerais, sem reguladores vegetais (Homma et al., 1991). O ácido giberélico (0,2mg/L) pode ser adicionado em MS sólido, com metade das concentrações de sais minerais, para desenvolvimento dos embriões somáticos (Tabei et al., 1991).

Estes protocolos desenvolvidos para a regeneração de plantas *in vitro* têm sido utilizados na obtenção de plantas transgênicas. Os trabalhos de transformação genética em melão, iniciaram-se com Fang & Grumet (1990), que desenvolveram um sistema eficiente de produção de plantas transgênicas, utilizando o co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* com explantes de cotilédones de 4-5 dias de idade, para introdução do gene nptII, de resistência à canamicina. Mais tarde, foi descrita a introdução de genes de interesse agrônomico como gene da capa protéica do vírus do mosaico do pepino (Yoshioka et al., 1992), o gene da capa protéica do CMV folha branca

(Gonsalves et al., 1994), gene da capa protéica do CaMV (Dong et al., 1991) e o gene antisense da enzima ACC oxidase, da biossíntese do etileno (Ayub et al., 1996; Bouquin et al., 1997; Guis et al., 1997). A transformação genética em melão tem sido realizada, na maioria dos casos, com *Agrobacterium tumefaciens* (Fang & Grumet, 1990; Yoshioka et al., 1992; Gonsalves et al., 1994; Vallés & Lasa, 1994; Ayub et al., 1996; Bouquin et al., 1997; Guis et al., 1997), utilizando-se cotilédones de sementes maduras ou de seedlings de 3-5 dias de idade para o co-cultivo. Gonsalves et al. (1994) demonstraram que a biobalística também é eficiente para transformação de melão, com uma eficiência de 1,4 ~ 2,6% em função da posição do explante no momento do bombardeio.

Na literatura, a maioria dos trabalhos apresentados foram realizados com cultivares da var. *cantaloupensis* e da var. *reticulatus*, possivelmente devido ao maior consumo na Europa e Estados Unidos de ambas variedades. Em melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), poucos sistemas para formação de plantas regeneradas via organogênese *in vitro* têm sido desenvolvidos (Moreno et al., 1985 ; Vallés & Lasa, 1994; Ficcandenti & Rotino, 1995), assim como via embriogênese somática (Oridate et al., 1992; Gray et al., 1993). A influência do genótipo nos resultados obtidos é evidente, sendo que cultivares de melão amarelo tendem a apresentar uma eficiência menor (Oridate et al., 1992; Gray et al., 1993; Ficcandenti & Rotino, 1995). Portanto, a adaptação e disponibilidade de um protocolo eficiente de cultivo e regeneração de plantas *in vitro* em melão amarelo, é básico para que se possa, no futuro, iniciar trabalhos de transformação genética desta cultura no país. No Brasil, não existem relatos na literatura de trabalhos de cultura de tecidos vegetais com a variedade *inodorus*.

2.3 Importância da caracterização anatômica da morfogênese *in vitro*

A análise histológica e morfológica do material cultivado *in vitro* permite a descrição e a confirmação da morfogênese. As duas vias de regeneração *in vitro*, organogênese e embriogênese somática, podem ser distinguidas através de diferenças anatômicas existentes entre embriões somáticos e gemas adventícias. Os embriões somáticos são estruturas caracterizadas pela presença de dois pólos (radicular e caulinar) e não são conectados ao explante através da vascularização. As gemas adventícias são estruturas unipolares, com conexão vascular com tecido do explante (Haccius, 1978). O conhecimento da via regeneração de plantas possibilita melhorar as condições de cultivo, permitindo a otimização de protocolos de cultura de tecidos vegetais.

Apesar de terem um eficiente sistema de indução da embriogênese somática, muitas espécies não convertem os embriões somáticos obtidos em plântulas (Yeng, 1999). Em embriões somáticos de *Daucus carota*, Nickle & Yeung (1993) verificaram que a falta de estabilidade do meristema possivelmente determinava a baixa conversão de plantas. Estudos histológicos demonstram que muitos embriões somáticos não possuem um meristema caulinar organizado, impedindo seu crescimento e desenvolvimento (Nickle & Yeung, 1993; Yeng, 1999). Aberrações na maturação do pólo caulinar assim como vascularização precoce ou anormalidades no cotilédone sejam possíveis causas da falta de plântulas obtidas (Yeng, 1999). Padmanabhan et al. (1998) apresentam quatro anormalidades dos embriões somáticos como principais causas para a não conversão em plântulas: falta de organização do meristema apical caulinar; células vascularizadas na região apical, podendo romper o tecido, meristema apical caulinar com ausência de domos, várias regiões meristemáticas resultando formação de calo (meristemóides). No entanto, apesar de apresentarem algumas anormalidades e deformações, muitos

embriões somáticos germinam devido a presença de um meristema apical radicular, mas a conversão em plantas somente é possível em embriões que possuem um meristema apical caulinar bem definido (Fernando, 1999). O processo de embriogênese somática é influenciado diretamente pela morfologia dos embriões: embriões normais convertem em plântulas mais rapidamente que embriões anormais (Lazzeri et al.; 1987).

Similarmente ao processo de embriogênese somática, para eficiência do processo de organogênese *in vitro* é necessário que as gemas adventícias obtidas possuam um meristema apical caulinar bem formado ao lado de primórdios foliares (Yeng, 1999). Estudos histológicos verificaram que primórdios foliares podem se formar sem o desenvolvimento do meristema apical caulinar em *Taraxacum officinale*, demonstrando a baixa eficiência do sistema de regeneração (Bowes, 1976). Na indução da organogênese *in vitro* a partir cotilédones de *Abies fraseri*, gemas adventícias não se desenvolvem, apesar de apresentarem áreas meristemáticas, por não terem células competentes para seu desenvolvimento. Entretanto, pode-se observar a pouca presença de gemas adventícias obtidas a partir de hipocótilos. Através da análise histológica verificou-se que essas gemas obtidas foram originadas nas camadas epidérmicas e subepidérmicas do explante, observando-se também muitas áreas meristemáticas indiferenciadas que não formariam gemas (Saravitz et al., 1993). Muitos meristemóides não formam gemas adventícias por anormalidades que ocorrem durante seu desenvolvimento (Saravitz et al., 1993). Ao contrário da embriogênese somática que pode ser unicelular ou multicelular, a origem celular do processo organogênico é multicelular, podendo originar-se a partir de células epidérmicas e subepidérmicas (Saravitz et al., 1993; Wilmink et al., 1995).

Na cultura do melão, a literatura apresenta somente um relato do estudo anatômico e histológico da organogênese *in vitro* (Gaba et al., 1999). Os

autores verificaram aparentemente, a formação de uma grande quantidade de estruturas semelhantes a gemas adventícias em melão, porém pela análise histológica, observaram a formação de muitas protuberâncias e pequenas folhas, sem a formação do meristema caulinar, sendo que poucas gemas adventícias com meristema caulinar bem definido foram encontradas. Este fato possivelmente é a causa de um desenvolvimento de um número muito pequeno de plântulas (Gaba et al., 1999). Não existem relatos do estudo anatômico e histológico da embriogênese somática em *Cucumis melo* L., apenas a descrição da morfologia por Kageyama et al. (1991), que apresentam embriões somáticos normais com dois cotilédones bem desenvolvidos e hipocótilo longo e embriões somáticos anormais com hipocótilo reduzido.

O estudo anatômico permite também a observação dos tipos celulares e as regiões responsivas do explante, importantes em trabalhos de transformação genética de plantas (Matsumoto et al., 1996). A baixa eficiência de sistemas de transformação genética pode ser determinada pela origem multilcelular da morfogênese *in vitro*, permitindo escapes de células não transformadas, pela ausência de desdiferenciação celular devido a regeneração ser diretamente a partir de células epidérmicas e subepidérmicas ou pela regeneração ser a partir de células meristemáticas localizadas longe da superfície do explante, impedindo o contato com a bactéria (Mukhopadhyay et al., 1992; Sangwan et al., 1992; Wilmink et al., 1995). Estudos histológicos determinando áreas meristemáticas e sua distância em relação a superfície do explante contribuem para o aumento da eficiência do processo de transformação via *Agrobacterium* (Alves, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP. As análises de microscopia eletrônica foram realizadas com o microscópio eletrônico de varredura e equipamentos auxiliares do Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA), da ESALQ/USP.

