UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado

Trabalho Acadêmico

Regeneração *in vitro* de Melão (*Cucumis melo* L.) cultivar Gaúcho

Marcelo Nogueira do Amaral

Pelotas, 2013

MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE MELÃO (*Cucumis melo* L.) CULTIVAR GAÚCHO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisitado parcial à obtenção do título de Ciências Biológicas - Bacharelado.

Orientador: José Antonio Peters
Co-Orientador: Fabiana Roos Nora

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A435r Amaral, Marcelo Nogueira do

Regeneração in vitro de Melão (*Cucumis melo* L.) cultivar Gaúcho / Marcelo Nogueira do Amaral. – 43f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador José Antonio Peters ; co-orientador Fabiana Roos Nora.

1.Biologia. 2.Melão gaúcho. 3.*Cucumis melo*. 4.Ápice radicular. 5.Embriogênese somática. 6. Nó cotiledonar. 7. Organogênese direta. I.Peters, José Antonio. II.Nora, Fabiana Roos. III.Título.

CDD: 635.6117

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Peters

Profa. Dra. Luciana Bicca Dode

Dra. Daiane de Pinho Benemann

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a minha família pelo apoio incondicional, por sempre me incentivarem, mesmo nos momentos mais difíceis. Sem vocês eu nunca teria conseguido. Muito obrigado!

Agradeço ao meu orientador, José Antonio Peters, por ter aceitado me orientar, por sempre estar disposto a me ajudar, pelos ensinamentos e conselhos, puxões de orelha e cobranças. E principalmente pela orientação e por ser o exemplo de profissional que pretendo me tornar.

À minha co-orientadora, Fabiana Roos Nora, pelos ensinamentos, dedicação, conselhos, e conversas. Por ter me dado oportunidade de estágio, pois através dele pude conhecer como é trabalhar com pesquisa.

À Lílian Francescatto Pereira, pela amizade, carinho e amor. Por estar do meu lado em todos os momentos, me apoiando, incentivando e aturando meus momentos de mau humor. Tua ajuda, mesmo que indireta, foi essencial para a realização desse trabalho e agradeço todos os dias por te ter ao meu lado me fazendo feliz.

Aos amigos que fiz durante graduação e certamente levarei por toda minha vida: Alexandre, Darlan, Gabriel, Dieguito, Yuri, Nathi, Ethi e Brescia. Muito obrigado pelos momentos de lazer, pelas conversas, pelos cafezinhos no horário do meio dia e principalmente pela amizade.

Aos Professores Luciano Pinto e Luciana Dode, muito obrigado por me acolherem no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pelos ensinamentos e amizade. Com certeza vocês possuem grande parcela na minha formação acadêmica e científica. E também aos colegas de Laboratório pelo convívio e ajuda.

Aos amigos da turma, pelos momentos alegres, pelas festas que fizemos juntos e pelas horas de estudo. Temos muitas histórias pra contar.

Aos professores Luciana Bicca Dode e Luciano da Silva Pinto, e à Pós-doutoranda Daiane de Pinho Benemann por aceitarem fazer parte da minha banca.

À professora Juliana Fernando pela ajuda, principalmente na parte de anatomia, e pela amizade. Muito obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS, processo nº 09513760, pela bolsa de iniciação científica.

Resumo

AMARAL, Marcelo Nogueira do; **Regeneração *in vitro* de melão (*Cucumis melo* L.) cultivar Gaúcho.** 2013. 43f. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma das espécies de maior importância econômica dentro da família Cucurbitaceae, entretanto perdas comerciais ocorrem devido às doenças e principalmente pela rápida deterioração do fruto. O uso de técnicas moleculares possibilita a introdução de características agronômicas desejáveis, porém a dificuldade na regeneração de plantas geneticamente modificadas é um obstáculo para utilização desta tecnologia. Para cultivar Gaúcho, o uso de cotilédones demonstrou um baixo índice de plantas que chegam ao seu desenvolvimento adulto, tornando-se necessário a obtenção de outros explantes e outros métodos de regeneração, dentre eles o uso de nós cotiledonares e da embriogênese somática, respectivamente. Portanto este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração para melão cv. Gaúcho. Para organogênese direta sementes foram germinadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP e, após sete dias, nós cotiledonares foram inoculados em meio MS contendo BAP e ABA. Após trinta dias, removeu-se a brotação apical dos explantes e estes foram mantidos por mais 15 dias no mesmo meio. Para indução de calos embriogênicos, ápices radiculares, oriundos de sementes germinadas por cinco dias em meio MS, foram cultivados em MS adicionado de 2,4-D e BAP. Após quatro semanas, os calos foram repicados para meio MS livre de reguladores de crescimento para o desenvolvimento de embriões. Para organogênese, a utilização de 1,0mg. L^{-1} de BAP na germinação e 0,5mg. L^{-1} de BAP (T8) na regeneração e diferenciação de nós cotiledonares foi significativamente melhor quando comparado aos demais tratamentos (5,5 brotos/explante). Para embriogênese somática, os tratamentos contendo 0,5mg.L^{-1} de BAP e 0,5mg.L^{-1} de 2,4-D (T7), e 0,5mg.L^{-1} de BAP e 1,0mg.L^{-1} de 2,4-D (T8) apresentaram maior porcentagem de formação de calos (100%), porém após duas e quatro semanas em meio MS para desenvolvimento de embriões, nenhum dos calos oriundos dos tratamentos testados foi capaz de originar embriões somáticos.

Palavras-chave: Ápice radicular. Embriogênese somática. Nó cotiledonar. Organogênese direta.

Abstract

AMARAL, Marcelo Nogueira do; **Regeneração *in vitro* de melão (*Cucumis melo* L.) cultivar Gaúcho.** 2013. 43f. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Melon (*Cucumis melo* L.) is one of the species of major economic importance within the Curcubitaceae family, although commercial losses occur due to diseases and specially to the rapid deterioration of their fruits. The use of molecular techniques allows the introduction of desirable agronomic features, however the difficulties of genetically modified plant regeneration are an obstacle for the use of this technology. To the Gaúcho cultivar, the use of cotyledons showed a low index of plants reaching their adult development, becoming necessary to obtain other explants and regeneration methods, such as cotyledonary nodes and somatic embryogenesis, respectively. Therefore this work has the objective of developing an efficient regeneration protocol for melon cultivar Gaúcho. To direct organogenesis, seeds were germinated in MS medium containing different concentrations of BAP and, after seven days, cotyledonary nodes were inoculated in MS medium containing BAP and ABA. After thirty days, the apical shoots were removed from the explants, which were maintained for further 15 days in the same medium. To induction of embryogenic callus, root tips, from seeds germinated for five days in MS medium, were cultivated in MS added of 2,4-D and BAP. After four weeks, the callus were transferred to MS medium free from growth regulators for embryos development. To organogenesis, the uses of 1,0mg.L^{-1} of BAP during germination and 0,5 mg.L^{-1} of BAP (T8) in the regeneration and differentiation of cotyledonary nodes was significantly better when compared to the others treatments (5,5 shoots/explant). To somatic embryogenesis, the treatments containing 0,5mg.L^{-1} of BAP and 0,5mg.L^{-1} of 2,4-D (T7), and 0,5mg.L^{-1} of BAP and 1,0mg.L^{-1} of 2,4-D (T8) showed higher percentage of callus formation (100%), although after two and four weeks in MS medium for embryos development, none of the callus from the treatments tested were able to produce somatic embryos.

Keywords: Root tips. Somatic embryogenesis. Cotyledonary node. Direct organogenesis.

Lista de Figuras

Figura 1 - Multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos utilizando-se nós cotiledonares de melão cv Gaúcho. A-G= explantes com 30 dias, primeira avaliação. A: T4; B: T5; C: T6; D: T10; E: T7; F: T11; G: T12. T= Tratamentos. A a G (Barra 1cm). 26

Figura 2 - Multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos a partir de nós cotiledonares de melão cv. Gaúcho. A-D= explantes com 45 dias, segunda avaliação. A: T7; B: T8; C: T9; D: T11. T= Tratamentos. A a D (Barra 1cm). 28

Figura 3 - Gema (seta) formada diretamente no explante (Ex) oriundo do tratamento T8 (1,0mg.L^{-1} BAP na germinação e, 0,5mg.L^{-1} BAP e 0,3mg.L^{-1} ABA no meio de regeneração) após 5 dias do corte da dominância apical . Barra = 200µm. 30

Figura 4 - A – Explante após 20 dias em meio de alongamento e enraizamento; B – Explante após 13 dias em meio de alongamento e enraizamento; C – Plantas aclimatadas em recipientes contendo terra e vermiculita. Barra = 1 cm. 30

Figura 5 - Ápices radiculares cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de auxina e citocinina. A-E: Sem adição de auxina e 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.L-1 de BAP, respectivamente. F-I: Concentração fixa de 0,5mg.L-1 de BAP adicionado de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.L^{-1} de 2,4-D, respectivamente. 33

Figura 6 - Porcentagens de calos por tratamento utilizado. No eixo Y a porcentagem de calos formados e no eixo X as concentrações

de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.L^{-1}), e uma concentração fixa de BAP: A – 0,0mg.L^{-1}; B - 0,5mg.L^{-1}; C - 1,0mg.L^{-1}; D - 1,5mg.L^{-1}; E - 2,0mg.L^{-1}..... 34

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tratamentos realizados no processo de multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos a partir de nós cotiledonares de melão cv. Gaúcho 20

Tabela 2 - Protocolos testados na obtenção de embriões somáticos em *Cucumis melo* cv. Gaúcho 22

Tabela 3 - Tratamentos utilizados na indução de calos e embriões somáticos em melão cv. Gaúcho 23

Tabela 4 - Número médio de brotos por explantes de acordo com as diferentes concentrações de hormônio BAP nos meios de germinação e regeneração. Utilizou-se Teste de Duncan ao nível de 1% de significância 29

Tabela 5 – Porcentagem de formação de calos de acordo com as diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de indução de calos embriogênicos..... 31

