

Combinações hormonais na organogênese cotiledonar do meloeiro cv. Eldorado 300

Leticia Reis¹; Ricardo Antônio Ayub²; Aducto Bellarmino Pereira-Netto³ e
Tereza Cristina de Carvalho⁴

¹Eng. Agrônoma. Doutora em Agronomia. Departamento de Fitotecnia e Fitopatologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG, Ponta Grossa, PR - Brasil. E-mail: lereis04@hotmail.com

²Eng. Agrônomo, Prof. Doutor. Departamento de Fitotecnia e Fitopatologia, UEPG. E-mail: rayub@uepg.br

³Biólogo, Professor Dr. Bolsista de produtividade em pesquisa-CNPq, Departamento de Botânica, UFPR, Curitiba, PR – Brasil. E-mail: apereira@ufpr.br.

⁴Eng. Agrônoma, Prof. Doutora em Agronomia. Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais, CESCAGE, Ponta Grossa, PR – Brasil. E-mail: tcscarva@gmail.com.

Resumo: Por ser um fruto bastante apreciado e de elevada importância agrônômica, diversos trabalhos visando o melhoramento genético do meloeiro, como por exemplo, para o prolongamento do tempo de prateleira, têm sido descritos. Entretanto, a inexistência de sistemas adequados para transformação e regeneração de plantas é um fator limitante para a aplicação desta tecnologia em diversas cultivares de meloeiro, a exemplo da cv Eldorado 300. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para regeneração eficiente *in vitro* da cv Eldorado 300 (*Cucumis melo var. inodorus*) a partir de explantes cotiledonares, visando a posterior utilização deste protocolo de regeneração para aplicação em trabalhos de transformação genética. Foram testadas três fontes de citocinina (benzilaminopurina (BAP), cinetina (Cin) e isopenteniladenina (2ip), em 3 concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹), combinadas com 5 concentrações de ácido indolacético (AIA) (0,01; 0,05; 0,1; 0,4 e 0,8 mg L⁻¹), adicionadas ao meio básico MS + 0,26 mg L⁻¹ de ácido abscísico (ABA). O maior número de gemas e brotações formadas foi encontrado em explantes mantidos em meio de cultura contendo 1 mg L⁻¹ de BAP + 0,8 mg L⁻¹ de AIA e 1,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,01 mg L⁻¹ de AIA. Entretanto, as plântulas obtidas apresentaram morfologia anormal e sobrevida curta *in vitro*, comum em regenerantes de meloeiro, o que sugere a necessidade de realização de novos estudos com o objetivo de produzir plantas passíveis de serem utilizadas em trabalhos que envolvam a transformação genética.

Palavras-chave: Benzilaminopurina; melão; regeneração *in vitro*; transformação genética.

Hormonal combinations for cotyledonary organogenesis in muskmelon cv. Eldorado 300

Abstract: Because of its broad acceptance and agronomical importance, several studies aiming at muskmelon genetic improvement for various purposes, such as improvement of shelf life, have been described. However, the unavailability of effective systems for the genetic transformation and plant regeneration is a limiting factor for the application of genetic engineering for several cvs of muskmelon such as the Eldorado 300. The objective of this work was to develop an effective protocol for the regeneration of the cv Eldorado 300 (*Cucumis melo var. inodorus*), from cotyledonary explants, having sight its further application in genetic engineering programs. We tested three sources of cytokinins (benzylaminopurine (BAP), kinetin (Cin) and isopentenyladenine (2ip), in 3 concentrations (0,5; 1,0 and 1,5 mg L⁻¹), combined with 5 concentrations of indolacetic acid (AIA) (0,01; 0,05; 0,1; 0,4 and 0,8 mg L⁻¹) added to the MS basal medium + 0,26 mg L⁻¹ of abscissic acid (ABA). 1 mg L⁻¹ BAP + 0,8 mg L⁻¹ of AIA and 1,5 mg L⁻¹ of BAP + 0,01 mg L⁻¹ of AIA in the culture media were the most effective combinations of cytokinins and indol acetic acid towards the formation of both buds and shoots. However, the resulting plantlets presented abnormal morphology and short life *in vitro*, a common feature of regenerated muskmelon, which suggests the need for further studies aiming at the production of plantlets suitable to be used in genetic engineering programs.