Material Vegetal: os experimentos foram realizados com as cultivares de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudin: híbrido AF-522 melhorado, Eldorado, Yellow King e Yellow Queen. As sementes foram fornecidas pela Agroflora (híbrido AF-522 melhorado) e pela SVS do Brasil Sementes Ltda - Seminis Vegetable Seeds (Eldorado, Yellow King e Yellow Queen).

3.1 Organogênese *in vitro*

Explantos: os explantes utilizados foram segmentos de cotilédones, obtidos diretamente de sementes maduras, e discos de folhas jovens, coletados de plantas mantidas em casa-de-vegetação. Para isolamento dos cotilédones as sementes foram imersas em água destilada, por um período de uma hora, para facilitar a retirada da casca. A assepsia das sementes, sem casca, foi realizada em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,5%) em água, na proporção

1:3, por 15 minutos. Após este período, o material foi lavado 4 vezes em água destilada e estéril, no interior da câmara de fluxo laminar. Os cotilédones foram cortados em segmentos de 3~5 mm largura x 3~5 mm de comprimento, sendo que a parte basal e apical foram descartadas (Figura 1; Figura 2a). Para isolamento dos discos de folha, folhas jovens com aproximadamente 5-7cm de comprimento, foram coletadas de plantas mantidas em casa-de-vegetação. A assepsia das folhas foi a mesma das sementes, no entanto, por um período de 8 a 10 minutos. Foram utilizados discos de folha com 0,6 mm de diâmetro, sendo abaxial, a orientação do explante, no contato com meio de cultura.

Figura 1. Esquema dos explantes de melão: segmentos de cotilédone de sementes maduras.

Condições de cultivo: o meio de cultura básico utilizado para desenvolvimento da organogênese *in vitro* foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30g/L de sacarose e solidificado com 8g/L de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8. Para indução de gemas adventícias a partir de segmentos de cotilédone, foram testados os reguladores vegetais: benzilaminopurina - BAP (0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25 mg/L), cinetina (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L), 2-isopenteniladenina - 2-iP (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L), thidiazuron - TDZ (0,0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg/L) e a combinação TDZ (0,0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg/L) + ácido naftaleno acético - NAA (0,1 mg/L). Para indução de gemas adventícias a partir de discos de folha foi testado

o regulador vegetal BAP nas doses: 0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75, 1,0, 1,25 mg/L. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de petri com 8 segmentos de cotilédone. O material foi incubado à temperatura de 27°C, sob fotoperíodo de 16h de luz. Os experimentos com os reguladores vegetais cinetina, 2-iP, TDZ e combinação BAP + NAA foram repetidos duas vezes. Os experimentos com BAP foram repetidos três vezes, com segmentos de cotilédone e cinco vezes, com discos de folha.

Avaliação do material: a avaliação foi realizada após 4 e 6 semanas de incubação, determinando-se o número de explantes com gemas adventícias, com auxílio de microscópio estereoscópio.

Alongamento das gemas obtidas: as gemas obtidas a partir de organogênese *in vitro* de segmentos de cotilédone em meio de cultura suplementado com BAP (1,0mg/L), foram separadas dos explantes e transferidas para três diferentes meios de cultura: MS (Murashige & Skoog, 1962) básico (30g/L de sacarose e 8g/L de ágar), MS básico suplementado com 1,0 mg/L de ácido giberélico- GA_3 e MS básico suplementado com 0,2 mg/L de BAP. O material permaneceu incubado sob fotoperíodo de 16 horas de luz, à temperatura de 27°C. As gemas obtidas a partir de discos de folha também foram transferidas para meio de cultura de alongamento - MS + BAP (0,2 mg/L). Determinou-se o número de plântulas obtidas a partir de segmentos de cotilédone cultivados em meio de cultura básico MS suplementado com BAP (1,0mg/L), com a transferência das gemas obtidas para meio de cultura MS básico suplementado com BAP (0,2 mg/L) e, posteriormente, para MS básico suplementado com 1,0 mg/L de GA_3 . O subcultivo foi realizado em intervalo de 15 dias, transferindo-se as gemas para meio de cultura fresco.

Aclimatização: as gemas alongadas foram transferidas para o substrato vermiculita contendo meio de cultura MS básico, mantendo-se o material em condições assépticas e em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas. Após o desenvolvimento e enraizamento das plântulas *in vitro*, estas foram transferidas para aclimatização, em casa-de-vegetação. As plantas foram retiradas dos frascos de cultura de tecidos, lavadas em água corrente e transferidas para vasos pequenos, contendo uma mistura de substrato (Plantmax) e humus de minhoca. Os vasos foram cobertos com saco plástico transparente e umedecidos com água.

Análise estatística: todos experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. A análise estatística foi realizada pelo programa SANEST, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Duncan para comparações de médias (nível de significância de 5%). A análise estatística foi realizada com os dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

3.2 Embriogênese Somática

Explantos: para indução da embriogênese somática foram utilizados como explantes segmentos de cotilédone (3~5 mm largura x 3~5 mm de comprimento) e o eixo embrionário.

Condições de cultivo: os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) básico (30g/L de sacarose, 8g/L de ágar, pH=5,8) suplementado com reguladores vegetais: ácido 2,4 diclorofenoxiacético - 2,4-D (0,0; 0,01; 0,1; 1,0 e 2,0 mg/L), ácido naftaleno acético - NAA (0,0; 0,5; 1,0; 3,0; 10,0 e 15,0 mg/L), ácido indolacético - IAA (0,0; 1; 5; 15; 25 e 30 mg/L) e as combinações de 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/L) + thidiazuron - TDZ

(0,1mg/L) e 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/L) + BAP (0,1 mg/L). Com base nos resultados obtidos, foram testados a combinação 2,4-D + TDZ, com as doses de 5,0 mg/L de 2,4-D e 0,0; 0,025; 0,050; 0,075; 0,10; 0,125 e 0,15 mg/L de TDZ. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de uma placa de petri, com 9 explantes (8 segmentos de cotilédone + eixo embrionário). O material foi incubado no escuro, à temperatura de 27C.

Avaliação do material: a avaliação foi realizada após 4 e 6 semanas de incubação, determinando-se o número de explantes responsivos, com auxílio de microscópio estereoscópio.

Desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos: após a indução, o material foi transferido para meio de cultura MS básico, para desenvolvimento dos embriões somáticos e incubado sob fotoperíodo de 16 horas de luz, à temperatura de 27C. O subcultivo foi realizado em intervalo de 15 dias. Para a germinação, os embriões foram transferidos para MS básico, suplementado com 1,0 mg/L de ácido giberélico (GA₃).

Efeito da luz na formação e no desenvolvimento dos embriões somáticos: os calos embriogênicos e os embriões somáticos obtidos a partir de embriogênese de segmentos de cotilédone, em meio de cultura básico suplementado com 2,4-D + TDZ, foram transferidos para meio de cultura MS básico. O material foi incubado sob fotoperíodo de 16 horas de luz e no escuro, à temperatura de 27C, por um período de 15 dias, para se determinar o efeito do fotoperíodo após a indução dos embriões. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento, sendo

cada repetição constituída por uma placa de petri com 8 segmentos de cotilédone e o eixo embrionário.

Análise estatística: os experimentos realizados foram repetidos duas vezes. A análise estatística foi realizada pelo programa SANEST, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Duncan para comparações de médias (nível de significância de 5%). Utilizou-se a transformação de $\sqrt{x + 0,5}$ para os dados obtidos.

3.3 Análise Histológica com Microscopia Ótica

Segmentos de cotilédone, cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 1mg/L de BAP, coletados após 0, 4, 7, 12, 15, 17 e 20 dias de incubação e embriões somáticos obtidos em meio de cultura MS com 5mg/L de 2,4-D + 0,1 mg/L de TDZ de melão amarelo foram coletados e preparados para análise histológica. As amostras coletadas foram mantidas em solução fixadora contendo paraformaldeído (6%) e glutaraldeído (2%) em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, a pH 7,2, na proporção 1:1, sob refrigeração (4C). Os tecidos fixados foram desidratados à temperatura ambiente em uma série alcóolica de 100% metil celosolve, etanol, propanol, e butanol, seguido de imersão em butanol:meio de infiltração (1:1). As amostras foram transferidas para meio de infiltração a 4C, por 48 h. A emblocagem foi realizada em Historesina (hidroxietilmetacrilato). A polimerização foi feita à temperatura ambiente por 3 a 5 dias. Após a polimerização da resina, foram feitos cortes seriados, os quais foram corados com fucsina ácida e azul de toluidina para observações gerais.