Lista de Abreviaturas

2-Isopentenil adenina- 2iP

2,4-Diclorofenoxiacético - 2,4-D

6-Benzilaminopurina - BAP

Ácido abscísico - ABA

Ácido Indolilacético - AIA

Ácido Naftalenoacético - ANA

Cinetina - CIN

Meio Murashige e Skoog - MS

Thidiazuron - TDZ

Sumário

1 Introdução 11
1.1 Objetivos 13
1.1.1 Objetivos específicos 13

2 Revisão bibliográfica 14
2.1 Organogênese 14
2.2 Embriogênese somática 16

3 Material e Métodos 20
3.1 Regeneração de plantas a partir de nós cotiledonares 20
3.1.1 Material Vegetal 20
3.1.2 Indução de brotos 21
3.1.3 Enraizamento, alongamento e climatização 21
3.1.4 Análise histológica 21
3.1.5 Análise estatística 21
3.2 Embriogênese somática a partir de ápices radiculares 22
3.2.1 Material Vegetal 22
3.2.2 Indução de calos e embriões somáticos 22
3.2.3 Desenvolvimento de embriões somáticos 24
3.2.4 Análise estatística 24

4 Resultados e discussão 25
4.1 Organogênese direta a partir de nós cotiledonares 25
4.1 Embriogênese somática a partir de ápices radiculares 31

5. Conclusões 36
5.1 Organogênese direta a partir de nós cotiledonares 36
5.2 Embriogênese somática a partir de ápices radiculares 36

Referências 37

1 Introdução

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma planta anual, de hábito herbáceo, de hastes trepadoras com presença de gavinhas e folhas pecioladas, grandes, pilosas e com 3 a 5 lobos. É razoavelmente rico em vitaminas, possui propriedades estimulantes, diuréticas e laxativas (GAYET, 2003). É amplamente cultivado em regiões tropicais e representa uma das espécies de maior importância econômica dentro da família Cucurbitaceae (SOUZA et al., 2006). No Brasil, a região Nordeste é a maior produtora, seguida pelo Rio Grande do Sul que apresenta uma produção de 14.586 toneladas e 2.392ha de área colhida, sendo o extremo sul responsável por cerca de 85% da produção total do Estado (AGRIANUAL, 2008). Entretanto, perdas comerciais ocorrem pela presença de doenças na cultura (JARL; BOKELMANN; DE HAAS, 1995) e, principalmente, pela rápida deterioração do fruto devido à elevada percentagem de água, baixa acidez, estrutura celular com grandes vacúolos e espaços intracelulares, e o acelerado metabolismo, característico de frutos climatéricos (PETERS et al., 1999).

A utilização de técnicas de transformação genética possibilita a introdução de características agronômicas desejáveis, e já foi utilizada para conferir resistência a patógenos (YOSHIOKA et al., 1993), a adversidades ambientais (BORDAS et al., 1997) e aumento no período de viabilidade do fruto (AYUB et al., 1996; SILVA et al., 2004). Entretanto, uma das dificuldades para utilização de tais tecnologias é a falta de um sistema eficiente de regeneração de plantas transformadas e a obtenção de um alto índice de plantas quiméricas (GRAY; MCCOLLEY; MICHAEL, 1993; SIMANDJUNTAK; BARRETT; WROLSTAD, 1996).

Na produção de plantas geneticamente transformadas, a disponibilidade de um sistema de regeneração é tão importante quanto um sistema eficiente de transformação. O primeiro relato de transformação eficiente de melão foi feito por Fang e Grumet (1990), e após, mais de 40 protocolos de regeneração *in vitro* têm sido descrito em uma variedade de cultivares de melão, usando organogênese ou embriogênese somática (AKASAKA-KENNEDY; TOMITA; EZURA, 2004; EZURA et

al., 2000; GUIS et al., 1997; GUIS et al., 2000; KINTZIOS et al., 2002; YALCIN-MENDI et al., 2004). No entanto, há vários relatos na literatura de que a taxa de eficiência é baixa e a regeneração de melão é extremamente difícil, e altamente dependente do genótipo (CHOVELON et al., 2011; GALPERIN et al., 2003; NUNEZ-PALENIUS et al., 2008) e da origem do explante utilizado (GUIS et al., 2000). Além disto, é bastante comum a observação de que o processo de regeneração pode ser iniciado, porém as protuberâncias falham em desenvolver brotos normais (STIPP et al., 2001).

Hoje, as necessidades tanto ambientais como hormonais para a regeneração de melão continuam sendo pouco conhecidas e o desenvolvimento de procedimentos mais simples para a regeneração e transformação de diferentes genótipos está muito longe de ocorrer (CHOVELON et al., 2011).

Dentro do grupo *saccharinus*, que apresentam tamanho de frutos médios a grande, com polpa esbranquiçada ou amarelada e doce (KIRKBRIDE, 1993), enquadra-se a cultivar Gaúcho, que possui uma área de plantio bastante representativa no sul do País, porém produz frutos altamente perecíveis, com uma vida de prateleira de quatro a seis dias, dependendo das condições de cultivo e do ponto de colheita (PINHO et al., 2010).

Trabalhos utilizando cotilédones e folhas como explante, vêm sendo realizados para a obtenção de protocolos mais eficientes de regeneração *in vitro* da cv. Gaúcho visando à transformação genética (NORA, 2000; PINHO et al., 2010). Entretanto, para alguns genótipos a frequência de regeneração através de folhas e cotilédones é baixa, e consequentemente é necessária a descoberta de novos explantes, sendo o nó cotiledonar uma possível alternativa (ZHANG; PENG; FEISHI, 2011), principalmente pela alta eficiência de regeneração de plantas transformadas geneticamente a partir de ápices caulinares (DUTT et al., 2007).

Embora sistemas de regeneração via organogênese direta sejam amplamente utilizados para melão, alguns autores sugerem o uso da embriogênese somática como um método mais eficiente para algumas cultivares (RHIMI; BOUSSAID, 2012). Para algumas espécies a micropropagação através de embriogênese somática permite a obtenção de um alto número de plantas elite ou modificadas geneticamente (KILANKAJE; SHANMUGAM, 2011). Também se mostra eficiente no processo de transformação genética, pois está menos propenso a plantas quiméricas, pelo fato de os transformantes serem, normalmente,

regenerados a partir de uma única célula (AKASAKA-KENNEDY; TOMITA; EZURA, 2004).

Diversos fatores, como fonte do explante, composição do meio de cultura, condições ambientais e genótipo afetam significativamente a regeneração e embriogênese somática em *C. melo* (KINTZIOS; TARAVIRA, 1997; KISS-BÁBA et al., 2010). Além disso, o estado fisiológico e a idade do explante afetam diretamente sua capacidade de regeneração, sendo explantes mais jovens e meristemáticos muito mais responsivos aos tratamentos do que explantes mais velhos e diferenciados (BHOJWANI; RAZDAN, 1996).

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho é buscar um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* para melão cv. Gaúcho.

1.1.1 Objetivos específicos

a) Obtenção de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* via organogênese direta utilizando nós cotiledonares como fonte de explante;

b) Obtenção de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* via embriogênese somática utilizando ápices radiculares como explante;

c) Testar diferentes condições de cultivos e diferentes explantes utilizados por outros autores na indução de embriões somáticos para melão.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Organogênese

Organogênese é definido como o processo pelo qual, células e tecidos são forçados a sofrer alterações que levam ao surgimento de uma estrutura unipolar, sendo normalmente um primórdio caulinar ou radicular, cujo sistema vascular se encontra ligado ao explante original (THORPE, 1994).

Esta forma de regeneração de plantas pode ocorrer através de duas vias: a organogênese direta, que se refere ao surgimento de gemas diretamente do explante, como bulbos, segmento de raízes e pecíolos. E a organogênese indireta, que necessita da formação de um calo, uma massa totalmente indiferenciada, para posterior formação de gemas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A organogênese *in vitro* em tecidos vegetais ocorre em resposta à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, principalmente auxina e citocinina (SKOOG; MILLER, 1957). Concentrações mais altas de auxina em relação a uma concentração mais baixa de citocinina induzem a formação de raízes, enquanto que concentrações mais altas de citocinina e concentrações baixas de auxina induzem a formação de brotos. Por outro lado, concentrações balanceadas de auxina/citocinina induzem uma proliferação celular desorganizada e a formação de um calo (YAMAGUCHI et al., 2003).

Em estudos sobre organogênese em melão, métodos de regeneração através de cotilédones, hipocótilos e folhas foram obtidos (MORENO et al., 1985; KATHAL; BAHTNAGAR; BHOJWANI, 1986; KATHAL; BAHTNAGAR; BHOJWANI, 1988), através do uso de auxinas (TABEI; KANNO; NISHIO, 1991), de citocinina (CURUK et al., 2002) ou da combinação de ambos (ABRIE; SATADEN, 2001). Além dos diferentes reguladores de crescimento, outros fatores como condições de cultivo, tipo de explantes e variação na resposta de diferentes genótipos, também foram testados (MENDI et al., 2010)

As condições de cultivo são cruciais para o sucesso da regeneração. Niedz et al. (1989) afim de verificarem os fatores que influenciavam a regeneração de

brotos a partir de cotilédones de melão testaram diferentes temperaturas e intensidades luminosas. O uso de altas intensidades luminosas (60 e 3000µmol.m^{-2}.s^{-1}) foram prejudiciais para regeneração em relação a intensidades medianas (5, 10 e 30µmol.m^{-2}.s^{-1}), já a ausência de luz inibiu totalmente a formação de brotos. O uso de temperaturas mais altas (25 e 29ºC) favoreceu a regeneração.

Explantes com diferentes idades possuem diferentes concentrações endógenas de reguladores de crescimento, portanto sendo mais um fator crucial para a formação de brotos (TABEI; KANNO; NISHIO, 1991). Kiss-baba et al. (2010) demonstram que cotilédones com 4 dias tiveram melhores medias de regeneração quando comparadas com 2, 8 ou 14 dias. Resultados semelhantes foram obtidos por Niedz et al. (1989), onde cotilédones com 18 dias (27,8%) foram menos eficientes na formação de brotos do que cotilédones com 4 (74,9%) e 7 dias (75,2%).

Para cv. Gaúcho, trabalhos demonstram que cotilédones com 1 dia de germinação apresentam maior porcentagem de explantes regenerados (48,34%) do que explantes com 3, 5 e 7 dias em meio germinativo (NORA, 2000). Pinho et al, (2010) relatam que houve interação entre os meios de germinação e os dias em que as sementes permaneceram nesse meio, onde cotilédones com 1 dia responderam melhor do que cotilédones com 2, 3 e 4 dias, e o uso de meio MS livre de reguladores de crescimento foi superior ao meio germinativo com ANA (Ácido Naftalenoacético) e BAP (6-Benzilaminopurina).