Keywords: Benzylaminopurine; melon; *In vitro* regeneration; genetic transformation.

Introdução

Cucumis melo L. (meloeiro) é a mais diversa espécie do gênero *Cucumis*. A produção do meloeiro no Brasil teve início na década de 60, concentrando-se especialmente na região do Nordeste brasileiro (CARMO *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2017; VALADARES *et al.*, 2017).

Por ser um fruto bastante apreciado e de elevada importância agrônômica, trabalhos visando o melhoramento genético do meloeiro como, por exemplo, para o prolongamento do tempo de prateleira, através de retardo na maturação, têm sido relatados (AYUB *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2004; NUÑEZ-PALENIUS *et al.*, 2006; MORGADO *et al.*, 2015). Trabalhos baseados em engenharia genética, como transformação por *Agrobacterium*, apresentam grande potencial para avanços no melhoramento genético desta cultura (BAIRWA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011). Entretanto, a inexistência de sistemas adequados para transformação e regeneração de plantas é um fator limitante em diversas cultivares (cvs) de meloeiro (CHOVELON *et al.*, 2011), a exemplo da cultivar (cv) Eldorado 300.

Hormônios vegetais como auxinas e citocininas têm sido usados em meios de cultura de regeneração de melão, visando a indução de formação de gemas e brotos (REN *et al.*, 2012). Também o ácido abscísico (ABA) tem sido usado na cultura de tecidos por agir estimulando a ação de citocininas como benziladenina (BA) na formação de brotos de melão na organogênese (SHETTI *et al.*, 1992; NIEDZ *et al.*, 1989). Todavia, tanto variedades botânicas quanto cvs comerciais de melão apresentam genótipo especificidade quanto a sua capacidade regenerativa *in vitro*. Além disso, alterações morfológicas causadas por variação no nível de ploidia dos regenerantes, observadas ao longo da diferenciação, são comuns na cultura de tecidos do meloeiro, de forma que brotos com folhas retorcidas, deformadas e intumescidas, com desenvolvimento paralisado, sem enraizamento e com reduzida sobrevivência *in vitro*, têm sido frequentemente observados, o que faz esta espécie ser considerada como de difícil regeneração (CHOVELON *et al.*, 2011; REN *et al.*, 2012).

A cv de melão Eldorado 300 (*Cucumis melo* var. *inodorus*) foi desenvolvida nos anos 80 pela Embrapa, visando a obtenção de um material tolerante ao vírus do mosaico da melancia – WMV1, principal virose da cultura. Esta nova variedade apresenta resistência ao WMV1, maior produtividade e boa adaptação sendo produzido em todo país.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para regeneração eficiente *in vitro* da cv de meloeiro Eldorado 300 (*Cucumis melo* var. *inodorus*), a partir de explantes

cotiledonares, visando a posterior utilização deste protocolo de regeneração em trabalhos de transformação genética.

Material e Métodos

Sementes de melão (*Cucumis melo var. Inodorus*) cv. Eldorado 300 tiveram seus tegumentos retirados manualmente e esterilizados superficialmente em hipoclorito de sódio (2%, v/v) acrescido de 2 gotas do detergente Tween 20, por 20 minutos, seguido de 3 lavagens em água destilada e autoclavada. Em seguida, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado em 5,9 antes da autoclavagem, por 24 h, para germinação. Após, o embrião das sementes foi eliminado e os cotilédones foram divididos em 6 partes (explantes) e acondicionados em placas de Petri contendo diferentes composições de meios de cultura para regeneração. O meio de regeneração teve o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) como meio base suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado em 5,9 antes da autoclavagem. O meio de cultivo foi acrescido sempre de 0,26 mg L⁻¹ de ácido abscísico (ABA) e variando-se a fonte e concentração de citocinina e a concentração de auxina a partir de ácido indol acético (AIA).