3.4 Análise Morfológica com Microscopia Eletrônica de Varredura

Após 4 semanas de indução, gemas adventícias obtidas a partir de segmentos de cotilédone cultivados em meio de cultura MS suplementado com 1mg/L de BAP e embriões somáticos obtidos de explantes (segmentos de cotilédone) cultivados em meio de cultura MS suplementado com 5mg/L de 2,4-D + 0,1 mg/L de TDZ de melão amarelo foram coletados e preparados para microscopia eletrônica de varredura. Foi utilizada solução fixadora contendo glutaraldeído 2% em 0,1M de tampão cacodilato, sob refrigeração. Após a fixação, foi realizada 3 lavagens em tampão cacodilato 0,1M, de 20 minutos cada. A desidratação foi realizada em concentrações crescentes de etanol: 35%, 50%, 60%, 75%, 85%, 95% e 100%. O material desidratado em etanol foi colocado em recipientes próprios para secagem de amostras ao ponto crítico. Após a secagem, o material foi montado sobre os suportes para microscópio eletrônico de varredura, com auxílio de microscópio estereoscópico. Os suportes contendo as amostras foram ao cobertos com ouro (45 a 60 nm de ouro) em metalizador (Rodriguez & Wetzstein, 1998). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM 940A, operando entre 10 e 15 KV, do Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica de Varredura - NAP/MEPA, ESALQ/USP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Organogênese *in vitro*

Pela análise dos experimentos realizados, pôde-se verificar que os reguladores vegetais cinetina, 2iP (2-isopenteniladenina), TDZ (thidiazuron) e a combinação TDZ + NAA (ácido naftaleno acético) são ineficientes para indução da organogênese *in vitro* em segmentos de cotilédone de melão amarelo, não havendo a formação de gemas adventícias em nenhum dos tratamentos testados com cinetina, TDZ e TDZ + NAA e uma pequena formação de gemas nos tratamentos com 2iP, após 8 semanas de indução (Tabela 1). Na concentração de 1,0mg/L de 2iP verificou-se uma insignificante formação de gemas adventícias, com apenas 5% dos explantes responsivos, no híbrido AF-522. No tratamento com cinetina e 2iP, os explantes (segmentos de cotilédone) cresceram e tornaram-se verdes, no entanto, após alguns dias, ocorreu formação de calos, de coloração translúcida, não havendo formação de gemas adventícias. No tratamento com TDZ, os explantes se expandiram e começaram a formar calos não compactos, com células soltas, após 15 dias da introdução. Na combinação TDZ + NAA, pôde-se observar a formação de calos associada a presença de raízes. Ficcadenti & Rotino (1995) constataram o desenvolvimento de gemas adventícias a partir de segmentos de cotilédones de plântulas germinadas *in vitro*, com 4-5 dias de idade, utilizando o TDZ como regulador vegetal, porém determinaram o BAP, como o regulador vegetal mais

eficiente no processo. Citocininas, como a zeatina, 2iP e o regulador vegetal TDZ induziram a formação de gemas adventícias, porém com menor eficiência que BAP, em cotilédones em melão conforme descritos por Niedz et al. (1989), e a combinação cinetina e IAA foi eficiente na obtenção de plantas via organogênese *in vitro* a partir de segmentos de cotilédone germinados *in vitro*, com 5 dias de idade (Moreno et al., 1985; Vallés & Lasa, 1994).

Tabela 1. Indução de organogênese *in vitro*, com os reguladores vegetais 2-iP, cinetina, TDZ e a combinação TDZ + NAA, em diferentes concentrações (mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*). Média de 5 repetições, com 8 explantes cada.

Cultivares	Regulador vegetal	0,0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5
(mg/L)								
Eldorado	2-iP	8/0(0)	8/0(0)	—	8/0(0)	—	8/0,4(5)	8/0(0)
	Cinetina	8/0(0)	8/0(0)	—	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)
	TDZ	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)
	TDZ+NAA	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	—
			—	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	—
AF-522	2-iP	8/0(0)	8/0(0)	—	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)
	Cinetina	8/0(0)	8/0(0)	—	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)
	TDZ	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)
	TDZ+NAA	8/0(0)	—	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	—
			—	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	8/0(0)	—

*Média do número de explantes introduzidos / média do número de explantes responsivos (%)

-- Concentrações não testadas

O regulador vegetal benzilaminopurina (BAP) foi o mais eficiente na indução da organogênese *in vitro* do melão amarelo a partir de segmentos de cotilédone de sementes maduras, verificando uma alta frequência de gemas adventícias (Figuras 2b-f). Após a indução, os explantes apresentaram um crescimento e desenvolvimento intenso, tornando-se de coloração verde. Após duas semanas de cultivo pôde-se observar a formação de uma região entumescida, na borda dos segmentos de cotilédone, devido a intensa proliferação celular. Nessa região inicia uma intensa formação e desenvolvimento de estruturas semelhantes a gemas adventícias com primórdios foliares bem desenvolvidos. Nos tratamentos 0,5, 0,75 e 1,0 mg/L de BAP pôde-se observar que a resposta organogênica foi semelhante, não havendo diferença significativa entre eles, pôde-se verificar apenas diferenças visuais quanto a quantidade de gemas obtidas, sendo que a concentração de 1,0 mg/L de BAP demonstrou uma pequena vantagem em relação aos outros dois tratamentos (Tabelas 2 e 3). O regulador vegetal BAP é o mais utilizado por diversos autores para indução da organogênese na cultura do melão (*Cucumis melo* L.), sendo que as concentrações mais eficientes são geralmente baixas variando de 0,1 a 1,0 mg/L (Dirks & Van Buggenum, 1989; Tabei et al., 1991; Shetty et al., 1992; Singh et al., 1996). No processo organogênico desta cucurbitácea, Ficcadenti & Rotino (1995) utilizaram com sucesso, explantes de segmentos de cotilédone de plântulas germinadas *in vitro*, com 4 dias de idade, cultivados em meio contendo BAP, com ou sem a presença de ABA. Gemas adventícias foram obtidas a partir de segmentos de cotilédone de plântulas germinadas *in vitro*, em meio de cultura MS contendo a combinação BAP e NAA (Molina & Nuez, 1995; Ezura et al., 1997).

Tabela 2. Organogênese *in vitro* em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*). Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).

BAP (mg/L)	Cultivares	
	AF-522	Eldorado
0,00	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a
0,25	0,59 (7,37) b	0,69 (8,62) b
0,50	6,94 (86,75) c	6,97 (87,12) cd
0,75	7,18 (89,75) c	7,19 (89,87) cd
1,00	7,39 (92,37) c	7,79 (97,37) c
1,25	4,77 (59,62) d	6,18 (77,25) d
	CV = 12,14%	CV = 8,61%

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação

Tabela 3. Organogênese *in vitro* em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*). Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).

BAP (mg/L)	Cultivares		
	AF-522	Yellow Queen	Yellow King
0,00	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a
0,25	1,97 (24,62) b	1,24 (15,50) b	1,73 (21,62) b
0,50	6,97 (87,12) c	6,56 (82,20) c	6,98 (87,25) cd
0,75	7,39 (92,37) c	6,98 (87,25) c	6,9 (86,87) cd
1,00	7,59 (94,87) c	7,37 (92,12) c	7,59 (94,87) c
1,25	5,77 (72,12) c	5,98 (74,75) c	5,78 (72,12) d
	CV = 10,83%	CV = 10,17%	CV = 7,77%

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação

Figura 2. Organogênese *in vitro* a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) em meio de cultura MS suplementado com BAP(1,0mg/L). a. explante inicial. b-d. desenvolvimento inicial de gemas adventícias, após 20 dias de cultivo. e-f. crescimento de gemas, após 6 semanas de cultivo. g. alongamento das gemas adventícias em MS suplementado com BAP (0,2 mg/L), após duas semanas. h. gemas adventícias em fase de alongamento. i. plântula obtida, após 3 meses. Barras = 100µm (2c); 1mm (2b, 2d-f).