Diferentes agentes de solidificação também parecem ter influência sobre a regeneração em melão. Ficcadenti e Rotino (1995) relatam que para cotilédones o uso de ágar foi superior ao uso de gelrite. Já para folhas, o uso de phytagel apresentou resultados muito superiores quando comparados com o uso de ágar, e apesar da vitrificação, os brotos regenerados eram bem formados, facilmente enraizados e transferidos com êxito para o solo (YADAV; SALEH; GRUMET, 1996).

A maior dificuldade para o estabelecimento de protocolos de cultura de tecidos para melão deve-se ao fato dessa espécie demonstrar ter uma regeneração altamente genótipo-dependente (GUIS et al., 1998). Em um estudo para caracterizar e classificar uma população de *C. melo*, Molina e Nuez (1995) encontraram uma grande heterogeneidade entre os 30 genótipos testados para regeneração de brotos a partir de explantes foliares. Resultados semelhantes foram obtidos por Ficcadenti e Rotino (1995) ao testarem 11 genótipos diferentes, onde obtiveram medias variando de 17,3 a 5,7 brotos por explante, e por Kiss-Bába et al. (2010) que ao

comparar 9 genótipos, apenas 4 responderam ao tratamento com 1,0mg.L^{-1} de BAP e 5 ao tratamento com 0,5mg.L^{-1} de BAP.

Para alguns genótipos a frequência de regeneração através de cotilédones é baixa sendo necessária a busca por novos explantes. Com base nisso Zhang, Peng e Feishi (2011) obtiveram uma alta frequência de regeneração utilizando nós cotiledonares (97,5%) cultivados em meio de regeneração contendo 1,5mg.L^{-1} de BAP e 0,1mg.L^{-1} de AIA (Ácido Indolilacético), surgindo assim um novo sistema de regeneração para ser utilizados em outros genótipos.

2.2 Embriogênese somática

Embriogênese somática é definida como um processo onde uma estrutura bipolar, semelhante a um embrião zigótico, surge a partir de uma célula não-zigótica (ARNOLD et al., 2002).

Existem duas vias para indução de embriões somáticos: a embriogênese somática direta, onde ocorre a formação diretamente do explante a partir de células já pré-determinadas para formação de embriões, e a embriogênese somática indireta, que requer uma rediferenciação de células já diferenciadas para formação de um calo embriogênico (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). A capacidade de formação de embriões é geneticamente determinada e demonstra ser genótipo-dependente (LITZ; GRAY, 1995) e o uso de reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, são indispensáveis para indução e iniciação de calos embriogênicos (KOMAMINE et al., 1992; CHÉE; CANTLIFFE, 1988).

A regeneração de plantas através da embriogênese somática requer cinco etapas principais: a iniciação da cultura embriogênica através do cultivo do explante primário em meio suplementado com reguladores de crescimento; proliferação da cultura embriogênica em meio semi-sólido ou liquido adicionado de reguladores de crescimento; pré-maturação dos embriões somáticos em meio de cultura livre de reguladores de crescimento, a fim de inibir a proliferação e estimular o desenvolvimento inicial e formação dos embriões; maturação dos embriões somáticos em meio suplementado com ABA (Ácido abscísico) e /ou um redutor de potencial osmótico; e desenvolvimento de plantas em meio sem reguladores de crescimento (ARNOLD et al., 2002).

Em melão, o primeiro estudo em embriogênese somática surgiu em 1986 quando Oridate e Oosawa obtiveram embriões somáticos em meio líquido a partir de

calos oriundos de cotilédones. Desde então, intensificou-se a utilização de embriogênese somática em melão, surgindo trabalhos utilizando diferentes explantes como folhas, entrenós e ápices caulinares, bem como diferentes cultivares e diferentes reguladores de crescimento, demonstrando que as condições do meio de cultura e genótipo influenciam significativamente a obtenção de embriões somáticos e posterior regeneração de plantas (KAGEYAMA; YABE; MIYAJIMA, 1990).

O uso de reguladores de crescimento é um dos fatores cruciais para o sucesso da obtenção de embriões somáticos. Tabei, Kanno e Nishio (1991) estudaram a influência da auxina na organogênese e embriogênese somática em melão. Observaram que todos os explantes (cotilédones, hipocótilos, folhas e pecíolos) responderam de forma semelhante às diferentes concentrações de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), havendo formação de brotos em baixas concentrações, indução de calos sem nenhuma diferenciação em concentrações intermediárias e a formação de embriões somáticos em altas concentrações. Ao comparar três diferentes auxinas - 2,4-D; ANA; e AIA, - concluíram que houve maior eficiência tanto na organogênese quanto na embriogênese somática ao utilizar AIA. Porém, Comlekcioglu et al. (2009) ao verificarem a ação sinérgica entre auxinas e citocininas em *C. melo* var. flexuosus, em cotilédones e hipocótilos em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D ou ANA, e citocininas BAP e 2iP (2-Isopentenil), de forma isolada ou em combinação um com o outro, e obtiveram melhores resultados utilizando cotilédones cultivados em meio com 4,0 $mg.L^{-1}$ de 2,4-D e 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP. Já o uso isolado de citocininas não induziu a formação de embriões somáticos, demonstrando o papel crucial das auxinas nesse processo.

Além disso, Gray, McColley e Michael (1993) estudaram a interação entre diferentes citocininas, como BAP, CIN (Cinetina), TDZ (Thidiazuron) e 2iP combinados com a auxina 2,4-D. Dentre as citocininas testadas, TDZ foi a que apresentou melhor resultado.

Uma das dificuldades do uso da embriogênese somática é a heterogeneidade no nível de ploidia celular das plantas regeneradas. Ezura e Oosawa (1994) ao analisarem o número de cromossomos de células de calos, embriões somáticos e plantas regeneradas a partir de embriogênese somática de duas cultivares de melão, observaram que, para ambas, a maioria dos explantes

eram diplóides e tetraplóides e uma pequena proporção de octaplóides. Porém apenas embriões somáticos diplóides e tetraplóides foram capazes de germinar e originar plantas. Entretanto, em 1997, Guis et al. desenvolveram um método eficiente de obtenção de altas frequências de embriões somáticos e plantas diplóides a partir de cotilédones maduros de Melão variedade cantalupensis (cv. Vedrantais). Utilizaram um período de duas semanas de indução de embriogênese no escuro em meio MS suplementado com $30g.L^{-1}$ de sacarose, 10µM de 2,4-D e 0,5µM de BAP para indução de embriões, seguido de um período de desenvolvimento do embrião em mesmo meio sem adição de hormônios e um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Após 4 semanas de cultivo, embriões somáticos foram convertidos em plantas. Através desse protocolo, 42% dos explantes foram capazes de gerar embriões com uma média de 7,8 embriões por explante e 60% das plantas geradas foram diplóides, apresentaram o fenótipo esperado e frutos bem desenvolvidos.

Assim como na organogênese, a formação de embriões somáticos em melão é genótipo-dependente. Oridate et al. (1992) encontraram diferenças significativas na embriogênese somática dentro das 18 cultivares testadas, onde apenas duas apresentaram alta frequência de embriões. Em trabalho semelhante, Kintzios e Taravira (1997) testaram a eficiência de diversas cultivares de melão para indução de calos e embriogênese somática sob diferentes intensidades de luz (50 ou $250\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) obtendo variação nas respostas dentro das 14 cultivares. Relataram também que o crescimento de calos e embriogênese somática foram favorecidos por altas intensidades de luz, enquanto que a mesma condição prejudicou a regeneração de plantas. Porém, apenas três cultivares responderam de forma positiva a formação de embriões somáticos.

Já Nakagawa et al. (2001) em estudos sobre a fonte de carbono e regulação osmótica, demonstraram que a concentração ótima de sacarose para embriogênese somática em *C. melo* é de 200mM, e que a utilização apenas de manitol não induziu a formação de embriões. Porém, a utilização de 50uM de manitol combinado com sacarose, e a adição de ABA favoreceram a embriogênese. No tratamento com apenas 200mM de sacarose, após duas semanas, os níveis endógenos de ABA eram muito superiores em calos embriogênicos quando comparados a calos não-embriogênicos. Estes resultados indicam que a síntese de ABA controlada por

condições osmóticas induzidas pelo açúcar, estão intimamente ligadas a embriogênese somática.

Rhimi, Ben Fadhel e Boussaid (2006) ao utilizarem duas cultivares de Melão Tunisiano, demonstraram diferenças significativas entre as respostas dos explantes de acordo com o meio e explante utilizado. Altos índices de embriões somáticos foram obtidos quando utilizados cotilédones e embriões zigóticos em comparação com hipocótilos após três semanas em meio contendo baixas concentrações de auxina e citocinina. Enquanto Naderi et al. (2011) demonstram que em uma cv. de Melão Iraniano, pecíolos cotiledonares responderam de forma mais eficiente e rápida ao tratamento com auxina e citocinina na formação de embriões somáticos do que cotilédones e hipocótilos, surgindo então um promissor explante para utilização em outros genótipos.

3 Material e Métodos

3.1 Regeneração de plantas a partir de nós cotiledonares

3.1.1 Material Vegetal

Sementes comerciais de *Cucumis melo* L. cv. Gaúcho foram descascadas manualmente e desinfestadas por 20min em hipoclorito de cálcio 1% e 0,01% de Tween-20. Após enxague triplo em água destilada estéril as sementes foram colocadas para germinar em Placas de Petri sobre meio MS (Murashige; Skoog, 1962) semi-sólido e adicionado de 30,0g.L^{-1} sacarose, 7,0g.L^{-1} de ágar e de BAP, em diferentes concentrações (tab. 1). Após sete dias em meio de germinação, foram removidos os epicótilos e hipocótilos para a obtenção dos nós cotiledonares que foram utilizados como explante.