Foram realizados 3 experimentos em paralelo, cada qual com uma fonte diferente de citocinina, à saber: benzilaminopurina (BAP), isopenteniladenina (2ip) e cinetina (Cin). Cada fonte de citocinina foi testada em diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹), em combinação com diferentes concentrações de ácido indol acético – AIA (0,05, 0,1, 0,4 e 0,8 mg L⁻¹) como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Fontes de citocinina (BAP, 2ip e Cin) combinadas com concentrações de ácido indol acético (AIA), utilizadas para compor 3 diferentes experimentos de organogênese a partir de fragmentos de cotilédone de melão.

Citocinina	Concentrações de citocinina (mg L ⁻¹)	Concentrações de AIA (mg L ⁻¹)
BAP	0,5	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
	1,0	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
	1,5	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
2ip	0,5	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
	1,0	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
	1,5	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
Cin	0,5	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
	1,0	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8
	1,5	0,05; 0,1; 0,4 e 0,8

Para todos os experimentos, o meio base utilizado foi MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado em 5,9 antes da autoclavagem e acrescido sempre de 0,26 mg L⁻¹ de ácido Abscísico (ABA).

O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 h por 45 dias sob intensidade luminosa de 25 μmol m⁻² s⁻¹. Após, ocorreu a avaliação de número de gemas por explante e número de brotações por explante para cada experimento. Brotos bem diferenciados, passíveis de isolamento do explante, foram transferidos para frascos contendo meio de cultura para enraizamento (MS/2, sem reguladores de crescimento).

Para cada experimento, o delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado em esquema fatorial duplo 3 x 5, sendo 3 concentrações de citocinina e 5 concentrações de auxina. Cada tratamento de cada experimento foi constituído de 5 repetições (placas de Petri) contendo 6 explantes por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e tiveram suas médias comparadas por teste Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Para realização da análise estatística usou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

Resultados e Discussão

Para o experimento realizado com a citocinina BAP, após 45 dias de cultivo, observou-se a formação de calos friáveis em explantes mantidos sobre meios de cultura contendo a menor concentração de BAP (0,5 mg L⁻¹) independentemente da concentração de ácido indol acético (Figuras 1A e 1B).

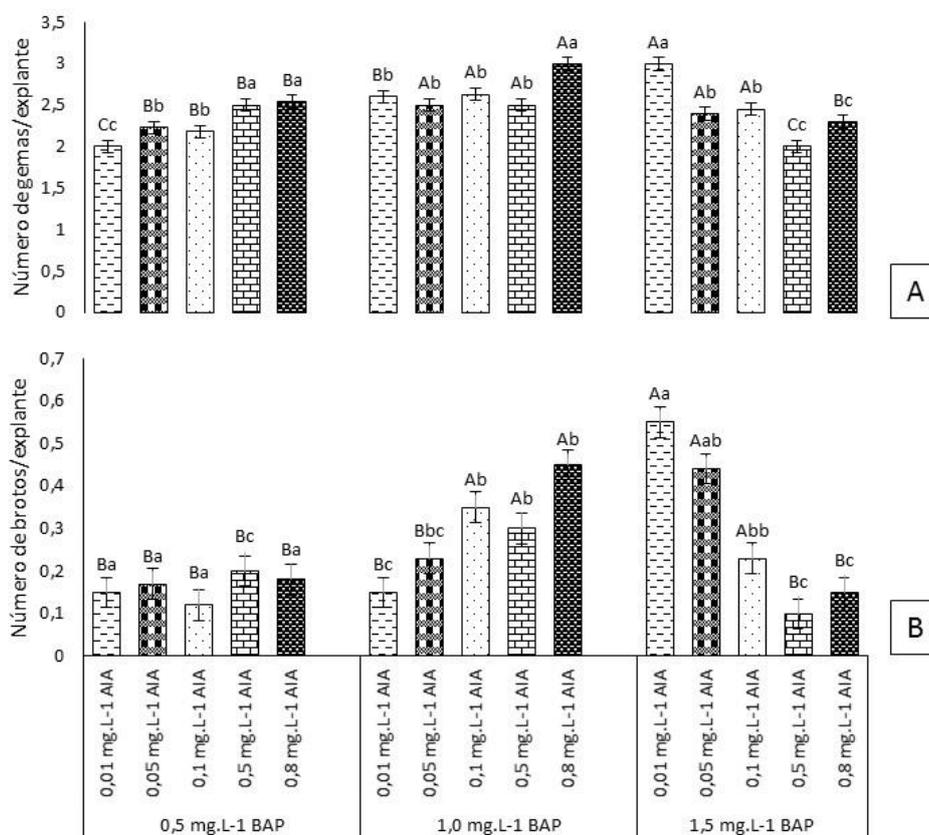
Figura 1 - Detalhes do desenvolvimento dos explantes submetidos à citocinina BAP em que (A): explante geralmente encontrado após duas semanas. (B): explante encontrado nos tratamentos com concentração mais baixa de BAP (0,5 mg L⁻¹) apresentando excesso de formação de calos friáveis e ausência de gemas e brotos. (C): aspecto geral dos brotos isolados, com morfologia anormal e curta sobrevida *in vitro*.