Nos experimentos realizados com explantes retirados de discos de folha observou-se uma alta porcentagem de contaminação. Este fato pode ser atribuído às plantas serem mantidas em casa-de-vegetação. No primeiro experimento pôde-se verificar uma baixa formação de gemas adventícias, com apenas 3 explantes responsivos (dados não apresentados). Contudo, no segundo e terceiro experimentos realizados, grande parte dos explantes introduzidos apresentaram respostas aos tratamentos, porém inferiores as respostas com segmentos de cotilédone (Tabelas 4 e 5). Pela análise estatística observou-se que concentrações na faixa de 0,5 mg/L a 1,0 mg/L foram mais eficientes na formação de gemas adventícias. Após a indução, pôde-se observar a formação de calos, com células soltas, não formando agregados, entretanto, gemas adventícias se formaram diretamente dos discos de folha, sendo que estas apareceram em pequenos grupos, diferentemente de gemas obtidas a partir de segmentos de cotilédone (Figuras 3a-d). Foi observado também a maioria das estruturas formadas não se desenvolveram, formando apenas uma massa de coloração esverdeada, semelhante a primórdios foliares mal formados. Na literatura, observou-se uma alta frequência na formação de gemas adventícias a partir de discos de folha de discos de melão, com regeneração de plantas (Kathal et al., 1988; Dirks & Van Buggenum, 1989; Tabei et al., 1991; Molina & Nuez, 1995). Esta diferença pode ser atribuída a utilização de variedades diferentes. Nos experimentos realizados utilizou-se o melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) enquanto que os trabalhos encontrados na literatura utilizando este tipo de explante, referem-se as variedades *cantaloupensis* e *reticulatus*.

A formação de gemas foi obtida nos dois tipos de explantes utilizados, no entanto, segmentos de cotilédone foram mais adequados na indução da organogênese *in vitro*, por apresentarem uma porcentagem de resposta maior. Além disso, explantes de discos de folha apresentaram uma taxa de contaminação muito elevada e as gemas obtidas não se desenvolveram em plantas completas.

Tabela 4. Organogênese *in vitro* em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de discos de folha de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), após 4 semanas. Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).

BAP (mg/L)	Cultivares		
	AF-522	Yellow Queen	Yellow King
0,0	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a
0,25	0,47 (5,87) b	0,47 (5,87) b	0,68 (8,50) b
0,50	1,53 (19,12) bc	2,31 (28,87) c	1,25 (15,62) b
0,75	2,31 (28,75) c	2,31 (28,87) c	1,54 (19,25) bc
1,0	3,06 (38,25) c	3,16 (39,50) c	3,14 (39,25) c
1,25	1,31 (16,37) bc	1,96 (24,50) c	2,14 (26,75) bc
	CV = 28,87%	CV = 24,71%	CV = 27,13%

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação.

Tabela 5. Organogênese *in vitro* em diferentes concentrações de BAP (mg/L), a partir de discos de folha de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), após 4 semanas. Média de 5 repetições, com 8 explantes cada (%).

BAP (mg/L)	Cultivares		
	AF-522	Yellow Queen	Yellow King
0,0	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a
0,25	0,16 (2,00) b	0,33 (4,12) b	0,47 (5,87) b
0,50	1,74 (21,75) c	1,44 (18,0) c	1,54 (19,25) bc
0,75	2,14 (26,75) c	1,61 (20,12) c	1,75 (21,87) bc
1,0	2,94 (36,75) c	3,77 (47,12) d	3,53 (44,12) c
1,25	1,61 (20,12) c	2,14 (26,75) cd	1,44 (18,0) bc
	CV = 22,21%	CV = 23,91%	CV = 31,67%

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação.

Figura 3. Organogênese *in vitro* a partir de discos de folha de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) em meio de cultura MS suplementado com BAP (1,0mg/L). a-b. formação inicial das gemas, após 2 semanas de cultivo. c-d. desenvolvimento e crescimento das gemas, após 4 semanas de cultivo *in vitro*. Barras = 1mm (3a-d).

Comparando-se o desenvolvimento das gemas adventícias nos três meios de cultura utilizados, pôde-se observar que inicialmente o meio de cultura mais eficiente, no alongamento das gemas foi o meio MS básico, suplementado com 0,2 mg/L de BAP (Figura 2g). As gemas subcultivadas em MS suplementado com BAP (0,2 mg/L) apresentaram um maior desenvolvimento, facilitando a sua individualização. No meio de cultura MS básico, sem regulador vegetal, as gemas cresceram muito lentamente, não se desenvolvendo em plântulas. O meio de cultura MS com 1,0 mg/L de ácido giberélico não permitiu o desenvolvimento das gemas adventícias. No entanto, pôde-se verificar que o MS + 0,2 mg/L de BAP mostrou-se eficiente no início do desenvolvimento das gemas, até serem separadas, não alongando as gemas, posteriormente. Portanto, após se desenvolverem em MS + 0,2 mg/L de BAP, as gemas foram transferidas em meio de cultura com 1,0 mg/L de ácido giberélico, permitindo o alongamento (Figura 2h). O alongamento das gemas obtidas foi conseguido por Dirks & Van Buggenum (1989) em meio de cultura MS básico sem regulador vegetal. Gemas adventícias foram alongadas em meio MS com uma concentração menor de BAP do que a utilizada no processo (Niedz et al., 1989; Singh et al., 1996). Para o alongamento das gemas, Kathal et al. (1988) utilizaram meio de cultura MS suplementado com 0,2 mg/L de BAP.

A transferência das gemas adventícias obtidas a partir de discos de folhas, para meio de cultura de alongamento (MS + 0,2 mg/L) não permitiu o crescimento e desenvolvimento das mesmas. Além de não crescerem as gemas apresentavam um amarelecimento, ao contrário do observado por Kathal et al. (1988), onde as gemas adventícias obtidas a partir de discos de folha alongaram com sucesso.

No experimento para determinar o número de plântulas obtidas por explante introduzido, pôde-se observar uma grande quantidade de gemas adventícias formadas, contudo verificou que nem todas as gemas obtidas no processo de indução alongam e se desenvolvem em plantas. O número de plântulas obtidas pode ser considerado baixo, se comparado com a

porcentagem de explantes responsivos, com a aparente formação de gemas adventícias. Verificou-se uma média de 2,5 plântulas formadas por explante (Tabela 6).

A aclimatização das plantas obtidas pela cultura de tecidos melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) tem que ser conduzida com cuidado. A transferência das plântulas enraizadas para casa-de-vegetação tem que ser lenta e gradual, para que a aclimatização seja obtida com sucesso (Figura 2i). As plântulas não podem ser muito umedecidas, pois o excesso de umidade provoca seu apodrecimento. Após 30 dias aproximadamente, as plantas foram colocadas definitivamente em condições *in vivo*, com a retirada dos plásticos dos vasos, mantendo-as em casa-de-vegetação.

Tabela 6. Organogênese *in vitro* em meio de cultura MS básico suplementado com BAP (1,0 mg/L), a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* var. *inodorus*). Cada repetição é constituída por 8 explantes.

Cultivares	n° explantes introduzidos/n° explantes responsivos	n° de plântulas obtidas*
Yellow King		
1	8/7	25
2	8/6	17
3	8/8	28
4	8/8	10
5	8/7	25
6	8/7	3
7	8/6	12
8	8/5	20
Média	8/6,75	17,50
Yellow Queen		
1	8/7	19
2	8/6	23
3	8/8	15
4	8/8	26
5	8/5	11
6	8/7	20
7	8/7	22
8	8/6	0
8	8/7	18
Média	8/7,62	19,25

* plântulas com aproximadamente 2 cm.

4.2 Embriogênese Somática

Os reguladores vegetais ácido indolacético, ácido naftaleno acético e 2,4 diclorofenoxiacético não foram eficientes na indução da embriogênese somática. Pôde-se verificar nos explantes, após 4 semanas, uma pequena formação de calo e abundante formação de raízes adventícias. Tabei et al.(1991) obtiveram embriões somáticos, utilizando o regulador vegetal 2,4-D, nas concentrações de 1 e 2 mg/L.