Tabela 1 - Tratamentos realizados no processo de multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos a partir de nós cotiledonares de melão cv. Gaúcho

Tratamento	Meio de germinação	Meio de regeneração*
T1	MS + 0,0mg.L^{-1} BAP	MS + 0,25mg.L^{-1} BAP
T2	MS + 0,0mg.L^{-1} BAP	MS + 0,5mg.L^{-1} BAP
T3	MS + 0,0mg.L^{-1} BAP	MS + 0,9mg.L^{-1} BAP
T4	MS + 0,5mg.L^{-1} BAP	MS + 0,25mg.L^{-1} BAP
T5	MS + 0,5mg.L^{-1} BAP	MS + 0,5mg.L^{-1} BAP
T6	MS + 0,5mg.L^{-1} BAP	MS + 0,9mg.L^{-1} BAP
T7	MS + 1,0mg.L^{-1} BAP	MS + 0,25mg.L^{-1} BAP
T8	MS + 1,0mg.L^{-1} BAP	MS + 0,5mg.L^{-1} BAP
T9	MS + 1,0mg.L^{-1} BAP	MS + 0,9mg.L^{-1} BAP
T10	MS + 1,5mg.L^{-1} BAP	MS + 0,25mg.L^{-1} BAP
T11	MS + 1,5mg.L^{-1} BAP	MS + 0,5mg.L^{-1} BAP
T12	MS + 1,5mg.L^{-1} BAP	MS + 0,9mg.L^{-1} BAP

* Todos os meios de regeneração foram acrescidos de 0,3mg.L^{-1} ABA.

3.1.2 Indução de brotos

Os nós cotiledonares foram transferidos para vidros contendo meio de cultivo para multiplicação de brotos, com diferentes concentrações de regulador de crescimento BAP, e uma concentração fixa de ABA (tab. 1). Os nós cotiledonares foram mantidos nos meios por um período de 30 dias, quando se realizou a primeira avaliação. Após esse período, a brotação apical desenvolvida foi removida dos explantes e estes foram mantidos por mais 15 dias em mesmo meio de regeneração e multiplicação de brotos, e posterior avaliação.

3.1.3 Enraizamento, alongamento e climatização

Depois de 45 dias em meio de regeneração, os brotos do melhor tratamento foram individualizados e repicados para meio MS livre de reguladores de crescimento para induzir o enraizamento e alongamento. Após o enraizamento, para a aclimatização, os brotos foram retirados da condição *in vitro*, lavados em água corrente para remoção do excesso de meio de cultura e transferidos para recipientes contendo terra e vermiculita.

3.1.4 Análise histológica

Para o acompanhamento da formação de estruturas organogênicas, explantes com 5 dias após a remoção da brotação apical foram selecionados. As amostras foram fixadas em FAA (formalina-acético-álcool) e mantidas a 4ºC. Foram realizadas duas lavagens, de 1hora cada, em tampão contendo Fosfato de Sódio Monobásico e Fosfato de Sódio Bibásico, seguido de desidratação em série etílica (30% - 95%) e infiltradas em resina hidroxi-etil-metacrilato (Leica Historesin). As amostras foram seccionadas em micrótomo rotatório de avanço automático (ANCAP$^{@}$), a 5µm de espessura. As secções foram montadas em lâminas de vidro e, posteriormente, coradas com azul de toluidina (SAKAI, 1973) e analisadas em microscópio óptico.

3.1.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e as medias comparadas pelo Teste de Duncan ao nível de 1% de significância utilizando o software Sanest.

3.2 Embriogênese somática a partir de ápices radiculares

3.2.1 Material Vegetal

Sementes comerciais de *C. melo* L. cv. Gaúcho, descascadas manualmente, foram desinfestadas superficialmente por imersão durante 20min em hipoclorito de cálcio 1% adicionado de 0,01% de Tween-20, seguido de três lavagens com água estéril e germinadas em placas de Petri em meio MS semi-sólido adicionado de 30g.L^{-1} de sacarose, 7g.L^{-1} de ágar e mantidas em sala de crescimento, no escuro a 23ºC, durante 5 dias. Após a emissão das radículas, estas tiveram seus ápices excisados em torno de cinco milímetros, os quais foram utilizados como explantes. Adicionalmente, os seguintes protocolos foram testados: Oridate e Oasawa, 1986; Tabei, Kanno, Nishio, 1991; Gray, McColley, Compton, 1993; Kathal, Bhatnagar, Bhojwani, 1994 e Guis et al.,1997, conforme a tab. 2.

Tabela 2 - Protocolos testados na obtenção de embriões somáticos em *Cucumis melo* cv. Gaúcho

Autor	Explante	Idade do explante	Meio de indução	Meio de desenvolvimento
ORIDATE;OASAWA, 1986	Cotilédone	0 dias	MS + 1,0mg.L^{-1} 2,4-D + 0,1mg.L^{-1} BAP	MS líquido
TABEI;KANNO;NISHIO, 1991	Cotilédone	0 dias	MS + 25mg.L^{-1} AIA	MS/2 + 0,2mg.L^{-1} GA
GRAY;MCCOLLEY;COMPTON, 1993	Cotilédone	0 dias	MS + 5mg.L^{-1} 2,4-D + 0,1mg.L^{-1} TDZ	MS
KATHAL;BHATNAGAR; BHOJWANI, 1994	Raiz	5 dias	MS+ 3x10^{-6} BAP + 3x10^{-6} 2iP	MS+ 1x10^{-6} BAP
GUIS et al., 1997	Cotilédone	0 dias	MS + 2,2mg.L^{-1} 2,4-D + 0,1mg.L^{-1} BAP	MS

3.2.2 Indução de calos e embriões somáticos

Para indução de calos, ápices radiculares foram cultivados em meio MS semi-sólido adicionado de 30g.L^{-1} de sacarose, 7g.L^{-1} de ágar, contendo auxina (2,4D) e citocinina (BAP) em diferentes concentrações e combinações: 0; 0,5; 1,0;

1,5 e 2,0mg.L^{-1}, conforme a tab. 3. A indução dos calos foi realizada no escuro à temperatura de 23º C.

Após quatro semanas em cultura, os explantes foram avaliados quanto ao número de calos por tratamento, porcentagem de calos formados e características do calo.

Tabela 3 - Tratamentos utilizados na indução de calos e embriões somáticos em melão cv. Gaúcho

Tratamento	Concentração de BAP (mg.L^{-1})*	Concentração de 2,4-D (mg.L^{-1})*
T1	0,0	0,0
T2	0,0	0,5
T3	0,0	1,0
T4	0,0	1,5
T5	0,0	2,0
T6	0,5	0,0
T7	0,5	0,5
T8	0,5	1,0
T9	0,5	1,5
T10	0,5	2,0
T11	1,0	0,0
T12	1,0	0,5
T13	1,0	1,0
T14	1,0	1,5
T15	1,0	2,0
T16	1,5	0,0
T17	1,5	0,5
T18	1,5	1,0
T19	1,5	1,5
T20	1,5	2,0
T21	2,0	0,0
T22	2,0	0,5
T23	2,0	1,0
T24	2,0	1,5
T25	2,0	2,0

3.2.3 Desenvolvimento de embriões somáticos

Para desenvolvimento de embriões, calos cultivados durante quatro semanas em meio MS com diferentes concentrações de auxina e citocinina, foram transferidos para meio MS semi-sólido, sem regulador de crescimento adicionado de 30g.L^{-1} de sacarose, 7g.L^{-1} de ágar e mantidos em sala de crescimento a 23ºC, 40µmol.m^{-2}.s^{-1} e fotoperíodo de 16h (lâmpadas brancas fluorescentes). Após duas e quatro semanas, os explantes foram avaliados quanto à formação de embriões somáticos.

3.2.4 Análise estatística

O experimento foi constituído de dois blocos com 10 explantes (5 explantes por placa de Petri), totalizando 20 explantes por tratamento. Os tratamentos foram constituídos de cinco concentrações de auxina em combinação com cinco concentrações de citocinina em um esquema fatorial simples, totalizando 25 tratamentos. As porcentagens de formação de calos foram submetidas a uma regressão polinomial utilizando o software Sanest.

4 Resultados e discussão

4.1 Organogênese direta a partir de nós cotiledonares

Sementes germinadas em meio de cultivo adicionado de citocinina (BAP) originaram plântulas com primórdios foliares mais evidentes, epicótilos e hipocótilos espessos, raízes engrossadas, curtas e sem raízes secundárias. A análise estatística demonstrou interação entre os meios de germinação e os meios de regeneração, ao contrário de resultados encontrados por Pinho et al. (2010) onde apesar dos meios de germinação influenciarem as porcentagens de regeneração, não houve interação entre os dois fatores (tab. 4).

Na Fig. 1 são apresentados os resultados da primeira avaliação, após 30 dias de cultivo dos explantes em meios de regeneração e multiplicação de brotos. A concentração mais baixa da citocinina BAP (0,5mg.L^{-1}) durante a germinação, combinada com a utilização da concentração mais alta deste regulador de crescimento na multiplicação de brotos (0,9mg.L^{-1}), resultaram em moderada indução de gemas e brotações iniciais nas laterais do broto principal (Fig. 1C). Neste tratamento apesar do broto principal ter se desenvolvido, apresentando dominância apical, produziu um broto de tamanho pequeno. A mesma concentração de BAP (0,5mg.L^{-1}) na germinação e na multiplicação de brotos resultou em maior dominância apical e um broto principal de maior tamanho (Fig. 1B). A combinação das duas concentrações mais baixas de BAP (0,5mg.L^{-1} na germinação da semente e 0,25mg.L^{-1} na multiplicação) resultou em explantes com brotação apical considerada normal, sem nenhuma evidência de multiplicação lateral (Fig. 1A). A utilização da concentração mais alta de citocinina BAP (1,5mg.L^{-1}) na germinação, combinada com a concentração mais baixa deste regulador de crescimento (0,25mg.L^{-1}) na multiplicação de brotos, resultou em explante com brotação principal semelhante a brotação desenvolvida diretamente da semente (Fig. 1E). O mesmo ocorreu quando se empregou concentração de 1,0mg.L^{-1} de BAP na germinação da semente e 0,25mg.L^{-1} de BAP na multiplicação de brotos (Fig. 1D). A concentração mais alta de BAP (1,5mg.L^{-1}) na germinação da semente, combinada com a

concentração intermediária (0,5mg.L^{-1}) na multiplicação, reduziu a dominância apical do broto principal e induziu a formação de gemas laterais (Fig. 1F). Finalmente, a concentração mais alta de BAP (1,5mg.L^{-1}) na germinação da semente, combinada com a concentração mais alta deste hormônio (0,9mg.L^{-1}) na multiplicação de brotos, resultou em menor dominância apical (Fig. 1G), e alguns explantes vitrificados, o que pode estar relacionado a altas concentrações de citocinina (LESHEM; SHALEY; IZHAR, 1988).