A concentração média de BAP (1 mg L^{-1}) no meio de cultura resultou em menor indução na formação de calos conforme o aumento da concentração de AIA. Enquanto que para a maior dose de BAP ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) ocorreu o contrário, havendo maior formação de calos conforme o aumento da concentração de AIA no meio de cultura.

Neste experimento, o maior número de gemas foi obtido nos tratamentos com 1 mg L^{-1} BAP + $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ AIA e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ AIA, apresentando uma média de aproximadamente 3 gemas por explante (Figura 2A). De forma semelhante, os maiores números de brotos por explante foram obtidos também nos tratamentos com 1 mg L^{-1} BAP + $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ AIA, e $,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ AIA e também no tratamento com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ AIA, com um número médio de aproximadamente 0,5 brotos por explante (Figura 2B).

Figura 2 - Efeito de diferentes combinações de BAP e AIA sobre: (A): formação de gemas e (B): brotos, a partir de explantes cotiledonares. Letras maiúsculas entre concentrações de BAP para a mesma concentração de AIA, e minúsculas dentro de cada concentração de BAP para as variações de concentração de AIA diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



A análise de trabalhos previamente publicados descrevendo a indução de formação de gemas e de brotações em outras variedades de melão demonstra que a citocinina BAP em

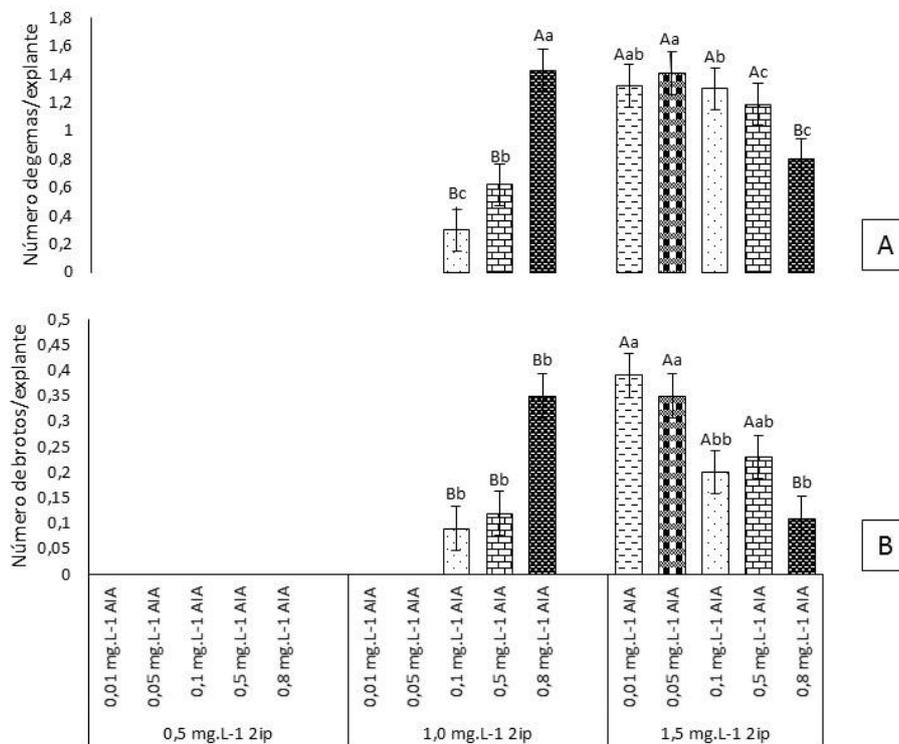
concentrações acima de 1 mg L^{-1} , é a citocinina mais frequentemente utilizada para a indução de formação de gemas e brotos em melão (NUÑEZ-PALENIUS, 2006). Por exemplo, combinação de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA (REN *et al.*, 2012) ou $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP sem adição de auxina (KENG e HOONG, 2005) são recomendadas para indução de brotações para variedade *inodorus*. Enquanto que combinação de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA é recomendada para a linhagem CM-15 de *Cucumis melo* L. (ZHANG *et al.*, 2011) e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA, para variedade *flexous* (YALCIN-MENDI *et al.*, 2010).