A combinação 2,4-D + BAP também foi ineficiente na indução da embriogênese somática. Pôde-se verificar nos explantes, após 4 e 6 semanas, uma abundante formação de calos esbranquiçados, de estrutura não compacta, além da formação de raízes adventícias. Homma et al. (1991) demonstram que 2,4-D (2 e 4 mg/L) associado ao BAP (0,1 mg/L) é eficiente na indução do processo de embriogênese somática. Entretanto, Gray et al. (1993) verificaram uma baixa formação de embriões somáticos, quando utilizaram a combinação 2,4-D + BAP. A combinação das auxinas 2,4-D e NAA mais a citocinina BAP foi eficiente na indução da embriogênese somática a partir de células em suspensão de segmentos de cotilédone germinados *in vitro*, porém havendo a formação de muitos embriões somáticos anormais (Kageyama et al.,1991).

Nos tratamentos com a combinação 2,4-D + TDZ, após duas semanas da indução, segmentos cultivados em meio MS, contendo doses de 2,5 a 10,0 mg/L de 2,4-D, acrescidos de 0,1 mg/L de TDZ, não apresentaram calos ou estruturas embriogênicas. Após duas semanas de cultivo, foi observada o início de formação de calo nos explantes (Figura 4a). Os calos apresentaram coloração amarelada, formando massas compactas de células, com estruturas globulares, semelhantes a proembrióides. Após 6 semanas, verificou-se o desenvolvimento dessas estruturas, com a formação dos embriões somáticos (Figuras 4b-c). Os calos formados nas doses de 2,5; 5,0 e 7,5 mg/L de 2,4-D

não apresentaram diferenças entre si, sendo que na dose 10,0 mg/L de 2,4-D observou-se uma baixa formação de calos e estruturas embriogênicas (Tabelas 7 e 8). A frequência de embriões somáticos desenvolvidos foi baixa. Em condições semelhantes de cultivo, Gray et al. (1993) e Gray (1996) obtiveram alta frequência de embriogênese somática com diferentes variedades de melão. Não foi observada também diferenças entre as doses 0,075; 0,10 e 0,125 mg/L de TDZ. Pôde-se observar que doses mais baixas (0,025 e 0,050 mg/L de TDZ) e mais elevada (0,15 mg/L) foram ineficientes na formação de embriões somáticos (Tabela 9). Gray et al. (1993) obtiveram resultados semelhantes, sendo que a concentração mais eficiente de TDZ foi de 0,075 mg/L, combinada com 5,0 mg/L de 2,4-D. Em melancia (*Citrullus lanatus*), Compton & Gray (1993) obtiveram um elevado número de embriões somáticos em meio de cultura contendo a combinação dos reguladores vegetais 2,4-D e TDZ, a partir do cultivo de segmentos de cotilédone. A combinação 2,4-D + TDZ tem sido utilizada com eficiência na indução da embriogênese somática em diversas espécies, como *Panax ginseng* (Ahn et al., 1996) e *Capsicum annuum* L. (Binzel et al., 1996).

A assincronia no desenvolvimento dos embriões somáticos pôde ser verificada nos tratamentos com 2,4-D e TDZ para melão amarelo. Diferentes estádios de desenvolvimento foram observados globular, coração, torpedo e cotiledonar. A formação simultânea de diferentes estádios de desenvolvimento tem sido observada em diversas espécies. Rodriguez & Wetzstein (1994) verificaram assincronia do desenvolvimento dos embriões somáticos em *Carya illinoensis*, formando vários estádios de desenvolvimento de embriões somáticos simultaneamente.

Com a transferência para meio de cultura básico, os embriões se desenvolveram, apresentando um crescimento lento (Figura 4d). A frequência de embriões somáticos desenvolvidos foi baixa. Após o desenvolvimento, os

embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura MS suplementado com 1,0 mg/L de ácido giberélico para germinação. Após duas semanas de incubação pôde-se observar que poucos embriões somáticos germinaram e converteram. Portanto a indução da embriogênese somática em melão da variedade *inodorus* tem se apresentado menos eficientes que a variedade *reticulatus* (Oridate et al., 1992; Gray et al., 1993). Os resultados obtidos com as cultivares de melão amarelo utilizadas demonstram uma porcentagem de explantes responsivos aos tratamentos com 2,4-D e TDZ. Entretanto o número embriões obtidos é pequeno. O desenvolvimento e germinação é difícil, com número reduzido de plântulas convertidas. Este fato pode ser atribuído a formação de embriões somáticos anormais. Kageyama et al. (1991) observou a presença de anormalidades em muitos dos embriões somáticos obtidos de melão. Estes embriões somáticos apresentavam mais que três cotilédones e possuíam o hipocótilo reduzido, enquanto que os embriões somáticos normais apresentavam dois cotilédones e hipocótilo longo. Embriões somáticos anormais de melão também foram descritos por Gray et al. (1993), apresentando ausência, fusão ou formação de mais de dois cotilédones e fusão de embriões.

A condição de cultivo mais favorável à formação e ao desenvolvimento dos embriões somáticos foi a manutenção dos explantes em ausência de luz por 6 semanas, havendo um maior número de embriões formados e melhor desenvolvimento dos mesmos (Tabela 10). Pela análise dos dados obtidos, pôde-se verificar que não houve interação significativa entre os tratamentos (efeito da luz/escuro X diferentes concentrações do regulador vegetal).

Tabela 7. Embriogênese somática a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), em meio de cultura básico MS suplementado com TDZ (0,1 mg/L) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 6 semanas. Média de 5 repetições, com 9 explantes cada (%).

2,4-D (mg/L)	Cultivares		
	AF-522	Yellow Queen	Yellow King
0,0	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a	0,0 (0,00) a
2,5	7,99 (88,78) b	7,98 (88,67) b	7,59 (84,33) b
5,0	8,38 (93,11) b	8,59 (95,44) b	8,39 (93,22) b
7,5	7,79 (86,55) b	7,39 (82,11) b	7,30 (81,11) b
10,0	2,31 (25,67) c	3,74 (41,56) c	3,11 (34,55) c
	CV = 12,29%	CV = 5,86%	CV = 7,1%

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação.

Tabela 8. Embriogênese somática a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), em meio de cultura básico MS suplementado com TDZ (0,1 mg/L) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 6 semanas. Média de 5 repetições, com 9 explantes cada (%).

2,4-D (mg/L)	Cultivares	
	Yellow Queen	Yellow King
0,0	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a
2,5	7,31 (81,22) b	7,47 (83,0) b
5,0	8,32 (92,44) b	8,49 (94,33) b
7,5	7,82 (86,89) b	7,63 (84,78) b
10,0	2,28 (25,33) c	2,65 (29,44) c
	CV = 6,86%	CV = 6,03%

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação.

Tabela 9. Embriogênese somática a partir de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), em meio de cultura MS básico suplementado com 2,4-D (5,0 mg/L) e diferentes concentrações de TDZ, após 6 semanas. Média de 5 repetições, com 9 explantes cada (%).

TDZ (mg/L)	Cultivares	
	Yellow King	Yellow Queen
0,00	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a
0,025	1,12 (12,44) b	1,74 (19,33) b
0,050	6,54 (72,67) c	6,97 (77,44) c
0,075	8,39 (93,22) c	8,38 (93,11) c
0,10	7,95 (88,33) c	8,19 (91,00) c
0,125	7,97 (88,55) c	6,97 (77,44) c
0,150	2,31 (25,67) c	2,60 (28,89) b
	CV = 15,86%	CV = 10,49%

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação.

Tabela 10. Média do número de embriões somáticos obtidos em melão (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), a partir de segmentos de cotilédone, em meio de cultura básico suplementado com TDZ (0,1mg/L) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 6 semanas. Média de 3 repetições, com 9 explantes cada (%).

2,4-D (mg/L)	Cultivares					
	Yellow King			Yellow Queen		
	Luz	Escuro	Média	Luz	Escuro	Média
0,0	0,0	0,0	0,0 a	0,0	0,0	0,0 a
2,5	7,23	15,15	10,84 b	5,41	8,42	6,84 b
5,0	12,78	35,41	22,72 c	7,28	18,63	12,33 c
7,5	5,19	20,12	11,49 b	7,23	15,3	10,91 bc
10,0	1,82	9,8	5,10 b	1,11	3,96	2,36 d
Média	6,17 a	19,07 b		4,87 a	10,80 b	

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

** CV = coeficiente de variação.

Figura 4. Embriogênese somática a partir de segmentos de cotilédones de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*), em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D (5,0mg/L) + TDZ (0,1mg/L). a. segmentos de cotilédone após duas semanas em meio de indução, mostrando expansão dos explantes e início da formação de calos. b-c. embriões somáticos no estágio globular, após 6 semanas de indução. d. embrião somático em meio de cultura MS básico, sob fotoperíodo de 16 horas de luz. Barras = 1mm (4a-d).

