



# Growth regulators in the induction of calli in anthers of the Goldex hybrid yellow melon

## *Reguladores de crescimento na indução de calos em anteras de melão amarelo híbrido Goldex*

Frederico Inácio Costa de Oliveira<sup>1</sup>, Alexya Vitoria Felix Carvalho<sup>2</sup>, Fernando Antônio Souza de Aragão<sup>3</sup>, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho<sup>\*4</sup>

**Abstract:** The melon is of socio-economic importance, especially in the north-east of Brazil. Obtaining homozygous lines has been an obstacle in breeding programs. *In vitro* androgenesis is one alternative, requiring the development of protocols for anther culture. The aim of this work was to study the effect of auxins and cytokinins on callus induction in anthers of the Goldex hybrid yellow melon. Two experiments were conducted in a completely randomised design, with 25 replications. In the first experiment, in a 3 x 3 factorial scheme, the treatments comprised concentrations of 6-furfurylaminopurine - KIN (0.0, 3.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup>) and indolylacetic acid - IAA (0.0, 3.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup>), added to Murashige and Skoog (MS) medium. In the second experiment, six treatments were tested: MS with no growth regulator; MS + 0.20 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP); MS + 0.20 mg L<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA); MS + 0.45 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); MS + 0.20 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.20 mg L<sup>-1</sup> NAA; and MS + 0.20 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.45 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. The following were evaluated 60 days after anther inoculation: induction percentage, oxidation intensity, colour, texture, and the area and fresh weight of the callus. The auxins (IAA, NAA and 2,4-D) and cytokinins (KIN and BAP) induce callogenesis in anthers, but only in combination, the most suitable being 0.20 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.45 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. The calli have a beige colour, friable texture and medium oxidation, with a strong association between the fresh weight and the area.

**Key words:** Androgenesis. Callogenesis. *Cucumis melo*. Haploid. Tissue culture.

**Resumo:** A cultura do meloeiro tem importância socioeconômica, especialmente no Nordeste. A obtenção de linhagens homocigotas tem sido um entrave nos programas de melhoramento. A androgênese *in vitro* é uma alternativa, necessitando do desenvolvimento de protocolos de cultivo de anteras. Objetivou-se estudar o efeito de auxinas e citocininas na indução de calos, em anteras de meloeiro amarelo híbrido Goldex. Dois experimentos foram conduzidos, em delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições. No primeiro experimento, em esquema fatorial 3 x 3, os tratamentos foram gerados pelas concentrações de 6-furfurilaminopurina - CIN (0; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido indolilacético - AIA (0; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>), adicionadas ao meio de Murashige e Skoog (MS). No segundo experimento, testou-se seis tratamentos: MS sem regulador de crescimento; MS + 0,20 mg L<sup>-1</sup> 6-benzilaminopurina (BAP); MS + 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA); MS + 0,45 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); MS + 0,20 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,20 mg L<sup>-1</sup> ANA; e MS + 0,20 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,45 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. Aos 60 dias após inoculação das anteras foram avaliadas: porcentagem de indução, intensidade de oxidação, coloração, textura, área e massa fresca dos calos. As auxinas (AIA, ANA e 2,4-D) e as citocininas (CIN e BAP) induzem a calogênese em anteras, apenas em combinação, sendo a mais adequada 0,20 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,45 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Os calos apresentam coloração bege, textura friável, oxidação média e forte associação entre massa fresca e área.

**Palavras-chave:** Androgênese. Calogênese. *Cucumis melo*. Cultura de tecidos. Haploide.

\*Corresponding author

Submitted for publication on 29/12/2021, approved on 05/04/2022 and published on 07/06/2022

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: frederico.costa@ufrpe.br

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: alexyacarvalho@alu.ufc.br

<sup>3</sup>Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: fernando.aragao@embrapa.br

<sup>4</sup>Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), Rua Doutora Sara Mesquita, 2270, Bairro Pici, 60511-110, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: cristina.carvalho@embrapa.br

## INTRODUCTION

Family Cucurbitaceae includes several species of great socio-economic value, among them, the melon (*Cucumis melo* L.). In Brazil, the melon is a vegetable of significant importance, in 2019, more than 588 thousand tons were harvested in around 22 thousand hectares (FAO, 2021). The north-east of Brazil contributed to more than 90% of domestic production, notably, the states of Ceará and Rio Grande do Norte.

Due to their superior characteristics, commercial melon cultivars are mostly  $F_1$  hybrids. These hybrids are obtained from crosses between parents with a high degree of homozygosity, which is invaluable in genetic improvement programs (DONG *et al.*, 2016). However, using conventional breeding techniques, generating inbred lines requires intensive work, technology and significant resources, due to the successive rounds of self-pollination and backcrossing (KURTAR *et al.*, 2020). According to Oliveira (2018), in places where the melon crop advances only one cycle per year, this process can last for more than 10 years. Furthermore, even after successive advances over generations, it is not possible to obtain 100% homozygous material (KURTAR *et al.*, 2020).

Biotechnological techniques are viable alternatives compared to conventional breeding methods for obtaining pure lines in various crops (DUNWELL, 2010). With cucurbitaceae, three different techniques have been used to obtain haploid and dihaploid plants: *in situ* parthenogenesis, and *in vitro* gynogenesis and androgenesis, affording a recent notable advance (DONG *et al.*, 2016).

*In vitro* androgenesis has become the most used technique of obtaining dihaploid plants for most crops (AHMADI; EBRAHIMZADEH, 2020), and has been reported in several species of Cucurbitaceae, such as the pumpkin (HABIBA, 2016; KURTAR *et al.*, 2016; ARAGHI *et al.*, 2017; KURTAR, 2018), watermelon (ABDOLLAHI *et al.*, 2015; AKBAS; SOLMAZ, 2019; SILVA *et al.*, 2021), the ‘Vidinski’ and ‘Koravtsi’ (DRYANOVSKA; ILIEVA, 1983), and ‘Pele de Sapo’, ‘Amarelo’ and ‘Galia’ melon (MÉNDEZ, 2020), bitter melon (TANG *et al.*, 2012; USMAN *et al.*, 2015), and the cucumber (HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018; AMIRIAN *et al.*, 2019).