Todavia, segundo Bairwa *et al.* (2010), não há dose específica, mas sim um balanço ideal entre citocinina e auxina que induz a formação de gemas e brotos. Esta relação citocinina/auxina é bastante sensível, variando de acordo com a espécie e até mesmo com o genótipo utilizado. Geralmente uma relação citocinina/auxina maior que 1 é usada a fim de induzir a formação de gemas e brotações (NUÑEZ-PALENIUS *et al.*, 2008). Entretanto, diversos estudos têm indicado não haver necessidade da presença de auxina no meio de cultura para que haja indução de brotações em explantes de melão, além destes estudos também indicarem que a presença de auxina induz a formação de calos friáveis, inibindo a produção de brotos (KENG e HOONG, 2005; YALCIN-MENDI *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2012).

Para a cv Eldorado 300, o aumento na concentração de auxina (AIA) no meio de cultura estimulou a formação de gemas e de brotações, quando a concentração de BAP no meio de cultura era 1 mg L^{-1} . Todavia, quando a concentração de BAP no meio de cultura era igual a $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, o aumento na concentração de auxina (AIA) no meio de cultura inibiu a formação de gemas e de brotações. De fato, a eficiência na indução de gemas e brotos a partir de combinações de BAP na concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ com AIA em concentrações muito baixas, indica que a auxina não é um fator determinante para a ocorrência ou não de formação de gemas e brotos nesta cv.

Já para o experimento com explantes mantidos em meio de cultura contendo a citocinina 2ip, o maior número de gemas foi obtido nos tratamentos com 1 mg L^{-1} 2ip + $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ AIA, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2ip + $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ AIA e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2ip + $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ AIA, com o número médio de gemas por explante entre aproximadamente 1,3 e 1,4 (Figura 3A). Da mesma forma, o maior número de brotos foi obtido para os tratamentos com 1 mg L^{-1} 2ip + $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ AIA e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2ip + $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ AIA com uma média próxima de 0,4 brotos por explante (Figura 3B).