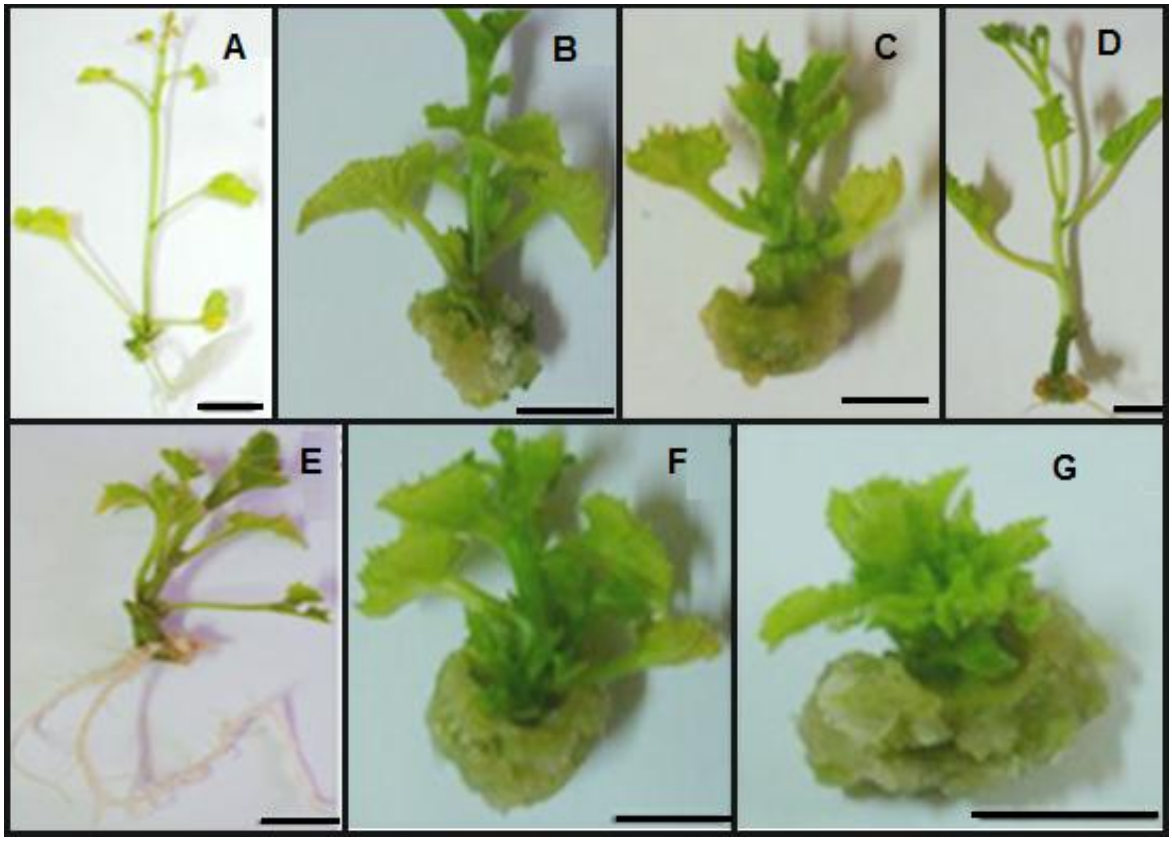

Figura 1 - Multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos utilizando-se nós cotiledonares de melão cv Gaúcho. A-G= explantes com 30 dias, primeira avaliação. A: T4; B: T5; C: T6; D: T10; E: T7; F: T11; G: T12. T= Tratamentos. A a G (Barra 1cm).

Nenhum dos tratamentos testados resultou em plena quebra de dominância apical. A biossíntese e ação do hormônio AIA, auxina mais abundante e de maior relevância fisiológica, provavelmente foi determinante na manutenção da referida dominância apical. A produção de AIA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente nas partes aéreas. Embora quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzir AIA, ainda que em baixas concentrações, os meristemas apicais de caules e as folhas jovens são os principais

locais de síntese desse hormônio (LJUNG; BHALERAO; SANDBERG, 2001). O ápice caulinar responde pela quase totalidade da auxina produzida na planta. O transporte da auxina (transporte polar) do ápice do caule até o ápice da raiz resulta em um gradiente de auxina entre estes órgãos. Este gradiente longitudinal de auxina da parte aérea até a raiz afeta vários processos de desenvolvimento, dentre eles a dominância apical, caracterizada pelo crescimento dominante do eixo central da planta sobre os eixos que dele emergem (ramos laterais). A dominância apical ocorre pela inibição da formação de outros ramos na proximidade do ramo central pela ação da auxina produzida no ápice do mesmo.

Acredita-se que as concentrações de citocinina exógena (BAP) empregada nos tratamentos não foram suficientemente elevadas para inibir a dominância apical mantida pela ação das auxinas endógenas. Por lado, concentrações excessivas de citocinina exógena são deletérias na regeneração (ALONI, 1993).

O maior desafio na utilização de nós cotiledonares como explante na regeneração de melão Gaúcho tem a sido a persistente dominância apical desta espécie. A identificação do adequado regime de reguladores de crescimento exógenos para regeneração de melão Gaúcho deve assegurar a quebra de dominância apical, a indução de novos meristemas e múltiplos brotos laterais. A remoção da brotação principal aos 30 dias e o cultivo destes explantes por mais 15 dias em meio de multiplicação pareceu ser essencial e suficiente para controlar a dominância apical e melhorar significativamente a indução de gemas e brotações laterais (Fig. 2).

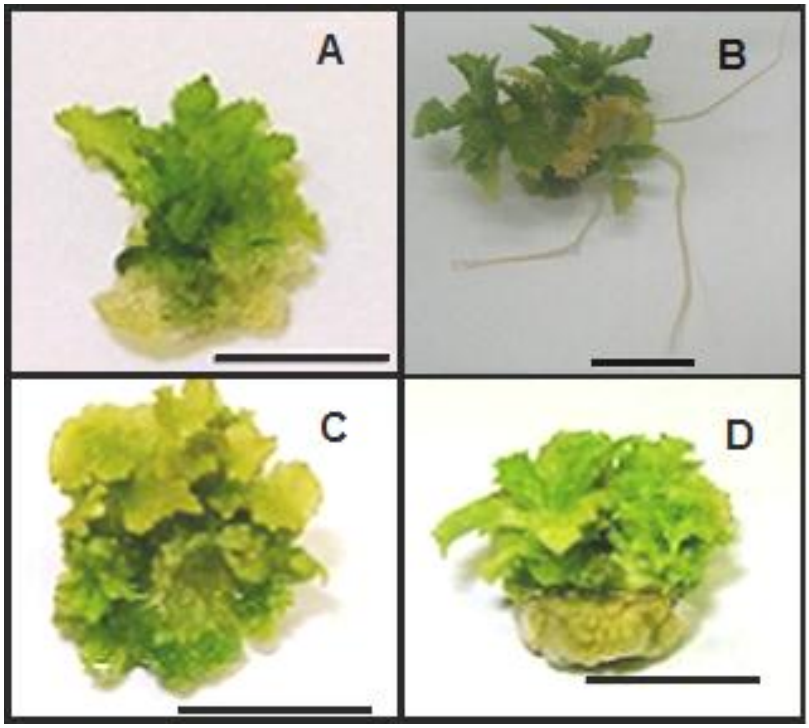

Figura 2 - Multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos a partir de nós cotiledonares de melão cv. Gaúcho. A-D= explantes com 45 dias, segunda avaliação. A: T7; B: T8; C: T9; D: T11. T= Tratamentos. A a D (Barra 1cm).

A utilização de 1,0mg.L^{-1} de BAP na germinação e 0,5mg.L^{-1} de BAP no meio de regeneração foi significativamente melhor quando comparado com os demais tratamentos, obtendo-se uma média de 5,5 brotos por explante (tab. 4). A falta de regulador de crescimento ou a concentração de 0,5mg.L^{-1} durante a germinação mostrou um número menor de brotações, 0,5 e 0,8 brotos por explante, respectivamente, quando utilizado 0,5mg.L^{-1} de BAP no meio de regeneração. Entretanto, na medida em que se aumentou a concentração de BAP na germinação para 1,0mg.L^{-1} e 1,5mg.L^{-1}, a concentração de 0,5mg.L^{-1} na regeneração se mostrou a mais adequada para a produção de novos brotos (5,5 e 3,4 brotos por explante, respectivamente). Estes resultados concordam com trabalhos de Ficcadenti e Rotino (1995) e Niedz et al. (1989) que obtiveram uma alta frequência de regeneração de brotos utilizando meios contendo BAP e ABA.

Trabalhos utilizando cotilédones de melão Gaúcho como explante obtiveram uma média de aproximadamente 1,9 brotos por explante, sendo um índice baixo quando comparados com outras cultivares (NORA, 2000). Ao utilizar 1,0mg.L^{-1} de BAP na germinação, e 0,5mg.L^{-1} de BAP e 0,3mg.L^{-1} de ABA na regeneração, nós

cotiledonares apresentaram uma média de 5,5 brotos por explante, demonstrando ser um explante promissor para trabalhos visando à transformação genética da cv. Gaúcho.

Tabela 4 - Número médio de brotos por explantes de acordo com as diferentes concentrações de hormônio BAP nos meios de germinação e regeneração. Utilizou-se Teste de Duncan ao nível de 1% de significância

Regeneração ($mg.L^{-1}$ BAP)	Germinação ($mg.L^{-1}$ BAP)			
	0,0	0,5	1,0	1,5
0,25	C 2,1 a	D 1,3 b	A 4,1 c	B 2,9 b
0,50	C 0,5 b	C 0,8 c	A 5,5 a	B 3,4 a
0,90	B 2,2 a	B 2,1 a	A 4,6 b	B 2,4 c

As letras minúsculas a direita das medias é comparativo na coluna e letras maiúsculas a esquerda das medias é comparativo na linha.

A formação somente de primórdios foliares e protuberâncias ao invés de brotações é um fenômeno constante em protocolos de regeneração em melão (LESHEM, 1989). Gaba et al. (1999) relatam a formação de protuberâncias meristemáticas que não originaram gemas, formando apenas primórdios foliares que cobrem toda extremidade do explante oriundo de cotilédones. No entanto, o presente trabalho demonstrou a formação de gemas a partir de nós cotiledonares após 5 dias do corte da dominância apical, sem fase de calo, caracterizando organogênese direta (Fig. 3).