## INTRODUÇÃO

A família Cucurbitaceae inclui diversas espécies de grande valor socioeconômico, dentre elas, o meloeiro (*Cucumis melo* L.). No Brasil, o melão é uma hortaliça de expressiva relevância, em 2019 foram colhidas mais de 588 mil toneladas, em cerca de 22 mil hectares, em 2019 (FAO, 2021). A região Nordeste contribuiu com mais de 90% da produção nacional, com destaque para os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte.

Cultivares comerciais de meloeiro são, em sua maioria, híbridos  $F_1$ , devido às características superiores. Esses híbridos são obtidos a partir do cruzamento entre parentais com alto grau de homozigose, cujo valor é inestimável para os programas de melhoramento genético (DONG *et al.*, 2016). Entretanto, por meio das técnicas convencionais de melhoramento, a geração de linhagens puras requer trabalho intenso, tecnologia e recursos significativos, devido às sucessivas rodadas de autofecundação e retrocruzamentos (KURTAR *et al.*, 2020). De acordo com Oliveira (2018), em locais onde a cultura do meloeiro só avança um ciclo por ano, esse processo pode durar mais de 10 anos. Além disso, mesmo após os sucessivos avanços nas gerações, não é possível obter materiais 100% homozigotos (KURTAR *et al.*, 2020).

As técnicas biotecnológicas são alternativas viáveis em comparação aos métodos convencionais de melhoramento para obtenção de linhagens puras em várias culturas (DUNWELL, 2010). Em cucurbitaceae têm sido empregadas três diferentes técnicas visando à obtenção de plantas haploides e dihaploides: partenogênese *in situ*, ginogênese e androgênese *in vitro*, representando um avanço notável e recente (DONG *et al.*, 2016).

A androgênese *in vitro* tem se tornado a técnica mais empregada na obtenção de plantas dihaploides para a maioria das culturas (AHMADI; EBRAHIMZADEH, 2020), sendo relatada para várias espécies de Cucurbitáceas, tais como abóbora (HABIBA, 2016; KURTAR *et al.*, 2016; ARAGHI *et al.*, 2017; KURTAR, 2018), melancia (ABDOLLAHI *et al.*, 2015; AKBAS; SOLMAZ, 2019; SILVA *et al.*, 2021), melão ‘Vidinski’ e ‘Koravtsi’ (DRYANOVSKA; ILIEVA, 1983) e ‘Pele de Sapo’, ‘Amarelo’ e ‘Galia’ (MÉNDEZ, 2020), melão-de-são-caetano (TANG *et al.*, 2012; USMAN *et al.*, 2015) e pepino (HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018; AMIRIAN *et al.*, 2019).

Growth regulators are essential for the physiological processes that promote the formation of new plant tissue and, consequently, new organs. The composition and concentration of these substances in the culture medium are the most critical and determinant factors of growth and patterns of development in most systems of tissue culture (COSTA *et al.*, 2006). Auxins and cytokinins are the most used growth regulators in root, shoot and callus formation in *in vitro* culture. According to Taiz and Zeiger (2013), when combined with auxins, cytokinins tend to induce cell division in calli. Correctly balanced concentrations of these growth regulators are therefore necessary, in view of their effects on the morphogenesis of explants.

Considering that studies on *in vitro* androgenesis are rare in Brazil, and that obtaining haploid and dihaploid plants are important in melon breeding programs, the aim of this study was to investigate the effect of auxins and cytokinins on callus induction in anther explants of the Goldex hybrid yellow melon.

## MATERIAL AND METHODS

Two experiments were conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory of Embrapa Agroindústria Tropical, in Fortaleza, Ceará, from June to October 2016. In both experiments, anthers obtained from male flower buds of the Goldex hybrid yellow melon cultivated in a greenhouse, were used as explants, and were collected in the morning, one day before anthesis, as per the method described in the literature (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016).

Using a laminar flow hood, the buds were disinfested in 70% alcohol solution for one minute followed by a sodium hypochlorite solution (0.1% active chlorine) for 7.5 minutes. They were then rinsed three times with autoclaved distilled water for one minute each rinse. After disinfestation, the buds were opened with the aid of scalpels and tweezers, and the anthers excised. The MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) culture medium was used, supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and solidified with 1.8 g L<sup>-1</sup> agar (Gelzan®), including the addition or not of phytohormones based on the treatments.

Os reguladores de crescimento são essenciais para os processos fisiológicos que promovem a formação de novos tecidos, e consequentemente novos órgãos nos vegetais. A composição e concentração dessas substâncias no meio de cultivo são os fatores mais críticos e determinantes do crescimento e padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (COSTA *et al.*, 2006). As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na formação de raiz, parte aérea e calo no cultivo *in vitro*. De acordo com Taiz e Zeiger (2013) as citocininas tendem a induzir, quando combinadas às auxinas, a divisão celular em calos. Portanto, o correto balanço das concentrações desses reguladores de crescimento é necessário, tendo em vista seus efeitos na morfogênese dos explantes.

Tendo em vista que estudos sobre androgênese *in vitro* são escassos no Brasil, e que a obtenção de plantas haploides e dihaploides são importantes nos programas de melhoramento de meloeiro, assim, objetivou-se investigar o efeito de auxinas e citocininas na indução de calos, em explantes de anteras de meloeiro amarelo híbrido Goldex.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará, no período de junho a outubro de 2016. Nos dois experimentos foram utilizados como explantes anteras obtidas de botões florais masculinos, de plantas de meloeiro amarelo híbrido Goldex, cultivadas em casa de vegetação, coletados no período da manhã, um dia antes da antese, conforme método descrito na literatura (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016).

Em capela de fluxo laminar, os botões foram desinfestados com solução de álcool 70% por 1 minuto, a seguir em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%) por 7,5 minutos e, depois, passaram por três enxágues com água destilada autoclavada, por um minuto em cada enxágue. Após a desinfestação, os botões foram abertos com auxílio de bisturis e pinças, e as anteras excisadas. O meio de cultivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com ágar (Gelzan®) a 1,8 g L<sup>-1</sup>, com a adição ou não dos fitorreguladores, de acordo com os tratamentos.