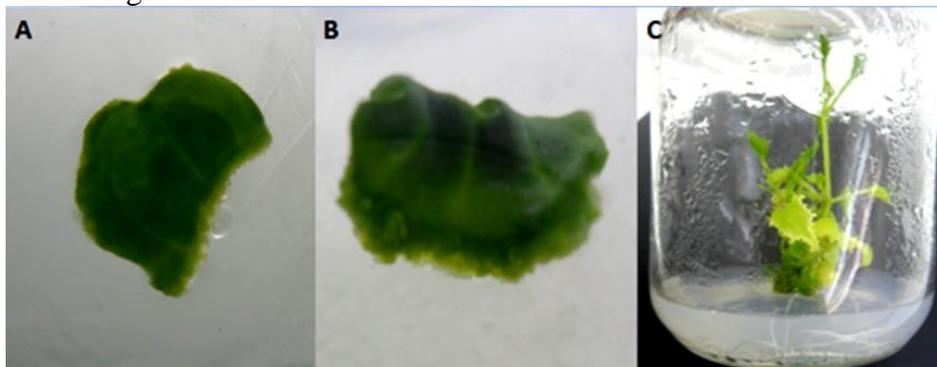
Figura 3 - Efeito de diferentes combinações de 2ip e AIA sobre: (A): a formação de gemas e (B): e de brotos, a partir de explantes cotiledonares. Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas entre linhas e minúsculas dentro de cada linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Ao final dos 45 dias de experimento foi observado que os explantes submetidos aos tratamentos correspondentes à menor concentração de 2ip testada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), não apresentaram nenhum tipo de organogênese, independente da concentração de AIA utilizada no meio de cultura (Figura 4A). Já aqueles submetidos aos tratamentos correspondendo as concentrações de 1 mg L^{-1} de 2ip + $0,01$ ou $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA respectivamente, apresentaram somente proliferação celular na região do corte dos explantes, sem qualquer evento organogenético até a avaliação (Figura 4B).

As citocininas são conhecidas por participar do controle do ciclo celular, estimular a divisão celular e a superação de dormência de gemas laterais, enquanto as auxinas influenciam no início da divisão celular, expansão celular e organização do meristema, promovendo a dominância apical. Logo, a modificação do balanço de citocinina/auxina endógeno através da presença destas no meio de cultura pode favorecer um padrão de desenvolvimento ou orientar uma organogênese desejável (GASPAR *et al.*, 2003).

Figura 4 - Aspecto do desenvolvimento dos explantes submetidos à citocinina 2ip. (A): explante encontrado nos tratamentos T1 a T5, 45 dias após a inoculação. (B): explante encontrado nos tratamentos T6 e T7, nos quais pode-se observar proliferação celular apenas na região do corte do explante. (C): aspecto geral do broto isolado, em meio de cultura destinado ao enraizamento, apresentando morfologia anormal e curta sobrevida *in vitro*.



A citocinina 2ip, embora bastante conhecida, é pouco relatada em estudos sobre regeneração de meloeiro. Chovelon *et al.* (2011) e Guis *et al.* (2000), por exemplo, obtiveram maiores taxas de regeneração de explantes cotiledonares através do uso de 0,20 mg L⁻¹ de 2ip associado à 0,20 mg L⁻¹ de BAP, possivelmente por um efeito sinérgico entre os dois tipos de citocinina utilizados, sendo ainda importante ressaltar que os efeitos variaram de acordo com o genótipo utilizado.

Em nenhum dos meios de cultura contendo combinações de cinetina (CIN) e ácido indol (AIA) acético foi observado qualquer tipo de diferenciação do explante original, a exemplo de formação de calos, gemas ou brotos.

O efeito diferencial de formas e concentrações de citocininas em diversos ensaios/sistemas é amplamente conhecido (SAKAKIBARA, 2006). Os resultados encontrados neste trabalho também demonstram que diferentes formas e concentrações de citocininas apresentam efeito diferencial sobre a regeneração de gemas e brotações no meloeiro cv Eldorado 300, sendo que, de maneira geral, a benzilaminopurina (BAP) é mais eficiente, quando comparada a outras formas de citocininas utilizadas neste estudo, na indução de gemas e brotos.