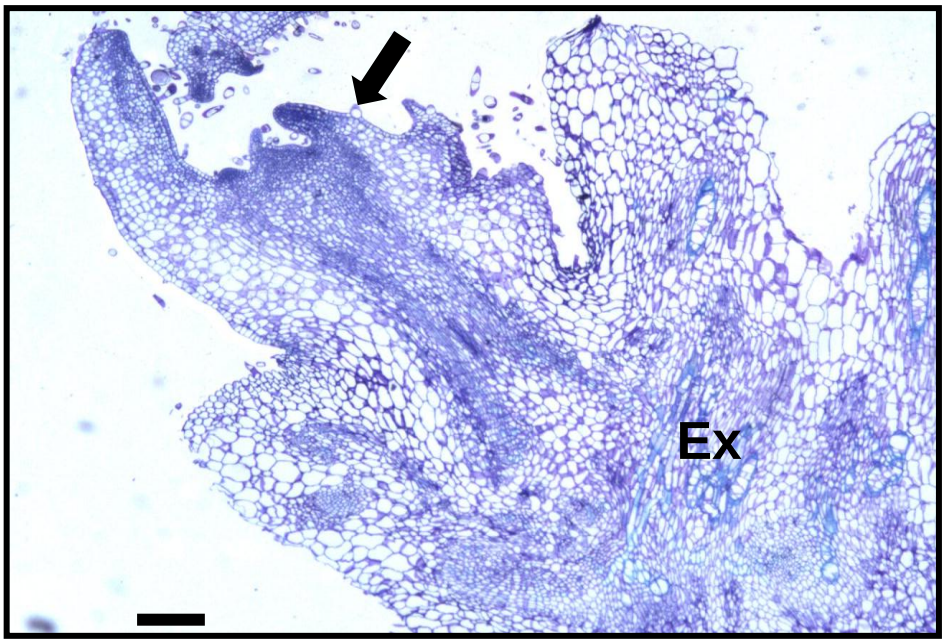

Figura 3 - Gema (seta) formada diretamente no explante (Ex) oriundo do tratamento T8 (1,0mg.L^{-1} BAP na germinação e, 0,5mg.L^{-1} BAP e 0,3mg.L^{-1} ABA no meio de regeneração) após 5 dias do corte da dominância apical . Barra = 200µm.

Após 45 dias em meio de regeneração e multiplicação, 100% dos brotos do melhor tratamento (T8) foram enraizados e alongados em meio MS livre de reguladores de crescimento. Depois de 20 dias em meio de enraizamento e alongamento, os brotos foram aclimatizados em sala de crescimento a 23ºC e 60µmol.m^{-2}.s^{-1} em vasos contendo terra e vermiculita (Fig. 4).

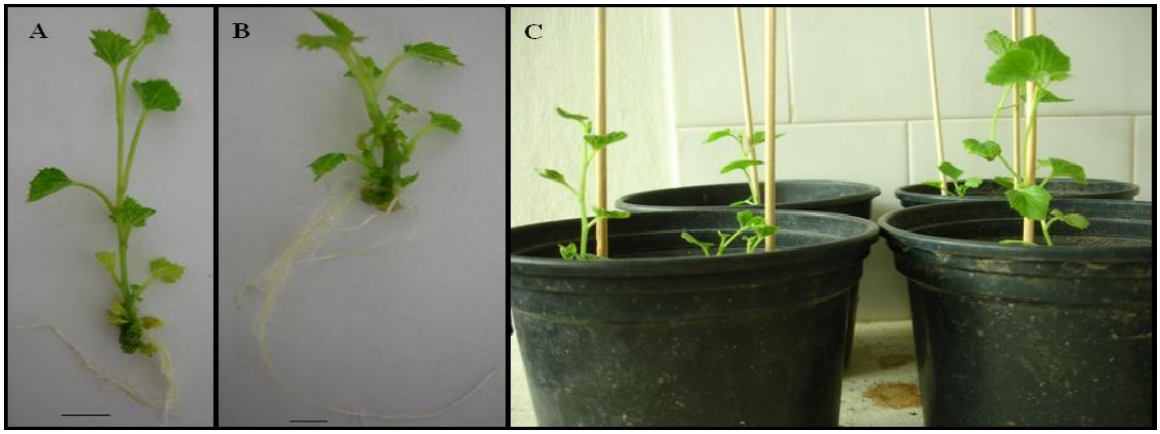

Figura 4 - A – Explante após 20 dias em meio de alongamento e enraizamento; B – Explante após 13 dias em meio de alongamento e enraizamento; C – Plantas aclimatadas em recipientes contendo terra e vermiculita. Barra = 1 cm.

4.1 Embriogênese somática a partir de ápices radiculares

A formação de calos iniciou aproximadamente duas semanas após a inoculação dos explantes nos meios de cultura e, em geral, os calos apresentaram uma coloração amarelada.

De acordo com a tab. 5, tratamentos com concentrações intermediárias de 2,4-D (0,5; 1,0 e 1,5mg.L^{-1}) combinados com BAP demonstraram porcentagens de formação de calos superiores aos tratamentos sem BAP, ou com a maior concentração de 2,4-D (2,0mg.L^{-1}).

Observou-se a formação de calos em todos os tratamentos, exceto os que não continham 2,4-D, colaborando com trabalho de Tabei, Kanno e Nishio (1991) que demonstraram o papel fundamental da auxina na indução de calos e embriões somáticos. Explantes cultivados sem a presença de nenhum regulador de crescimento apresentaram crescimento longitudinal, com formação de raízes secundárias e pelos absorventes em alguns explantes (Fig. 5A). Com a adição de citocinina, houve uma diminuição do crescimento longitudinal e um aumento em espessura, com surgimento de pequena massa celular na região do corte (Fig. 5B-E).

Tabela 5 – Porcentagem de formação de calos de acordo com as diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de indução de calos embriogênicos

Tratamento	Concentração de BAP (mg.L^{-1})	Concentração de 2,4-D (mg.L^{-1})	Porcentagem de formação de calos (%)
T1	0,0	0,0	0
T2	0,0	0,5	35
T3	0,0	1,0	40
T4	0,0	1,5	55
T5	0,0	2,0	20
T6	0,5	0,0	0
T7	0,5	0,5	100
T8	0,5	1,0	100
T9	0,5	1,5	85
T10	0,5	2,0	80
T11	1,0	0,0	0

Tabela 5 - Porcentagem de formação de calos de acordo com as diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de indução de calos embriogênicos

T12	1,0	0,5	95
T13	1,0	1,0	95
T14	1,0	1,5	75
T15	1,0	2,0	80
T16	1,5	0,0	0
T17	1,5	0,5	95
T18	1,5	1,0	95
T19	1,5	1,5	85
T20	1,5	2,0	80
T21	2,0	0,0	0
T22	2,0	0,5	85
T23	2,0	1,0	90
T24	2,0	1,5	90
T25	2,0	2,0	80

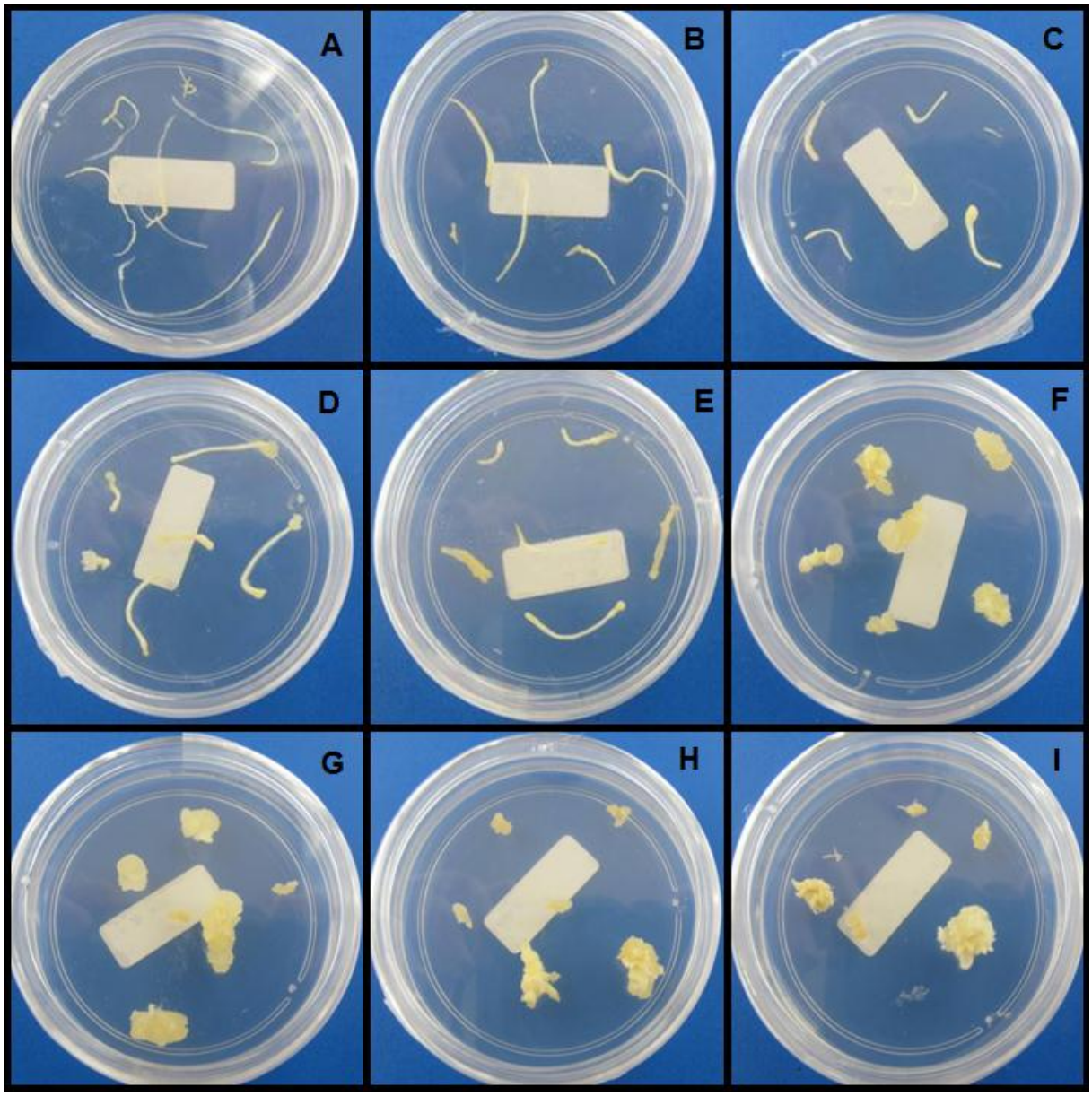

Figura 5 - Ápices radiculares cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de auxina e citocinina. A-E: Sem adição de auxina e 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.L^{-1} de BAP, respectivamente. F-I: Concentração fixa de 0,5mg.L^{-1} de BAP adicionado de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.L^{-1} de 2,4-D, respectivamente.