The anthers were individually inoculated into 150 x 25 mm test tubes, containing 10 mL of the culture medium, and kept in a growth room at  $25 \pm 1$  °C, where they remained in the dark for seven days (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003). The explants were then transferred to a photoperiod of 16 h light at an intensity of  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

The experiments were carried out in a completely randomised design with 25 replications, each experimental unit comprising one test tube containing one explant. A 3 x 3 factorial scheme was used in the first trial, where treatments were obtained by combining concentrations of 6-furfurylaminopurine (KIN) (0.0, 3.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup>) with concentrations of indoleacetic acid (IAA) (0.0, 3.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup>), which were added to the MS culture medium. In the second trial, the design was completely randomised, with six treatments, consisting of: T1 (MS<sub>0</sub>) - MS with no growth regulator; MS with growth regulator: T2 (MS<sub>0,20B</sub>) - 0.20 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP); T3 (MS<sub>0,20A</sub>) - 0.20 mg L<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA); T4 (MS<sub>0,45D</sub>) - 0.45 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); T5 (MS<sub>0,20B;0,20A</sub>) - 0.20 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.20 mg L<sup>-1</sup> NAA; and T6 (MS<sub>0,20B;0,45D</sub>) - 0.20 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.45 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D.

The percentage of callus induction was verified 60 days after inoculation (DAI). The following variables were evaluated in the calli: oxidation intensity (low - up to one third oxidation of the weight of the callus; medium - from one third to two thirds oxidation; high - from two thirds to completely oxidised) as per the Oliveira methodology (2018), predominant colour (green and beige), predominant texture (compact and friable), area (mm<sup>2</sup>) and fresh weight (mg).

The data for the variables of each experiment were submitted to the normality test, carrying out transformation by the Box-Cox method when necessary. As such, an analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by grouping the mean values by the Scott-Knott test using the SAS free software system. The non-parametric Kruskal-Wallis test was applied to variables where transformation was not possible. Additionally, estimates of the Pearson correlation coefficients were obtained between the area and fresh weight of the calli, as well as the linear regression models. Descriptive statistics were used for the other variables.

As anteras foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio de 150 x 25 mm, contendo 10 mL do meio de cultivo, e mantidas em sala de crescimento, a  $25 \pm 1$  °C, permanecendo no escuro por um período de 7 dias (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003). Posteriormente, os explantes foram transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições, sendo cada unidade experimental formada por um tubo de ensaio contendo um explante. No primeiro ensaio, utilizou-se o esquema fatorial 3 x 3, cujos tratamentos foram obtidos pela combinação entre as concentrações de 6-furfurilaminopurina (CIN) (0,0; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>) e as de ácido indolacético (AIA) (0,0; 3,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>), adicionadas ao meio de cultivo MS; no segundo, o delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, que consistiram: T1 (MS<sub>0</sub>): MS sem regulador de crescimento; MS com regulador de crescimento, sendo: T2 (MS<sub>0,20B</sub>): 0,20 mg L<sup>-1</sup> 6-benzilaminopurina (BAP); T3 (MS<sub>0,20A</sub>): 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA); T4 (MS<sub>0,45D</sub>): 0,45 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D); T5 (MS<sub>0,20B;0,20A</sub>): 0,20 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,20 mg L<sup>-1</sup> ANA; e T6 (MS<sub>0,20B;0,45D</sub>): 0,20 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,45 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D.

Aos 60 dias após a inoculação (DAI) foi observada a porcentagem de indução de calos. Nos calos obtidos foram avaliadas as variáveis: intensidade de oxidação (baixa, até um terço da massa calosa oxidada; média, de um terço a dois terços de oxidação; alta, de dois terços a calos completamente oxidados) de acordo com a metodologia de Oliveira (2018), coloração predominante (verde e bege), textura predominante (compacto e friável), área (mm<sup>2</sup>) e massa fresca (mg).

Os dados das variáveis dos experimentos foram submetidos ao teste de normalidade, efetuando-se, quando necessário, a transformação pelo método de Box-Cox. Assim, realizou-se análise de variância (ANOVA) e em seguida o agrupamento das médias pelo teste Scott-Knott, utilizando-se o sistema computacional livre SAS. Para as variáveis em que não foi possível a transformação, aplicou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, foram obtidas as estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis área e massa fresca dos calos, bem como os modelos de regressão linear. Para as demais variáveis, procedeu-se estatística descritiva.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the first experiment, 60 days after anther inoculation, there was a significant effect ( $P \leq 0.05$ ) for the area and fresh weight of the calli as a function of the combinations of 6-furfurylaminopurine (KIN) and indoleacetic acid (IAA) added to the culture medium (Table 1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento houve efeito significativo ( $P \leq 0,05$ ) para a área e massa fresca dos calos em função das combinações de 6-furfurilaminopurina (CIN) e ácido indolacético (AIA) adicionadas ao meio de cultivo, aos 60 dias após a inoculação das anteras (Tabela 1).

**Table 1** - Callus induction, area and fresh weight in anther calli of the Golden hybrid yellow melon (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) in MS culture medium with different concentrations of 6-furfurylaminopurine (KIN) and indoleacetic acid (IAA), at 60 DAI of the anthers *in vitro*

**Tabela 1** - Indução de calos, área e massa fresca dos calos de antera de meloeiro (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) amarelo híbrido Goldex em meio de cultivo MS com diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (CIN) e ácido indolacético (AIA), aos 60 DAI das anteras *in vitro*

Treatment	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )		CI (%) <sup>1</sup>	Area (mm <sup>2</sup> ) <sup>2</sup>	Weight (mg) <sup>2</sup>
	IAA	KIN			
MS <sub>0,0</sub>	-	-	0	-	-
MS <sub>3,0</sub>	3.0	-	0	-	-
MS <sub>6,0</sub>	6.0	-	0	-	-
MS <sub>0,3</sub>	-	3.0	0	-	-
MS <sub>3,3</sub>	3.0	3.0	75.86	32.57 ± 2.93 b	137.44 ± 6.08 c
MS <sub>3,6</sub>	3.0	6.0	63.33	35.37 ± 2.95 b	139.90 ± 6.84 c
MS <sub>0,6</sub>	-	6.0	0	-	-
MS <sub>6,3</sub>	6.0	3.0	60.00	50.49 ± 5.41 b	175.34 ± 14.72 b
MS <sub>6,6</sub>	6.0	6.0	85.19	61.00 ± 4.42 a	200.92 ± 12.53 a

<sup>1</sup>CI (%) = percentage callus induction. <sup>2</sup>Mean values ± standard error followed by the same letter in a column do not differ significantly by the Kruskal-Wallis test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>1</sup>IC (%) = porcentagem de indução de calos. <sup>2</sup>Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente segundo o teste de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0,05$ ).