Citocinina oxidases/desidrogenases (CKXs) catalizam a degradação irreversível de citocininas através da clivagem da cadeia lateral (SAKAKIBARA, 2006). Todavia, o reconhecimento da ligação dupla da cadeia lateral das citocininas pelas CKXs impede a oxidação de citocininas aromáticas (ARMSTRONG, 1994) como a BAP (STRNAD, 1997), possibilitando com que estas apresentem atividade biológica por mais tempo. Portanto, o efeito

diferencial das diversas formas de citocininas encontrado no presente trabalho pode ser pelo menos parcialmente, explicado pela degradação da cinetina e do 2ip pelas CKXs e pela incapacidade daquelas enzimas de catabolizar citocininas aromáticas como a BAP.

De maneira semelhante ao que foi relatado por Ren *et al.* (2012) para as cultivares *Cantalupensis* e *Inodorus* de meloeiro, a maioria dos brotos obtidos neste estudo apresentou morfologia anormal, com folhas intumescidas, paralisação do crescimento e reduzida sobrevivência *in vitro*, independente da forma de citocinina utilizada (Figura 1C e Figura 4C). Estas alterações podem estar eventualmente associadas à alteração no nível de ploidia dos regenerantes, o que afetaria a estabilidade genômica dos mesmos (NUÑEZ-PALENIUS *et al.*, 2008).

A capacidade de regeneração de brotos *in vitro* das células diplóides de melão é maior que das células tetraplóides (EZURA e OOSAWA, 1994). O tipo de explante utilizado parece ser um dos principais fatores que afetam a ploidia das plantas regeneradas (Ren *et al.* 2013). Segundo Nuñez-Palenius *et al.* (2008), regeneração de brotos poliplóides de melão originados de explantes cotiledonares é um problema comum na cultura *in vitro*, possivelmente pela elevada probabilidade de a semente utilizada ter sido endopolinizada, o que causaria uma endorreducação cromossômica sem divisão celular.

Outros tipos de explantes como embriões somáticos, brotações, primórdios foliares e hipocótilos, embora emitam menor número de brotações por explante (GUIS *et al.*, 2000; CHOVELON *et al.*, 2011), resultaram em maior eficiência de regeneração, apresentando frequências mais baixas de plantas poliplóides em comparação com explantes cotiledonares (CURUK *et al.*, 2003). Assim, a formação de elevado número de regenerantes anormais observados neste estudo pode estar associada à regeneração de brotos poliplóides, originados a partir de explantes cotiledonares.

Conclusões

O enriquecimento do meio de cultura MS com as citocininas BAP e 2ip, em combinação com as auxinas AIA e ABA possibilita a indução de formação de gemas e brotos em explantes cotiledonares da cv Eldorado 300 de meloeiro. Neste trabalho, o maior número de gemas e brotações foi encontrado em explantes mantidos em meio de cultura contendo 1 mg L⁻¹ de BAP + 0,8 mg L⁻¹ de AIA e 1,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,01 mg L⁻¹ de AIA. Todavia, a formação de plantas com anomalias morfológicas observada neste trabalho sugere a necessidade de realização de novos estudos com o objetivo de produzir plantas passíveis de serem utilizadas em trabalhos que envolvam a transformação genética.

Agradecimentos

À CAPES pela disponibilização da bolsa de estudos e custeamento do projeto.

Referências

ARMSTRONG, D. J. Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: MOK, D. W. S.; MOK, M. C. (Ed.). *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p. 139–54.

AYUB, R.; GUIB, M.; AMOR, M. B.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J. P.; LATCHE, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature biotechnology*, New York, v.14, p.862-866, 1996.

BAIRWA, S. K.; TRIPATHI, M. K.; KUSHWAH, S. S.; BAGHEL, B. S.; TIWARI, S. Induction of somatic embryogenesis and organogenesis from hypocotyl of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, Irã, v.6, n.4, p. 687 - 702, 2010.