A utilização de BAP em conjunto com 2,4-D induziu um aumento no percentual de formação de calos, indicando um sinergismo entre esses dois reguladores de crescimento. Porém, todos os tratamentos mantiveram um padrão de comportamento, independente da concentração de BAP (Fig. 6), onde concentrações de 0,5mg.L^{-1} (Fig. 5F), 1,0mg.L^{-1} (Fig. 5G) e 1,5mg.L^{-1} (Fig. 5H) de auxina apresentaram uma porcentagem de calos superiores em relação ao tratamentos com e 2,0mg.L^{-1} (Fig. 5I), o que demonstra um efeito inibitório

provocado por concentrações mais altas desse regulador de crescimento. Esse fato pode estar associado a um efeito inibitório causado por concentrações mais elevadas de auxina (TORRES; CALDAS, 1990).

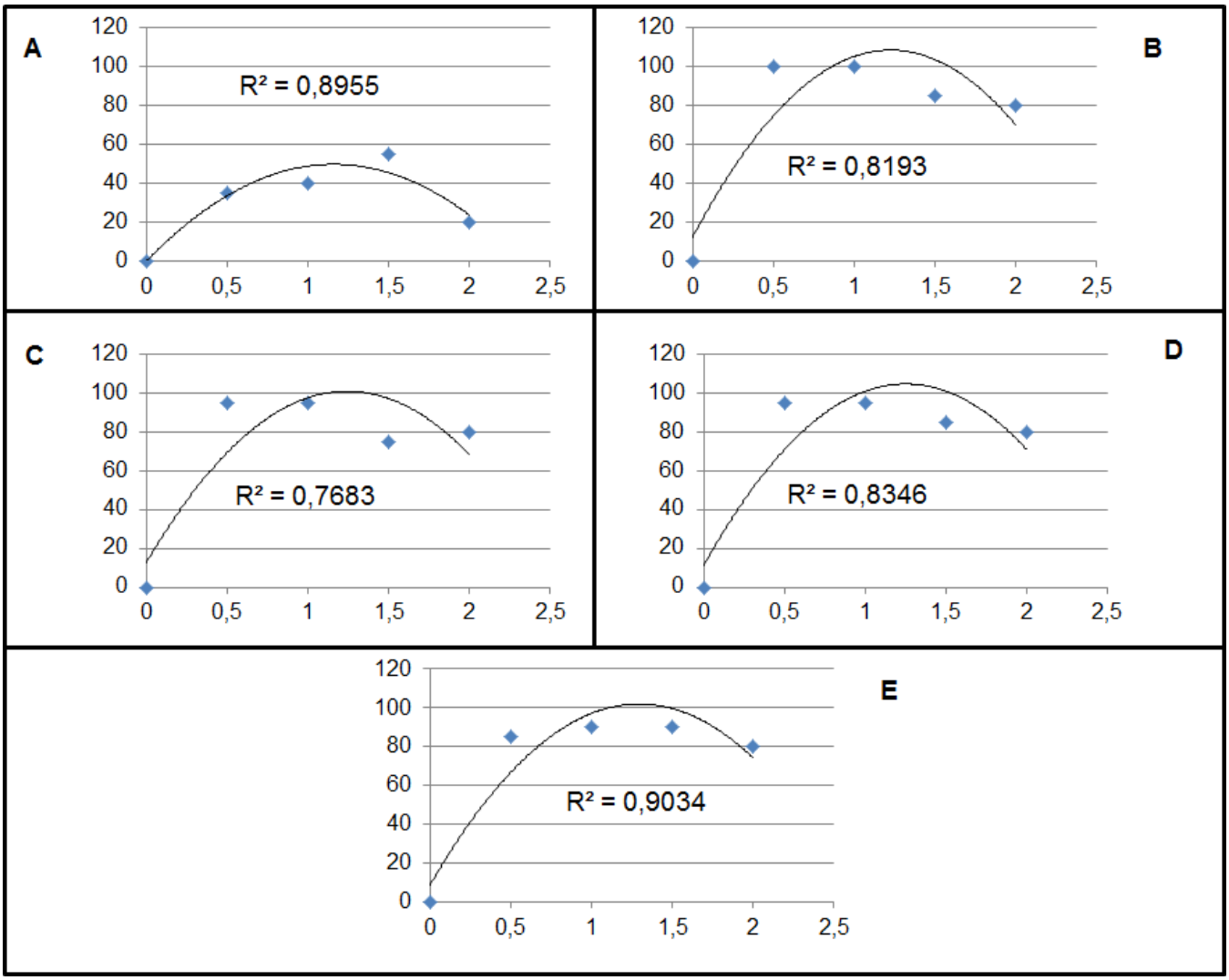

Figura 6 - Porcentagens de formação de calos por tratamento utilizado. No eixo Y a porcentagem de calos formados e no eixo X as concentrações de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.L^{-1}), e uma concentração fixa de BAP: A – 0,0mg.L^{-1}; B - 0,5mg.L^{-1}; C - 1,0mg.L^{-1}; D - 1,5mg.L^{-1}; E - 2,0mg.L^{-1}.

Após duas e quatro semanas em meio MS para desenvolvimento de embriões, nenhum dos calos oriundos dos tratamentos testados originou embriões somáticos, apresentando apenas um aumento de tamanho, e adquiriram um aspecto mais translúcido e com algumas regiões esverdeadas. Tanto as condições de cultivo, quanto as concentrações de reguladores de crescimento podem ser as explicações para a falta de calos embriogênicos nos tratamentos testados nesse

estudo. Debeaujon e Branchard (1993), e Nunez-Palenius et al. (2008) sugerem que a resposta *in vitro* em melão está sob controle genético, no entanto fatores ambientais e reguladores de crescimento possuem importância primordial no processo.

Além disso, protocolos utilizados com sucesso por outros autores (ORIDATE; OASAWA, 1986; TABBEI; KANNO; NISHIO, 1991; GRAY; MCCOLLEY; COMPTON, 1993; KATHAL; BHATNAGAR; BHOJWANI, 1994; GUIS et al., 1997) ao serem testados para a cv. Gaúcho não foram capazes de induzir a formação de calos embriogênicos, demonstrando que a regeneração *in vitro* em melão é genótipo-dependente. Em seus estudos, Molina e Nunez (1995) sugerem que a variabilidade genotípica ao invés de diferenças fisiológicas influencia mais a capacidade regenerativa em uma população de sementes de melão. Oridate et al. (1992) observou um efeito significativo do genótipo sobre a capacidade de formação de embriões somáticos em 18 cultivares de melão, e conclui que as diferenças existem entre as cultivares e não somente entre variedades. Kintzios e Taravira (1997) também relatam a condição de genótipo-dependente do melão quando apenas 3 das 14 cultivares responderam aos tratamentos de indução de embriões somáticos.

5. Conclusões

5.1 Organogênese direta a partir de nós cotiledonares

a) Houve interação entre os meios de germinação e os meios de regeneração;

b) A utilização de 1,0mg.L^{-1} de BAP na germinação e, 0,5 mg.L^{-1} de BAP e 0,3mg.L^{-1} de ABA na regeneração apresentou médias superiores (5,5 brotos por explante) quando comparados com outros tratamentos;

c) O uso de nós cotiledonares produziu múltiplas brotações em melão cv. Gaúcho, podendo ser utilizado como um novo explante para a transformação genética dessa cultivar.

5.2 Embriogênese somática a partir de ápices radiculares

a) Houve formação de calos somente nos tratamentos que continham a auxina 2,4-D, mostrando o papel fundamental desse regulador de crescimento para a divisão celular de *C. melo*;

b) Observou-se um decréscimo na percentagem de calos nos tratamentos com a concentração mais alta de 2,4-D, indicando um efeito inibitório;

c) Os tratamentos T7 (0,5mg.L^{-1} de BAP + 0,5mg.L^{-1} de 2,4-D) e T8 (0,5mg.L^{-1} de BAP + 1,0mg.L^{-1} de 2,4-D) apresentaram as porcentagens mais altas de formação de calos (100%).

d) Nenhum dos tratamentos foi capaz de induzir a formação de calos embriogênicos.

Referências

ABRIE, A. L.; STADEN, J. V. Development of regeneration protocols for selected cucurbit cultivars. **Plant Growth Regulation**, v.35, n.3, p.263-267, 2001.

AGRIANUAL. FNP – Consultoria & Comércio. **Anuário da Agricultura Brasileira**, São Paulo, v.13, p.186-191, 2008.

AKASAKA-KENNEDY, Y.; TOMITA, K. O.; EZURA, H. Efficient plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Science**, v.166, n.3, p.763-769, 2004.

ALONI, R. The role of cytokinin in organized differentiation of vascular tissues. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.20, n.38, p.601-608, 1993.

ARNOLD, S. V.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v.69, n.3, p.233–249, 2002.

AYUB, R.; GUIS, M.; BEN AMOR, M.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J. P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Expression of an antisense ACC oxydase gene inhibits ripening in cantaloupe melons fruits. **Nature Biotechnology**, v.14, n.7, p.862-866, 1996.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice.** Amsterdam: Elsevier; 1996. 767p.

BORDAS, M.; MONTESINOS, C.; DABAUZA, M.; SALVADOR, A.; ROIG, L. A.; SERRANO, R.; MORENO, V. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo L*. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. **Transgenic Research**, v.6, n.1, p.41-50, 1997.

CHOVELON, V.; RESTIER, V.; GIOVINAZZO, N.; DOGIMONT, C.; AARROUF, J. Histological study of organogenesis in *Cucumis melo* L. after genetic transformation: why is it difficult to obtain transgenic plants? **Plant Cell Reports**, v.30, n.11, p.2001-11, 2011.

CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Selective enhancement of Ipomoea batatas poir embryogenic and non embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. **PlantCell Tissue and Organ Culture**, v.15, n.2, p.149-159, 1988.

COMLEKCIOGLU, N.; MENDI, Y. Y.; ELDOGAN, S.; UNEK, C. Effects of different combinations and concentrations of growth regulators and photoperiod on somatic embryogenesis of *Cucumis melo* var. flexuosus. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.22, p.6228–6232, 2009.