There was no callus formation on the melon anthers (Tables 1) in the MS culture medium with no growth regulators. Similar results were obtained with anthers of the pumpkin (ARAGHI *et al.*, 2017), bitter melon (USMAN *et al.*, 2015), watermelon (ABDOLLAHI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2021) and cucumber (HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018). As in the culture medium with no growth regulators, the anthers maintained in the media containing only auxin, IAA, or cytokinin, KIN developed no calli. After two weeks of *in vitro* culture, these anthers presented swelling and a beige colour, however, no calli were formed. Similar results were reported by Asadi *et al.* (2018) in cucumber anthers in the absence of the cytokinin and auxin combination, where there was no callus formation and anther necrosis occurred after four weeks of culture.

No meio de cultivo MS sem a presença de reguladores de crescimento, não ocorreu formação de calos nas anteras de meloeiro (Tabelas 1). Resultados semelhantes foram obtidos em anteras de abóbora (ARAGHI *et al.*, 2017), melão-de-são-caetano (USMAN *et al.*, 2015), melancia (ABDOLLAHI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2021), e pepino (HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018). Da mesma forma, que no meio de cultivo sem adição de reguladores de crescimento, as anteras mantidas nos meios contendo apenas auxina, AIA, ou citocinina, CIN, isoladamente, não desenvolveram calos. Essas anteras, após duas semanas de cultivo *in vitro*, apresentaram intumescimento e coloração bege, porém, sem a formação de calos. Resultados similares foram registrados por Asadi *et al.* (2018), em anteras de pepino, na ausência da combinação citocinina e auxina, não ocorrendo a formação de calos e sucedendo a necrose das anteras após quatro semanas de cultivo.

The IAA and KIN combinations, irrespective of concentration, promoted the formation of calli in the melon anthers, with the MS<sub>6,6</sub> combination determining superior area and weight to the other concentration combinations. These results confirm the hormone-balance theory, which states that close concentrations of auxin and cytokinin favour callogenesis (TAIZ *et al.*, 2017). Maximum callogenesis production was also recorded in cucumber anthers in a culture medium supplemented with auxins and cytokinins (HAMIDVAND *et al.*, 2013). The treatments that formed calli presented a beige colour, an oxidation intensity ranging from medium to high, and a predominantly friable texture (Table 2).

As combinações AIA e CIN, independentemente da concentração, promoveram a formação de calos nas anteras de meloeiro, sendo a combinação MS<sub>6,6</sub> que determinou área e massa superiores as demais combinações de concentração. Esses resultados ratificam a teoria do balanço hormonal, que preconiza que concentrações próximas de auxina e citocinina favorecem a calogênese (TAIZ *et al.*, 2017). Produção máxima de calogênese também foi registrada em anteras de pepino no meio de cultivo suplementado com auxinas e citocininas (HAMIDVAND *et al.*, 2013). Nos tratamentos que formaram calos, estes apresentaram coloração bege, intensidade de oxidação variando de média a alta e textura predominantemente friável (Tabela 2).

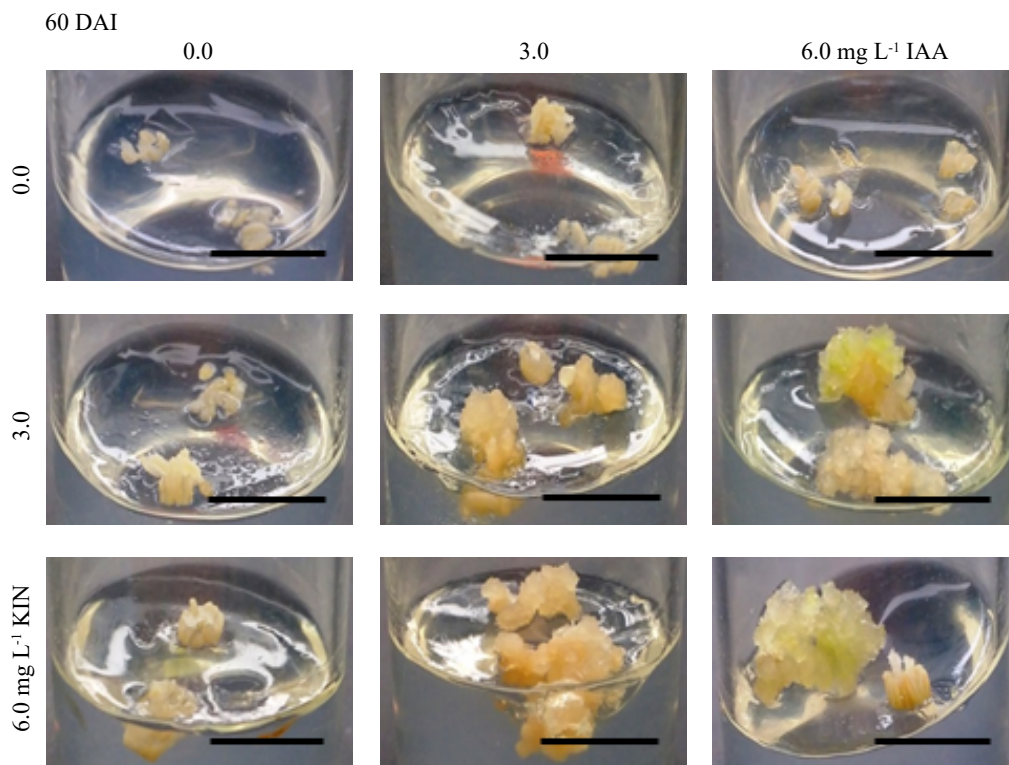
**Table 2** - Appearance and texture of calli obtained from anthers of the Goldex hybrid yellow melon (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*), in MS culture medium with different concentrations of 6-furfurylaminopurine (KIN) and indoleacetic acid (IAA), at 60 DAI of the anthers *in vitro*