4.3 Análise Histológica com Microscopia Ótica

4.3.1 Organogênese *in vitro*

Nas análises realizadas em amostras do dia de inoculação, pôde-se verificar estruturas iniciais do explante introduzido, possibilitando o conhecimento do material antes da indução, podendo analisar e comparar suas posteriores modificações durante o processo morfogênico. Em avaliações da indução das gemas, em microscópio estereoscópio, observou-se a formação de células em uma região concentrada do explante, sendo que a região não responsiva apresenta apenas o crescimento do segmento de cotilédone. Nos cortes seriados de amostras com 7 dias de incubação, observou-se uma região não meristemática, com células com grandes vacúolos e a presença de pêlos absorventes na epiderme, indicando que nessa região não haveria a formação de gemas. Contudo, em outra parte do material observou-se a existência de uma região meristemática, indicando a desdiferenciação do tecido, ou seja, o início do começo da formação de gemas adventícias.

Durante este período, apesar dos inúmeros cortes realizados, houve grande dificuldade em se encontrar gemas adventícias. Em microscópio estereoscópio, era possível observar estruturas semelhantes a gemas adventícias, em todas direções do explante. No entanto, gemas adventícias foram difíceis de serem verificadas nos cortes histológicos, havendo uma presença intensa de protuberâncias, com células meristemáticas e não meristemáticas em toda região cortada (Figuras 5a-b).

Essa dificuldade também foi apresentada por Gaba et al.(1999). Em estudo da anatomia e histologia do melão cv. Galia regenerado *in vitro* através da organogênese a partir de segmentos de cotilédone de plântulas germinadas *in vitro* com 3 dias de idade. Gaba et al. (1999) relataram que existem muitos

trabalhos, na literatura, sobre a organogênese *in vitro* do melão, com a formação de uma grande quantidade de gemas adventícias (30-50), mas este grande número de gemas produzem um número muito pequeno de plântulas (2-4). Com a finalidade de elucidar este problema, os autores iniciaram o estudo da anatomia e morfologia do processo organogênico do melão, sendo que na literatura não existem relatos sobre este tipo de estudo em cucurbitáceas. Após 15 dias da indução, eles observaram muitas protuberâncias e pequenas folhas, sem a presença de gemas adventícias. A primeira gema foi histologicamente encontrada somente após 22 dias da indução, sendo um caso praticamente isolado. Portanto, constataram que a produção de protuberâncias e folhas é um fenômeno comum em melão, por isso grande parte das estruturas, não se desenvolvem em plantas.

Após a realização de muitos cortes seriados em diversos blocos, pode-se observar uma região meristemática, indicando a desdiferenciação do tecido, com a formação de pequenas estruturas, após 20 dias da introdução do material. Estas estruturas foram descritas por Gaba et al. (1999), denominando-as de protuberâncias. As protuberâncias apresentam células meristemáticas e não meristemáticas (Figuras 6a-c). Pôde-se observar também uma região meristemática bifurcada também descrita por Gaba et al. (1999) (Figura 6d).

Após 20 dias da indução, juntamente com essas protuberâncias pôde-se observar estruturas semelhantes a gemas adventícias, com um ápice caulinar e dois cotilédones formados. Estas estruturas apresentam a presença de tricomas e uma protoderme bem definida, caracterizando-se como uma gema adventícia (Figuras 6e-g).

A análise histológica das estruturas obtidas a partir de discos de folha permitiu verificar a presença de regiões meristemáticas e protuberâncias com a presença de tricomas, mas nada que se assemelhasse a uma gema adventícia. Este fato pode explicar a possível causa pela qual as gemas obtidas não se

desenvolveram, ou seja, estas estruturas não apresentam um meristema caulinar, não podendo se converter em plantas (Figuras 6h-i).

A formação de primórdios foliares sem a presença de gemas não tem sido relatado com frequência em cultura de tecidos (Gaba et al.1999). Bowes (1976) verifica primórdios foliares sem o desenvolvimento do meristema apical caulinar em *Taraxacum officinale*.

4.3.2 Embriogênese somática

A fim de observar o processo de formação de embriões somáticos foram realizados cortes seriados em diferentes fases de desenvolvimento, acompanhando-se as modificações durante o processo morfogênico. Analisando o embriões somáticos, pôde-se observar uma protoderme bem definida, que daria origem à epiderme. O procâmbio também é evidente, neste estágio de desenvolvimento, apresentando um sistema vascular fechado, característico na embriogênese somática. Pela análise histológica, pôde-se verificar embriões mal formados, não apresentando um desenvolvimento completo, havendo a formação dos dois cotilédones, mas sem a formação do ápice caulinar e radicular, fato que impediria o desenvolvimento e germinação do embrião (Figuras 7a-e). Pôde-se observar também outras anormalidades no desenvolvimento dos embriões somáticos como a fusão de dois embriões (Figura 7f). As anormalidades encontradas nos embriões somáticos de melão amarelo podem explicar a baixa conversão em plântulas. O desenvolvimento do ápice caulinar pode ocorrer após o desenvolvimento dos cotilédones (Cutter, 1971), porém o desenvolvimento e a germinação desses embriões raramente são observados. Muitos embriões somáticos não possuem um meristema caulinar organizado, assim como vascularização precoce ou anormalidades nos cotilédones, como ausência, excesso ou fusão, podem impedir seu crescimento

e desenvolvimento (Nickle & Yeung, 1993; Yeng, 1999). Em *Vitis vinifera* L., a baixa conversão em plântulas pode ser devido a germinação precoce dos embriões somáticos, havendo anormalidades estruturais e funcionais do meristema caulinar (Faure et al., 1996). Padmanabhan et al. (1998) atribuíram às anormalidades encontradas no desenvolvimento dos embriões somáticos, a razão da não conversão dos embriões somáticos de *Ipomoea batatas* (L.) Lam em plântulas. A baixa porcentagem de plântulas obtidas de *Picea glauca* (Moench) Voss foi provavelmente ocasionada pela formação anormal do meristema caulinar ou falta de desenvolvimento durante o processo de germinação dos embriões somáticos, havendo a formação de espaços intercelulares no meristema caulinar, fato este que indica sua desorganização (Kong & Yeng, 1992).

Rodriguez & Wetzstein (1994; 1998) relataram a formação de embriões somáticos em *Carya illinoensis* com diferenças na morfologia dos cotilédones e ápice caulinar ausente ou reduzido, quando os embriões foram induzidos em meio de cultura com 2,4-D. Concentrações elevadas de auxina no meio de cultura ou no próprio tecido podem alterar a síntese e distribuição de auxina nos embriões somáticos, podendo ocasionar alterações morfológicas (Rodriguez & Wetzstein, 1998). Apesar de auxinas serem necessárias para a indução da embriogênese somática, podem ser inibitórias para o desenvolvimento do embrião somático (Bewley & Black, 1994)

4.4 Análise Morfológica com Microscopia Eletrônica de Varredura

Após duas semanas de cultivo em meio de cultura suplementado com 1,0 mg/L de BAP pôde-se observar o desenvolvimento de gemas adventícias em segmentos de cotilédone de melão apresentando formação de gemas

adventícias. Pode-se verificar intensa formação de gemas, principalmente nas extremidades dos explantes (Figuras 8a-b). Áreas meristemáticas e primórdios foliares foram observados nos estágios mais iniciais da organogênese *in vitro*. Gemas adventícias após 4 semanas da indução, apresentaram primórdios foliares com intensa presença de tricomas (Figura 8c-d).

Quanto a embriogênese somática pôde-se verificar a formação de massas compactas de células e embriões somáticos normais, no estágio cotiledonar, com a presença dos dois cotilédones e o hipocótilo bem desenvolvido (longo) (Figura 9b). Anormalidades como fusão de dois embriões somáticos também pode ser observada no processo embriogênico de melão (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) (Figura 9a). Assim como observado em microscópio de varredura, Kageyama et al. (1991) relataram a formação de embriões somáticos bem formados, com um hipocótilo longo e embriões somáticos anormais, com hipocótilo reduzido ou fusão de embriões.