CURUK, S.; ELMAN, C.; SCHLARMAN, E.; SAGEE, O.; SHOMER, I.; CETINER, S.; GRAY, D. J.; GABA, V. A novel pathway for rapid shoot regeneration from the proximal zone of the hypocotyl of melon (*Cucumis melo* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.38, n.3, p.260-267, 2002.

DEBEAUJON, I.; BRANCHARD, M. Somatic embryogenesis in Cucurbitaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, n.1, p.91-100, 1993.

DUTT, M.; LI, Z. T.; DHEKNEY, S. A. Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. "Thompson Seedless" via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v.26, n.12, p.2101-2110, 2007.

EZURA, H.; OOSAWA, K. Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.). **Journal Plant Cell Reports** v.14, n.2-3, p.107-111, 1994.

EZURA H.; YUHASHI, K. I.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Effect of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. **Plant Breeding**, v.119, n.1, p.75-79, 2000.

FANG, G. W.; GRUMET, R. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskemelon plants. **Plant Cell Reports**, v.9, n.3, p.160-164, 1990.

FICCADENTI, N.; ROTINO, G. L. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, n.3, p. 293-295, 1995.

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 & Developmental Biology – Plant**, v.35, n.1, p.1-7, 1999.

GALPERIN, M.; PATLIS, L.; OVADIA, A.; WOLF, D.; ZELCER, A.; KENIGSBUCH, D. A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation. **Plant Breeding**, v.122, n.1, p.66-69, 2003.

GAYET, JEAN PAUL. Melão para exportação: procedimentos de colheita e pós colheita. **Frupex**, v.6, 2003. 36p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.

GRAY, D. J.; MCCOLLEY, D. W.; MICHAEL, E. C. High frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.118, n.3, p.425–432, 1993.

GUIS, M.; LATCHE, A.; PECH, J. C.; ROUSTAN, J. P. An efficient method for production of diploid cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. cantaloupensis) by somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v.69, n.4, p.199-206, 1997.

GUIS, M.; ROUSTAN, J. P.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; PECH, J. C. Melon Biotechnology. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.15, n.1, p.289-311, 1998.

GUIS, M.; BEN AMOR, M.; LATCHE, A.; PECH, J. C.; ROUSTAN, J. P. A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. cantalupensis) leading to a majority of diploid regenerants. **Scientia Horticulturae,** v.8, n.1-2, p.91-99, 2000.

JARL, C. I.; BOKELMANN, G. S.; DE HAAS, J. M. Protoplast regeneration and fusion in *Cucumis: melon* x *cucumber*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.43, n.3, p.259-265, 1995.

KAGEYAMA, K.; YABE, K.; MIYAJIMA, S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from stem, leaf, and shoot apex of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Tissue Culture**, v.7, n.3, p.193–198, 1990.

KHATAL, R.; BHATNAGAR, S. S.; BHOJWANI, S. S. Regeneration of Shoots from Hypocotyl Callus of *Cucumis melo* cv. Pusa sharbati. **Journal of Plant Physiology**, v.126, n.1, p.59-62, 1986.

KHATAL, R.; BHATNAGAR, S. S.; BHOJWANI, S. S. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. **Plant Cell Reports**, v.7, n.6, p.449-451, 1988.

KHATAL, R.; BHATNAGAR, S. S.; BHOJWANI, S. S. Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa sharbati. **Plant Science**, v.96, n.1-2, p.137-142, 1994.

KILANKAJE, A.; SHANMUGAM, G. Somatic embryogenesis for *agrobacterium* mediated transformation of tomato- S*olanum lycopersicum* L. **International Journal of Biotechnology Applications**, v.3, n.2, p.72-77, 2011.

KINTZIOS, S. E.; TARAVIRA, N. Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Breeding**, v.116, n.4, p.359-362, 1997.

KINTZIOS, S.; SERETI, E.; BLUCHOS, P.; DROSSOPOULOS, J. B.; KITSAKI, C. K.; LIOPA-TSAKALIDIS, A. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (cucumis melo L.). **Plant Cell Reports**, v.21, n.1, p.1-8, 2002.

KIRKBRIDE, J. **Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae)**. 1.ed. Boone, North Carolina:Parkway Publishers, 1993. p.159.

KISS-BÁBA, E.; PÁNCZÉL, S.; VELICH, I.; BISZTRAY, G. D. Influence of genotype and explant source on the *in vitro* regeneration ability of different melon varieties. **Acta Biologica Hungarica,** v.61, n.4, p.498–511, 2010.

KOMAMINE A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIWARA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.;FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.28, n.1, p.11-14, 1992.

LESHEM, B.; SHALEY, D.P.; IZHAR, S. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. **Annals of botany**, v.61, n.2, p.255-260, 1988.

LESHEM, B. Polarity and responsive regions for regeneration in the cultured melon cotyledon. **Journal of Plant Physiology**, v.135, n.2, p.237-239, 1989.

LITZ, R. E.; GRAY, D.J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, n.4, p.416–425, 1995.

LJUNG, K.; BHALERAO, R. P.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **The Plant Journal**, v.28, n.4, p.465-474, 2001.

MENDI, Y. Y.; COMLEKCIOGLU, N.; IPEK, M.; KOCAMAN, E.; IZGU, T.; TEKDAL, D.; CURUK, P. The effect of different hormone concentrations and dark pretreatment on adventitious shoot regeneration in snake melon (*Cucumis melo* var. flexousus). **Romanian Biotechnological Letters**, v.15, n.4, p.5392-5395, 2010.

MOLINA, R. V.; NUEZ, F. Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.43, n.3, p.249-257, 1995.

MORENO, V.; GARCIA-SOGO, M.; GRANNEL, I.; GARCIA-SOGO, B.; ROIG, L. A. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L., cv. 'Amarillo Oro'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.5, n.2, p.139-146, 1985.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NADERI, D.; MOUSAVI, A.; HABASHI, A. A.; LOTFI, M. Optimization of somatic embryogenesis induction in Iranian melon (*Cucumis melo* cv. Khatooni). **African Journal of Biotechnology,** v.10, n.34, p. 6434-6438, 2011.

NAKAGAWA, H.; SAIJYO, T.; YAMAUCHI, N.;, SHIGYO, M.; KAKO, S.; ITO, A. Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. **Scientia Horticulturae**, v.90, n.1-2, p.85-92, 2001.

NIEDZ, R. P.; SMITH, S. S.; DUNBAR, K. B.; STEPHENS, C. T.; MURAKISHI, H. H. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.18, n.3, p.313-319, 1989.

NORA, Fabiana. **Transformacao genética do meloeiro (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho.** 2000. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

NUNEZ-PALENIUS, H. G.; GOMEZ-LIM, M.; OCHOA-ALEJO, N.; GRUMET, R.; LESTER, G.; CANTLIFFE, D. J. Melon fruits: Genetic diversity, physiology, and biotechnology features. **Critical Reviews in Biotechnology,** v.28, n.1, p.13-55, 2008.

ORIDATE, T.; OOSAWA, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). **Japan Journal Breed**, v.36, n.4, 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, n.1, p.27-30, 1992.

PETERS, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Transformação genética do meloeiro e da maciera. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.4, n.11, p.11-15, 1999.

PINHO, D. S.; REY, M. S.; VIEIRA, A.; DANIELOWSK, R.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Regeneração in vitro de melão, cv. 'Gaúcho'. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p.1083-1089, 2010.

RHIMI, A.; BEN FADHEL, N.; BOUSSAID, M. Plant regeneration via somatic embryogenesis from in vitro tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, n.2, p.239-243, 2006.

RHIMI, A.; BOUSSAID, M. An efficient method for production of Tunisian melon (*Cucumis melo* L. cultivars Maazoun and Beji) by somatic embryogenesis. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.42, p.9924-9931, 2012.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v.48, n.5, p. 247-249, 1973.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores – SANEST**. [Pelotas]: UFPel, Instituto de Física e Matemática, Departamento de Estatística, 1986.

SILVA, J. A.; DA COSTA, T. S.; LUCCHETTA, L.; MARINI, L. J.; ZANUZO, M. R.; NORA, L.; NORA, F.; TWYMAN, R. M.; ROMBALDI, C. V. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1 aminocyclopropane-1 carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, n.3, p.263-268, 2004.

SIMANDJUNTAK, V.; BARRETT, D. M.; WROLSTAD, R. E. Cultivar and maturity effects on Muskmelon (*Cucumis melo* L.) colour, texture and cell wall polysaccharide composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.71, n.3, p.282–290, 1996.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, n.1, p.118-140, 1957.

SOUZA, F. V. D.; GARCIA-SOGO, B.; DA SILVA SOUZA, A.; SAN-JUA´N, P.; MORENO, V. Morphogenetic response of cotyledon and leaf explants of melon (*Cucumis melo* L.) cv. Amarillo Oro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.1, p.21–27, 2006.

STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J.; PIEDADE, S.; RODRIGUEZ, A. P. M. In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* var. inodorus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.65, n.1, p.81-89, 2001.

TABEI, Y.; KANNO, T.; NISHIO, T. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, v.10, n.5, p.225-229, 1991.

THORPE, Trevor; VASIL, Indra. **Plant Cell and Tissue Culture.** 1ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. 604p.

TORRES A.C.; CALDAS L.S. **Técnicas e aplicações dacultura de tecidos de plantas**. 1ed. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. **Annals of Botany**, v.57, n.4, p.443-462, 1986.

YADAV, R. C.; SALEH, M. T.; GRUMET, R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, n.3, p.207-214, 1996.

YALCIN-MENDI, N. Y.; IPEK, M.; SERBEST-KOBANER, S.; CURUK, S.; KACAR, Y. A.; CETINER, S.; GABA, V.; GRUMET, R. *Agrobacterium*-mediated transformation of 'Kirkagac 637' a recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivar with ZYMV coat protein encoding gene. **European Journal of Horticultural Science**, v.69, n.6, p.258-262, 2004.

YAMAGUCHI, M.; KATO, H.; YOSHIDA, S.; YAMAMURA, S.; UCHIMIYA, H. Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.13, p.8019-8023, 2003.

YOSHIOKA, K.; HANADA, K.; HARADA, T.; MINOBE, Y.; OOSAWA, K. Virus resistance in transgenic melon plants that express the cucumber mosaic virus coat

protein gene and their progeny. **Japanese Journal of Breeding**, v.43, n.4, p.629-634, 1993.

ZHANG, H.; PENG, G,; FEISHI, L. Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis melo* L.. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.35, p.6757-6761, 2011.