**Tabela 2** - Aparência e textura em calos obtidos em anteras de meloeiro (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em meio de cultivo MS com diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (CIN) e ácido indolacético (AIA), aos 60 DAI das anteras *in vitro*

Treatment	Concentration		Colour		Oxidation Intensity			Texture			
	IAA	KIN	Beige	Green	Low	Medium	High	Compact	Friable		
	----(mg L <sup>-1</sup> )----		------(%)-----								
MS <sub>0,0</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MS <sub>3,0</sub>	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-		
MS <sub>6,0</sub>	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-		
MS <sub>0,3</sub>	-	3.0	-	-	-	-	-	-	-		
MS <sub>3,3</sub>	3.0	3.0	90.48	9.52	0.00	0.00	100.00	15.38	84.62		
MS <sub>3,6</sub>	3.0	6.0	90.48	9.52	0.00	23.81	76.19	20.00	80.00		
MS <sub>0,6</sub>	-	6.0	-	-	-	-	-	-	-		
MS <sub>6,3</sub>	6.0	3.0	83.33	16.67	0.00	0.00	100.00	28.00	72.00		
MS <sub>6,6</sub>	6.0	6.0	65.22	34.78	0.00	69.57	30.43	8.00	92.00		

Callus formation is a necessary step for the regeneration of haploid plants via *in vitro* anther culture (ASADI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021). For this to happen, cytokinins tend to induce cell division in calli when combined with auxins (TAIZ; ZEIGER, 2013). In this experiment, the greatest percentage of callus induction, as well as the greatest average area and weight, were recorded in the culture medium supplemented with the highest concentrations of both growth regulators, KIN and IAA (Figure 1).

A formação de calos é uma etapa necessária para a regeneração de plantas haploides por meio de cultura *in vitro* de anteras (ASADI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021). Para que isso ocorra as citocininas tendem a induzir, quando combinadas às auxinas, a divisão celular em calos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Nesse experimento, a maior porcentagem de indução de calos, bem como a maior área e massa médias, foram registradas no meio de cultivo suplementado com as concentrações mais altas de ambos os reguladores de crescimento, CIN e AIA (Figura 1).



**Figure 1** - Anther explants of the Goldex hybrid yellow melon (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*), at 60 DAI in MS culture medium with different concentrations of 6-furfurylamino-purine (KIN) and indoleacetic acid (IAA). Bar = 10.0 mm.

**Figura 1** - Explantes de antera de meloeiro (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, 60 DAI em meio de cultivo MS com diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (CIN) e ácido indolacético (AIA). Barra = 10,0 mm.

The predominant colour of the melon anther calli was beige (Table 2). In the first report found in the scientific literature on the *in vitro* culture of anthers of the same species as that under study, the calli showed a light green colour (DRYANOVSKA; ILIEVA, 1983). Studies have found that the calli formed on cucumber anthers in media supplemented with auxin and cytokinin, were generally yellowish in colour (ASADI *et al.*, 2018; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ASHOK KUMAR *et al.*, 2003), the same colour being reported by Kurtar *et al.* (2016) in the calli of pumpkin anthers. Silva *et al.* (2021) found that calli formed on watermelon anthers were a translucent white.

An increase in the cytokinin concentration of the culture medium raised the percentage of green-coloured calli (Table 2). Asadi *et al.* (2018) found that the production of green calli in cucumber anthers was higher in culture media containing high concentrations of cytokinin.

A coloração predominante nos calos de anteras de meloeiro foi a bege (Tabela 2). No primeiro relato da literatura científica sobre o cultivo *in vitro* de anteras na mesma espécie estudada, os calos apresentaram coloração verde-clara (DRYANOVSKA; ILIEVA, 1983). Estudos constataram que os calos formados nas anteras de pepino, nos meios suplementados também com auxina e citocinina, apresentavam de uma forma geral a cor amarelada (ASADI *et al.*, 2018; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ASHOK KUMAR *et al.*, 2003), sendo a mesma coloração relatada por Kurtar *et al.* (2016), nos calos de anteras de abóbora. Já Silva *et al.* (2021) verificaram que os calos formados nas anteras de melancia eram brancos translúcidos.

O aumento da concentração de citocinina, no meio de cultivo, elevou a porcentagem de calos com coloração verde (Tabela 2). Asadi *et al.* (2018) constataram que, a produção de calos de coloração verde nas anteras de pepino, foi maior nos meios de cultivo contendo altas concentrações de citocinina.

The intensity of callus oxidation ranged from medium to high (Table 2). Calli kept in MS<sub>3;0</sub> culture medium showed from two-thirds to all of the tissue darkened. It was also found that the MS<sub>3;6</sub> and MS<sub>6;6</sub> culture media had a lower oxidation intensity (Table 2). There are few studies that report evaluating oxidation in the *in vitro* culture of cucurbit anthers. Oxidation is an undesirable reaction in tissue culture, as it leads to the release and oxidation of phenolic compounds, which darken the explant tissue and inhibit its growth. Silva *et al.* (2021) state that increasing the auxin (2,4-D) concentration in the culture medium resulted in a higher percentage of oxidation, however, without causing phytotoxic effects capable of preventing the formation of calli on watermelon anthers.

The prevalent texture was friable (Table 2), with the same consistency found in anther calli of the melon (DRYANOVSTA; ILIEVA, 1983), watermelon (SILVA *et al.*, 2021), cucumber (ASADI *et al.*, 2018) and bitter melon (USMAN *et al.*, 2015).

In the second experiment, as in the first, callogenesis induction only occurred in anthers grown in culture media containing a combination of auxin and cytokinin (Tables 1 and 3). However, in the combination with BAP cytokinin and 2,4-D auxin, the anthers showed a higher percentage of callus induction (Table 3) compared to the KIN and IAA combination (Table 1).