CARMO, I.L.G.S.; FERREIRA, R.S.; SOUZA, J.T.A.; FIGUEREDO, L.F.; MEDEIROS, R.D. Produção e qualidade de cultivares de melão em Savana de Boa Vista, Roraima. *Revista Agropecuária Técnica*, v. 38, n. 2, p. 78-83, 2017.

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*, Berlin, v.30, p. 2001-2011, 2011.

CURUK, S.; ANANTHAKRISHNAN, G.; SINGER, S.; XIA, X.; ELMAN, C.; NESTEL, D.; CETINER, S.; GABA, V. Regeneration in vitro from the hypocotyl of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. *HortScience*, Alexandria, v.38, p.105–109, 2003.

EZURA, H.; OOSAWA, K. Selective regeneration of plants from diploid and tetraploid cells in adventitious shoot cultures of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Tissue Culture Letters*, Oxford, v.11, p. 26–33, 1994.

FIGUEIRÊDO, M.C.B.; GONDIM, R.S.; ARAGÃO, F.A.S. **Produção de melão e mudanças climáticas: Sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 302p.

GASPAR, T. H.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CREVECOEUR, M.; PENEL, C. L.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Changing Concepts in Plant Hormone Action. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, Columbia, v.39, p.85–106, 2003.

GUIB, M.; AMOR, M. B.; LATCHE, A.; PEACH, 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**, Amsterdam, v. 84, p. 91–99, 2000.

KENG C. L.; HOONG L. K. In vitro plantlets regeneration from nodal segments of muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Biotechnology**, Frankfurt, v.4, p.354–357, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-496, 1962.

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

NUÑEZ-PALENIUS, H. G.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J.; CIARDI, J.; KLEE, H. J. Transformation of a muskmelon ‘Galia’ hybrid parental line (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.25, p.198–205, 2006.

NUÑEZ-PALENIUS, H. G.; GRUMET, R.; LESTER, G.; CANTLIFFE, D. Melon fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features. CRC - Critical Reviews in Biotechnology, **Boca Raton**, Florida, v.28, p.13–55, 2008.

REN, Y.; BANG, H.; CURTIS, I. S.; GOULD, J.; PATIL, B. S.; CROSBY, K. M. Agrobacterium-mediated transformation and shoot regeneration in elite breeding lines of western shipper cantaloupe and honeydew melons (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, p. 147-158, 2012.

REN, Y.; BANG, H.; GOULD, J.; RATHORE, K. S.; PATIL, B. S.; CROSBY, K. M. Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. *inodorus*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 49, p. 223-229, 2013.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. **Annual Review of Plant Biology**, California, v. 57, p.431–49, 2006.

SHETTY, K.; SHETTY, G.; EZURA, H.; OOSAWA, K. Simulation of Benziladenina-induced in vitro Shoot Organogenesis from Cotyledons of *Cucumis sativus* L. by Proline and Abscisic Acid. **Plant Tissue Culture Letters**, Oxford, v. 9, n. 2, pg. 104-108, 1992.

SILVA, J. A.; COSTA, T. S. Da.; LUCCHETTA, L.; MARIANI, L. J.; ZANUZO, M. R.; NORA, L.; NORA, A. F. R.; 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 Technology**, Amterdam, v. 32, p.263-268, 2004.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Revista Ciência e Agrotecnologia**. [online]. v.38, n.2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>>.

STRNAD, M. The aromatic cytokinins. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 101, p. 674-688, 1997.

VALADARES, R.N.; MELO, R.A.; SILVA, J.A.S.; ARAÚJO, A.L.R.; SILVA, F.S.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; MENEZES, D. Estimativas de parâmetros genéticos e correlações em acessos de melão do grupo momordica. **Horticultura Brasileira**, v.35, n.4, p.557-563, 2017.

YALCIN-MENDI, Y.; ELDOGAN, S.; GUTAKEV, R.; IPEK, M.; CURUK, P.; CETINER, S. Regeneration and histological analysis of snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus* (L.) Naudin) by direct organogenesis. **Turkish Journal of Agriculture**, Turkey, v.34, p. 309-317, 2010.

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