Figura 5. Organogênese *in vitro* a partir de segmentos de cotilédone de sementes maduras, cultivados em meio de cultura suplementado com BAP (1,0mg/L), após 20 dias de indução. a. formação e desenvolvimento de gemas adventícias. b. corte histológico mostrando uma alta presença de áreas meristemáticas e protuberâncias. Barras = 200 μ m (5b); 1000mm (5a).

Figura 6. Análise histológica da organogênese *in vitro* a partir de segmentos de cotilédone de sementes maduras (a-g) e discos de folha (h-i), cultivados em meio de cultura MS suplementado com BAP (1,0 mg/L), após 20 dias da indução. a-c. protuberâncias com formação de áreas meristemáticas (ponta de seta). d. protuberância com região meristemática bifurcada (seta). e-g. estruturas semelhantes a gemas adventícias, com meristema caulinar (mc), primórdios foliares (pf) e tricomas (tr). h-i. formação de protuberâncias com protoderme definida (ponta de seta) e tricomas (tr). Barras = 100µm (6a-c, 6e, 6g); 200µm (6d, 6h-i).

Figura 7. Análise histológica da embriogênese somática de segmentos de cotilédone de sementes maduras, cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D (5,0 mg/L) + TDZ (0,1 mg/L), por microscopia ótica. a-e. cortes histológicos mostrando embriões somáticos com diferenças morfológicas, com procâmbio (pc), protoderme (pd), mas sem meristema caulinar, com exceção da Figura 6a que apresenta meristema caulinar. f. embriões somáticos fundidos. Barras = 200µm (7a-f).

Figura 8. Análise morfológica em microscópio eletrônico de varredura da organogênese pelo cultivo *in vitro* de segmentos de cotilédone em meio de cultura MS básico suplementado com BAP (1,0mg/L). a-b. estágio inicial de formação de gemas adventícias, após duas semanas de indução. c-d. intensa formação de gemas adventícias, após 4 semanas de indução. Barras = 1mm (8a-d).

Figura 9. Análise morfológica em microscópio eletrônico de varredura da embriogênese somática pelo cultivo *in vitro* de segmentos de cotilédone em meio de cultura MS básico suplementado com 2,4-D (5,0 mg/L) + TDZ (0,1mg/L). a. fusão de embriões somáticos. b. embrião somático normal com hipocótilo (hc) longo e dois cotilédones (co) bem desenvolvidos. Barras = 200 μ m (9a); 1mm (9b).

5 CONCLUSÕES

O trabalho constou na indução da organogênese *in vitro* pelo cultivo *in vitro* de segmentos de cotilédone e discos de folha e embriogênese somática pelo cultivo *in vitro* de segmentos de cotilédone de melão amarelo (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudin).

Na indução da organogênese *in vitro*, dos reguladores vegetais testados, somente o BAP foi eficiente para o processo. Protocolos de regeneração de plantas foram obtidos com eficiência em segmentos de cotilédone em meio de cultura suplementado com BAP. As melhores concentrações de BAP foram de 0,5 mg/L, 0,75 mg/L e 1,0 mg/L. As gemas adventícias obtidas, alongaram e desenvolveram em plântulas. Pelos cortes histológicos realizados pôde-se observar a formação de muitas protuberâncias e primórdios foliares, sem a formação de ápice meristemático caulinar, sendo observada a presença de poucas gemas adventícias. Este fato pode explicar a razão pelo qual apesar de uma intensa formação de estruturas semelhantes a gemas adventícias, poucas plântulas se desenvolvem.

Gemas adventícias também foram obtidas a partir de discos de folha, com as concentrações mais eficientes de 0,5 mg/L, 0,75 mg/L e 1,0 mg/L de BAP. No entanto, a resposta organogênica foi bem inferior se comparada à resposta de segmentos de cotilédone. As gemas obtidas não se desenvolveram. Em cortes histológicos desse material, pôde-se verificar a formação de protuberâncias, sem a formação de gemas adventícias. Pôde-se

verificar também que a taxa de contaminação desse tipo de explantes foi muito elevada. Portanto, pode-se concluir que discos de folha de melão amarelo não foram eficientes no processo de regeneração de plantas *in vitro*.

Na indução da embriogênese somática, apenas a combinação 2,4-D + TDZ foi eficiente. Os tratamentos mais eficientes foram de 2,5 mg/L, 5,0 mg/L e 7,5 mg/L de 2,4-D + 0,1 mg/L de TDZ. Contudo, apesar de uma alta taxa de explantes responsivos, poucos embriões somáticos foram formados. A manutenção dos embriões somáticos no escuro por um período de 6 semanas foi mais favorável formação e desenvolvimento dos mesmos. A conversão dos embriões somáticos em plântulas foi baixa. O estudo histológico verificou a formação de embriões somáticos anormais, sem a presença de ápices meristemáticos.

O trabalho desenvolvido permitiu o estabelecimento de protocolos de regeneração de plantas *in vitro* que podem ser utilizados, no futuro, em trabalhos de transformação genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, I.O.; BUI, V.L.; GENDY, C.; TRAN, T.V.K. Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.237-243, 1996.
- ALVES, A.C. Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Piracicaba, 1999. 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade São Paulo.
- AYUB, R.; GUIS, M.; BEN-AMOR, M.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J.P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.P. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v.14, p.862-866, 1996.
- BERNARDI, J.B.; MENDONÇA, N.T. Instruções para a cultura do melão. In: CURSO DE PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS E FRUTEIRAS SOB IRRIGAÇÃO. Petrolina, 1971. Petrolina: FAMESP, 1971. 14p.
- BINZEL, M.L.; SANKHLA, L.A.; JOSHI, S.; SANKHLA, D. Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Cell Reports**, v.15, p.536-540, 1996.

- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds** - Physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BLEONROTH, E.W. Determinação do ponto de colheita. In: GORGATTI NETTO, A.; GAYET, J.P. **Melão para exportação**: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA; SPI, 1994. p.11-21.
- BORREGO, J.V.M. Calendarios de producción en melon. In: VALLESPÍR, A.N. (Ed) **Melones**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1997. p.51-58.
- BOUQUIN, T.; LASSERE, E.; PRADIER, J.; PECH, J.; BALAGUÉ, C. Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-AC01 occurs via two direct and independent transduction pathways. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.1029-1035, 1997.
- BOWES, B.G. Polar regeneration in excised roots of *Taraxacum officinale* Weber: a light and electron microscopy study. **Annals of Botany**, v.40, p.423-432, 1976.
- CHEE, P.P. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. **HortScience**, v.25, p.792-793, 1990.
- CHEE, P.P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash *Cucurbita pepo* L. cv YC 60. **Plant Cell Reports**, v.9, p.620-622, 1991.
- CHEE, P.P. Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* 'Topmark'. **HortScience**, v.26, p.908-910, 1991.

- COMPTON, M.E.; GRAY,D.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of watermelon. **Plant Cell Reports**, v.12, p.61-65, 1993.
- CUTTER, E.G. **Plant anatomy**. Part II. Organs. London: Edward Arnold, 1971. 336p.
- DEBEAUJON, I.; BRANCHAR. D. Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Reports**, v.12, p.37-40, 1992.
- DELEULOFEU, C.; TORRES, J.M.; MORAN, W.; AL-NIMA, J.; BINGHAM, A.; SALLIT, F. Melones en Europa y en el mundo. **Horticultura**, v.142, p.24-33, 2000.
- DIRKS, R.; VAN BUGGENUM, M. In vitro plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, v.7, p.626-627, 1989.
- DONG, J.Z.; YANG, M.Z.; JIA, S.R.; CHUA, N.H. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. **Bio/Technology**, v.9, p.858-863, 1991.
- DUSI, A.N. Diagnóstico da cultura do melão. **Horticultura Brasileira**, v.9, p.101, 1991.

DUSI, A.N. **Melão para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília, DENACOOOP, 1992. 37p.

EZURA, H.; AMAGAI, H.; YOSHIOKA, K.; OOSAWA, K. Highly frequent appearance of tetraploid in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Science**, v.85, p.209-213, 1992.