A intensidade de oxidação dos calos variou de média a alta (Tabela 2). Os calos mantidos em meio de cultivo MS<sub>3;0</sub> apresentaram de dois terços a todo o tecido do calo escurecido. Constatou-se também que os meios de cultivo MS<sub>3;6</sub> e MS<sub>6;6</sub> apresentaram menor intensidade de oxidação (Tabela 2). São poucos os trabalhos que relatam a avaliação de oxidação no cultivo *in vitro* de anteras de cucurbitáceas. A oxidação é uma reação indesejável na cultura de tecidos, pois leva à liberação e oxidação de compostos fenólicos, que escurecem o tecido do explante e inibem seu crescimento. Silva *et al.* (2021) mencionam que o aumento da concentração de auxina (2,4-D) no meio de cultivo resultou em maior porcentagem de oxidação, entretanto, sem causar efeitos fitotóxicos capazes de prevenir a formação de calos nas anteras de melancia.

Em relação à textura, a friável foi a prevalente (Tabela 2), sendo a mesma consistência constatada nos calos de anteras de meloeiro (DRYANOVSTA; ILIEVA, 1983) melancia (SILVA *et al.*, 2021), pepino (ASADI *et al.*, 2018) e melão-de-são-caetano (USMAN *et al.*, 2015).

No segundo experimento, assim como no primeiro, a indução de calogênese só ocorreu nas anteras cultivadas nos meios de cultivo contendo a conjugação auxina e citocinina (Tabelas 1 e 3). Entretanto, na combinação com a citocinina BAP e a auxina 2,4-D as anteras apresentaram maiores porcentagens de indução de calos (Tabela 3), quando comparadas com as na combinação KIN e AIA (Tabela 1).

**Table 3** - Callus induction, area and fresh weight in anther calli of the Goldex hybrid yellow melon (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) in MS culture medium with different combinations of 6-benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), at 60 DAI of the anthers *in vitro*

**Tabela 3** - Indução de calos, área e massa fresca dos calos de antera de meloeiro (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) amarelo híbrido Goldex em meio de cultivo MS com diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D), aos 60 DAI das anteras *in vitro*

Treatment	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )			CI (%) <sup>1</sup>	Area (mm <sup>2</sup> ) <sup>2</sup>	Weight (mg) <sup>2</sup>
	BAP	NAA	2,4-D			
MS <sub>0</sub>	-	-	-	0.00	-	-
MS <sub>0,20B</sub>	0.20	-	-	0.00	-	-
MS <sub>0,20A</sub>	-	0.20	-	0.00	-	-
MS <sub>0,45D</sub>	-	-	0.45	0.00	-	-
MS <sub>0,20B;0,20A</sub>	0.20	0.20	-	92.86	40.62 ± 8.89 b	67.47 ± 15.14 b
MS <sub>0,20B;0,45D</sub>	0.20	-	0.45	100.00	93.93 ± 9.72 a	211.70 ± 24.31 a

CI (%) = percentage callogenesis. <sup>1</sup>Data transformed by the Box-Cox method. <sup>2</sup>Mean values followed by the same letter in a column do not differ significantly by the Scott-Knott test ( $P \leq 0.05$ ).

IC (%) = índice de calogênese. <sup>1</sup>Dados transformados pelo método de Box-Cox. <sup>2</sup>Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).



Between the two auxins under test, the MS<sub>0,20B;0,45D</sub> treatment afforded the highest induction percentage and, statistically, the greatest area and fresh weight in the calli (Table 3). The 2,4-D and BAP combination also induced greater callus formation in cucumber anthers (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018). Furthermore, Abdollah *et al.* (2016) identified that only the calli formed with this combination were haploid and dihaploid. Similar results were recorded in the pumpkin (ARAGHI *et al.*, 2017), showing that the culture medium supplemented with 2,4-D and BAP stimulated a higher percentage of callogenesis compared to the combination of NAA and BAP.

The 2,4-D auxin stands out as the most suitable and effective for inducing androgenesis in the species of family Cucurbitaceae (ABDOLLAHI *et al.*, 2015; 2016; DONG *et al.*, 2016). Mendéz (2020) confirms the importance of supplementing the culture medium with this auxin for inducing calli in melon, and Habiba (2016) in squash. On the other hand, Asadi *et al.* (2018) point out that despite the need to add an auxin to the culture medium for calli to proliferate, the result of the 2,4-D concentrations have a less important effect than those of BAP, indicating that organogenesis is strongly dependent on the BAP concentration in inducing haploid and dihaploid calli.

The predominant colour of the calli for the culture media made from a combination of the BAP and NAA hormones (MS<sub>0,20B;0,20A</sub>) and BAP and 2,4D (MS<sub>0,20B;0,45D</sub>) was beige, with all of them showing a friable texture (Table 4).

Entre as duas auxinas testadas, o tratamento MS<sub>0,20B;0,45D</sub> proporcionou maior porcentagem de indução e, estatisticamente, as maiores áreas e massas frescas dos calos (Tabela 3). A combinação 2,4-D e BAP, também, induziu maior formação de calos nas anteras de pepino (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003; HAMIDVAND *et al.*, 2013; ABDOLLAHI *et al.*, 2016; ASADI *et al.*, 2018). Além disso, Abdollah *et al.* (2016) identificaram que apenas os calos formados, nessa combinação eram haploides e dihaploides. Resultados semelhantes foram registrados em abóbora (ARAGHI *et al.*, 2017) indicando que o meio de cultivo suplementado com 2,4-D e BAP estimulou maiores porcentagens de calogênese quando comparado à combinação ANA e BAP.

A auxina 2,4-D destaca-se como a mais adequada e eficaz para a indução de androgênese em espécies da família Cucurbitaceae (ABDOLLAHI *et al.*, 2015; 2016; DONG *et al.*, 2016). Mendéz (2020) ratifica a importância da suplementação do meio de cultivo com essa auxina para a indução de calos em meloeiro e Habiba (2016) em aboboreira. Por outro lado, Asadi *et al.* (2018) ressaltam que apesar da necessidade da adição de uma auxina, ao meio de cultivo, para a proliferação de calos, o resultado das concentrações de 2,4-D, possuem efeito menos relevante do que as de BAP, indicando que a organogênese é fortemente dependente da concentração de BAP, na indução de calos haploides e dihaploides.

A coloração predominante dos calos, para os meios de cultivo efetivos pela combinação dos hormônios BAP e ANA (MS<sub>0,20B;0,20A</sub>) e BAP e 2,4D (MS<sub>0,20B;0,45D</sub>) foi bege e todos apresentaram textura friável (Tabela 4).

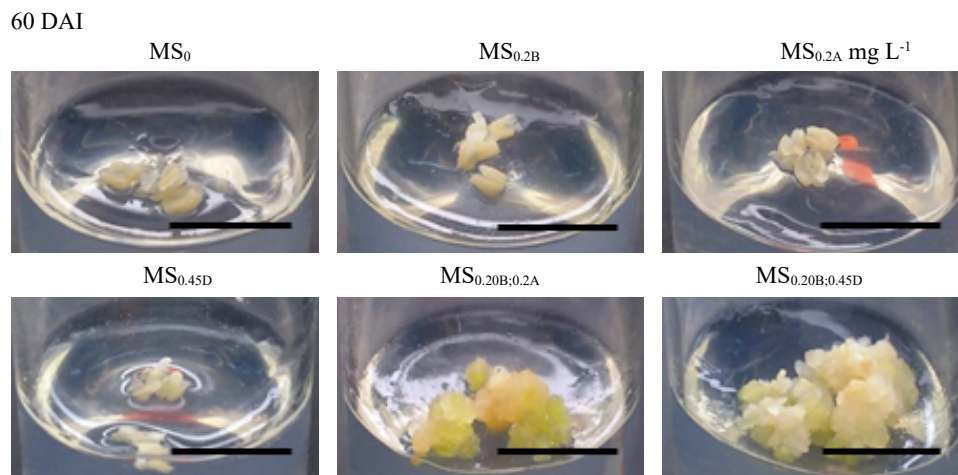
**Table 4** - Appearance and texture of calli obtained from anthers of the Goldex hybrid yellow melon (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*), in MS culture media with different combinations of 6-benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), at 60 DAI of the anthers *in vitro*

**Tabela 4** - Aparência e textura em calos obtidos de antera de meloeiro (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, em meios de cultivo MS com diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), aos 60 DAI das anteras *in vitro*

Treatment	Concentration			Colour		Oxidation Intensity			Texture	
	BAP	NAA	2,4-D	Beige	Green	Low	Medium	High	Compact	Friable
	----- (mg L <sup>-1</sup> ) -----			----- (%) -----						
MS <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS <sub>0,20B</sub>	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS <sub>0,20A</sub>	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-
MS <sub>0,45D</sub>	-	-	0.45	-	-	-	-	-	-	-
MS <sub>0,20B;0,20A</sub>	0.20	0.20	-	84.6	15.4	7.7	76.9	15.4	0.0	100.0
MS <sub>0,20B;0,45D</sub>	0.20	-	0.45	85.7	14.3	7.1	92.9	0.0	0.0	100.0

It can be seen in the literature that the calli formed on cucumber anthers in the medium containing BAP and 2,4-D, were of a creamy (ASADI *et al.*, 2018) to yellowish colour (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003). Cucumber anthers grown in media containing BAP combined with 2,4-D or NAA formed creamy-coloured calli with a friable texture, however, in the presence of NAA, the frequency was lower and the size was smaller (ASADI *et al.* 2018), similar to results recorded in the melon (Tables 3 and 4). Kurtar *et al.* (2016) point out that the addition of 2,4-D combined with BAP, resulted in an increase in yellowish calli in squash. Despite over 90% of the calli showing a medium level of oxidation, the culture medium containing BAP and 2,4-D did not show a high rate of oxidation (Figure 2).

Na literatura verifica-se que os calos formados nas anteras de pepino, no meio contendo BAP e 2,4-D apresentaram coloração creme (ASADI *et al.*, 2018) a amarelada (ASHOK KUMAR *et al.*, 2003). As anteras de pepino cultivadas nos meios contendo BAP combinada com 2,4-D ou ANA formaram calos de coloração creme e textura friável, entretanto em menor frequência e tamanho na presença de ANA (ASADI *et al.* 2018), resultados semelhantes aos registrados para o meloeiro (Tabelas 3 e 4). Kurtar *et al.* (2016) ressaltam que a adição de 2,4-D, combinada com BAP, resultou no aumento de calos de coloração amarelada em aboboreira. Embora mais de 90% dos calos tenham apresentado nível médio de oxidação, o meio de cultivo contendo BAP e 2,4-D não apresentou índice de oxidação alta (Figura 2).



**Figure 2** - Anther explants of the Goldex hybrid yellow melon (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*), at 60 DAI in MS culture medium with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP - B), naphthaleneacetic acid (NAA - A) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D - D). Bar = 10.0 mm.

**Figura 2** - Explantes de de antera de meloeiro amarelo (*Cucumis melon* L. var. *inodorus*) híbrido Goldex, 60 DAI em meio de cultivo MS com diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP - B), ácido naftalenoacético (ANA - A) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D - D). Barra = 10,0 mm.

There was a significant positive correlation between the area and fresh weight of the calli in both experiments. The generated linear regression models were significant, and showed high coefficients of determination in each experiment, ensuring the reliability of the regressions (Table 5).

Houve correlação positiva e significativa entre área e massa fresca dos calos, nos dois experimentos. Os modelos de regressão linear gerados foram significativos e apresentaram altos coeficientes de determinação nos dois experimentos, assegurando a confiabilidade das regressões (Tabela 5).

**Table 5** - Correlation and linear regression between area (A) and fresh weight (M) of the calli formed in anthers of the Goldex hybrid yellow melon (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) in the two experiments

**Tabela 5** - Correlação e regressão linear entre a área (A) e a massa fresca (M) dos calos formados em anteras de meloeiro (*Cucumis melo* L. var *inodorus*) amarelo híbrido Goldex, nos dois experimentos

Experiment <sup>1</sup>	r (A,M) <sup>2</sup>	Model <sup>3</sup>	F-test	r <sup>2</sup>
1	0.989**	M = 48.777 + 2.528 a **	3.522.237	0.98
2	0.931**	M = - 11.100 + 2.247 a **	162.710	0.93

<sup>1</sup>Experiment 1: in MS culture medium with different concentrations of 6-furfurylaminopurine (KIN) and indoleacetic acid (IAA); experiment 2: in MS culture medium with different combinations of 6-benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); <sup>2</sup>Pearson correlation between the area and fresh weight of the calli. <sup>3</sup>Linear regression model between the area and fresh weight of the calli. \*\*/significance ( $P \leq 0.01$ ) of the t-test and the F-test for the correlation and analysis of variance of the regression between the area and the fresh weight of the calli, respectively.