EZURA, H.; KIKUTA, I.; OOSAWA, K. Long-term ploidy stability of shoot primordium cultures and produced plants of melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.48, p.31-35, 1997.

FANG, G.; GRUMET, R. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. **Plant Cell Reports**, v.9, p.160-164, 1990.

FAO PRODUCTION YEARBOOK - 1998, v.52, p.145, 1999.

FAURE, O.; AARROUF, J.; NOUGARÈDE, A. Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): embryonic organogenesis. **Annals of Botany**, v.78, p.29-37, 1996.

FERNANDO, J.A. Estudos anatômicos da embriogênese somática *in vitro* em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba, 1999. 59p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo.

FERREIRA, A.F.; PEDROSA, J.F.; ALVARENGA, M.A. R. Melão: cultivares e métodos culturais. **Informe Agropecuário**, v.8, p.26-28, 1982.

FICCANDENTI, N.; ROTINO, G.L. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, p.293-295, 1995.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura**: cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1981. 336p.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2000**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 1999. p.410-415.

GABA, V.; SCHLARMAN, E.; ELMAN, C.; SAGEE, O.; WATAD, A.A.; GRAY, D.J. *In vitro* studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.35, p.1-7, 1999.

GONSALVES, C.; XUE, B.; YEPES, M.; FUCHS, M. LING, K.; NAMBA, S. Transferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.119, p.345-355, 1994.

GRAY, D.J. Somatic embryogenesis from seeds of melon. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. **Plant tissue culture concepts and laboratory**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.161-166.

- GRAY, D.J.; McCOLLEY, D.W.; COMPTON, M.E. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.118, p.425-432, 1993.
- GUILLAMÓN, M.A.G.; FLORES, R.C.; GONZÁLEZ-FERNANDEZ, J.J. El melón en invernadero. In: VALLESPÍR, A.N. (Ed) **Melones**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1997. p.67-77.
- GUIS, M.; BOTONDI, R.; MOHAMED, B.A.; AYUB, R.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C.; LATCHÉ, M. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing antisense ACC oxidase transgene. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.122, p.748-751, 1997.
- HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v.28, p.74-81, 1978.
- HOMMA, Y.; SUGIYAMA, K.; OOSAWA, K. Improvement in production and regeneration of somatic embryos from mature seed of melon (*Cucumis melo* L.) on solid media. **Japanese Journal of Breeding**, v.41, p.543-551, 1991.
- KAGEYAMA, K.; YABE, K.; MIYAJIMA, S. Somatic embryogenesis in suspension culture of mature seed of *Cucumis melo* L. **Japanese Journal of Breeding**, v.41, p.273-278, 1991.

- KATHAL, R.; BHATNAGAR, S.P.; BHOJWANI, S.S. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa Sharbati. **Plant Cell Reports**, v.7, p.449-451, 1988.
- KONG, L.; YENG, E.C. Development of spruce somatic embryos: II. continual shoot meristem development during germination. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.28, p.125-131, 1992.
- LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10, p.197-208, 1987.
- MAKISHIMA, N. Situação das cucurbitáceas no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.9, p. 99-100, 1991.
- MAROTO, J.V., Botánica, fisiología y Adaptabilidad del melon. In: Carbonell, S.A. (Ed) **Cultivo del melon**. Valencia: Fundación Cultural y de Promoción Social Caja Rural Valencia, 1995. p.13-17.
- MATSUMOTO, T.K.; WEBB, D.T.; KUEHNLE, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, p.404-407, 1996.
- MOLINA, R.V.; NUEZ, F. Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, v.15, p.129-132, 1995.

MORENO, V.; GARCIA-SOGO, M.; GRANELL, I.; GARCIA-SOGO, B.; ROIG, L.A. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L., cv "Amarelo Oro"). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.5, p.139-146, 1985.

MUKHOPADHYAY, A.; ARUMUGAM, N.; NANDAKUMAR, P.B.A.; PRADHAN, A.K. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.11, p.506-513, 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NICKE, T.C.; YEUNG, E.C. Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). **American Journal of Botany**, v.80, p.1284-1291, 1993.

NID MELÃO 1.0 - COMPLETO (Software), 1994.

NIEDZ, R.; SMITH, S.; DUNBAR, C.; STEPHENS, C.; HARRY, H. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.18, p.313-319, 1989.

OGAWA, R.; ISHIKAWA, M.; NIWATA, E.; OOSAWA, K. Cryopreservation of shoot primordia cultures of melon using a slow prefreezing procedure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.171-177, 1997.

OLIVEIRA, R. Melão da caatinga: exportação recorde rende US\$ 30 milhões. **Folha de São Paulo. Agrofolha**, São Paulo, 24 de nov. 1998. p.1.

ORIDATE, T.; OOSAWA, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). **Japanese Journal of Breeding**, v.36, p.424-428, 1986.

ORIDATE, T.; ATSUMI, H.; ITO, S.; ARAKI, H. Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.27-30, 1992.

PADMANABHAN, K.; CANTLIFFE, D.J.; HARRELL, R.C.; MCCONNELL, D.B. A compararison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato [*pomoea batatas* (L.) Lam.] using computer vision and histological analyses. **Plant Cell Reports**, v.17, p.685-692, 1998.

PASCUAL, J.L.P. Material vegetal y semilleros en melon. In: Carbonell, S.A. (Ed) **Cultivo del melon**. Valencia: Fundación Cultural y de Promoción Social Caja Rural Valencia, 1995. p.19-28.

PUNJA, Z.K.; TANG, F.A.; SARMENTO, G.G. Isolation, Culture and regeneration from cotyledon and mesophyll protoplasts of two pickling cucumber (*Cucumis sativus* L.) genotypes. **Plant Cell Reports**, v.9, p.61-64, 1990.

RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo tissue cultures of soybeans. **Plant Cell Reports**, v.13, p.607-611, 1994.

- RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v.204, p.71-83, 1998.
- SANGWAN, R.S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; VASSEUR, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.188, p.439-456, 1992.
- SARAVITZ, C.H.; BLAZICH, F.A.; AMERSON, H.V. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of fraser fir. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.118, p.163-167, 1993.
- SHETTY, K.; SHETTY, G.A.; NAKAZAKI, Y.; YOSHIOKA, K. Stimulation of benzyladenine-induced *in vitro* shoot organogenesis in *Cucumis melo* L. by proline, salicylic acid and aspirin. **Plant Science**, v.84, p.193-199, 1992.
- SINGH, M.N. *In vitro* production of plants from cotyledon explants of *Cucumis melo* L. and their successful transfer to field. **Phytomorphology**, v.46, p.395-402, 1996.
- SOUZA, M.C.; MENEZES, J.B.; ALVES, R.E. Tecnologia de pós-colheita e produção de melão no estado do Rio Grande do Norte. **Horticultura Brasileira**, v.12, p.188-190, 1994.

SRIVASTAVA, D.R.; ANDRIANOV, V.M.; PIRUZYAN, E.S. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schard cv melitopolski). **Plant Cell Reports**, v.8, p.300-302, 1989.

TABEI, Y.; KANNO, T.; NISHIO, T. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, v.10, p.225-229, 1991.

TRANI, P.E.; PASSOS, F.A.; MELO, A.M.T.; SCIVITTARO, W.B.; NAGAI, H. **Melão e melancia**. Campinas: IAC, 1996. 181p. (Boletim Técnico, 100).

VALLÉS, M.P.; LASA, J.M. Agrobacterium-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L. cv Amarillo Oro). **Plant Cell Reports**, v.13, p.145-148, 1994.

WHITAKER, T.W.; DAVIS, G.N. **Cucurbits**. London: Leonard Hill, 1962. 250p.

WILMINK, A.; VEN, B.C.E.V.D; CUSTERS, J.B.M.; NÖLLEN, Y.; DONS, J.J.M. Adventitious shoot formation in tulip: histological analysis and response to selective agents. **Plant Science**, v.110, p. 155-164, 1995.

YENG, E.C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems- some practical comments. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.35, 137-143, 1999.

YOSHIOKA, K.; HANADA, K.; NAKAZAKI, Y.; MINOBE, Y.; YAKUWA, T. Successful transfer of cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. **Japanese Journal Breeding**, v.42, p.277-285, 1992.