<sup>1</sup>Experimento 1: em meio de cultivo MS com diferentes concentrações de 6-furfurilaminopurina (CIN) e ácido indolacético (AIA); experimento 2: em meio de cultivo MS com diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D); <sup>2</sup>correlação de Pearson entre a área e a massa fresca dos calos. <sup>3</sup>Modelo da regressão linear entre a área e a massa fresca dos calos. \*\*/ significância ( $P \leq 0,01$ ) para o teste t e para o teste F, da correlação e da análise de variância da regressão entre a área e a massa fresca dos calos, respectivamente.

In relation to the correlation coefficients based on the results, although the calli are three-dimensional structures, an analysis of their area on millimetre paper shows the area to be closely associated with the fresh weight. For experiments of callogenesis induction in anther explants carried out in Petri dishes, calculating the area would be a suitable alternative to measuring the fresh weight, since the areas can be quantified directly in the calli inoculated into the dish, without handling the explant or exposing it to the environment and, consequently, avoiding any possibility of contamination, even under aseptic conditions.

Considering that so far, the only way to obtain haploid and dihaploid plants in cucurbitaceae is through the intermediate stage of callus induction via organogenesis or embryogenesis, studies on callogenesis are extremely important, taking into account both the growing conditions and the genotypes of the anther-donor plants (ASADI *et al.*, 2018). Regarding the *in vitro* culture conditions, androgenesis in this family is strongly influenced by the concentration of the NAA and 2,4-D auxins and the BAP and KIN cytokinins (KURTAR *et al.*, 2016; 2020). Further studies are needed in order to establish efficient protocols for the induction of dihaploid plants via organogenesis or embryogenesis as one step in the breeding program of the Goldex hybrid yellow melon.

Com base nos resultados obtidos, em relação aos coeficientes de correlação, pode-se inferir que embora os calos sejam estruturas tridimensionais, a análise da área, sobre papel milimetrado, tem estreita associação com sua massa fresca. Para experimentos de indução de calogênese em explantes de anteras realizados em placas de Petri, o cálculo da área seria uma alternativa adequada à medição da massa fresca, uma vez que as áreas podem ser quantificadas diretamente nos calos inoculados na placa, evitando o manuseio do explante, e sem a sua exposição ao ambiente, e consequentemente a possibilidade de contaminação, mesmo que em condições assépticas.

Tendo em vista que a única forma, até o presente, de obtenção de plantas haploides e dihaploides, em cucurbitáceas, é por meio da etapa intermediária de indução de calos, via organogênese ou embriogênese, estudos sobre calogênese são extrema relevância, levando-se em consideração as condições de cultivo e os genótipos das plantas doadoras de anteras (ASADI *et al.*, 2018). Em relação às condições de cultivo *in vitro*, a androgênese, nessa família, é fortemente influenciada pelas concentrações das auxinas ANA e 2,4-D e das citocininas BAP e CIN (KURTAR *et al.*, 2016; 2020). Estudos posteriores são necessários a fim de estabelecer protocolos eficientes para indução, via organogênese ou embriogênese, de plantas dihaploides, como uma etapa do programa de melhoramento em meloeiro amarelo híbrido Goldex.

## CONCLUSIONS

The auxin and cytokinin combination induces callus formation in anthers of the Goldex hybrid yellow melon;

The predominant colour of the calli is beige and the texture friable;

Cytokinin BAP in combination with 2,4-D, in addition to stimulating the formation of friable calli in all anthers, also reduces oxidation intensity;

There is a strong association between the fresh weight and area of the calli formed on the anthers.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (Doctoral Scholarship, granted to the first author), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Productivity Scholarship, process no. 312139/2017-9, granted to the penultimate author). The authors also wish to thank Embrapa Agroindústria Tropical-CNPAT for their scientific and financial support.

## CONCLUSÕES

A combinação auxina e citocinina induz a formação de calos em anteras de meloeiro amarelo híbrido Goldex;

A coloração predominante dos calos é bege e a textura friável;

A citocinina BAP, em combinação com 2,4-D, além de estimular a formação de calos friáveis em todas as anteras, também reduz a intensidade de oxidação;

Há forte associação entre a massa fresca e a área dos calos formados nas anteras.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (Bolsa de doutorado, concedida ao primeiro autor), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Bolsa de produtividade, processo 312139/2017-9, concedida ao penúltimo autor) e à Embrapa Agroindústria Tropical-CNPAT) pelo apoio científico e financeiro.

## CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- ABDOLLAHI, M. R.; DARBANDI, M.; HAMIDVAND, Y.; MAJDI, M. The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.). **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 3, p. 447-456, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0152-z>
- ABDOLLAHI, M. R.; NAJAFI, S.; SARIKHANI, H.; MOOSAVI, S. S. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture médium. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, p. 571-579, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3906/biy-1502-55>
- AHMADI, B.; EBRAHIMZADEH, H. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 299-316, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02509-z>
- AKBAS, F. C.; SOLMAZ, I. Obtention of haploid plant in *Citrullus lanatus* var. *lanatus* and *Citrullus lanatus* var. *citroides* species by anther culture. **Method International Journal of Environmental Research and Technology**, v. 2, n. 3, p. 25-36, 2019.
- AMIRIAN, R.; HOJATI, Z.; AZADI, P. Male flower induction significantly affects androgenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 9p. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1655488>
- ARAGHI, Z. M.; ABDOLLAHI, M. R.; ASL, A. M.; HAMZEI, J.; MOUSAVI, S. S. The study on the effect of anther orientation, type and composition of culture medium and ovary co-culture on callus induction from cultured anthers of pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *Styriaca*). **Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 19-32, 2017. DOI: <https://doi.org/10.22084/AB.2017.2267>
- ASADI, A.; ZEBARJADI, A.; ABDOLLAHI, M. R.; SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**, v. 214, n. 216, p. 1-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x>
- ASHOK KUMAR, H. G.; MURTHY, H. N.; PAEJ, K. Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 213-222, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00003-7)
- COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; ALMEIDA, W. A. B. **Morfogênese in Vitro**. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. Introdução à Micropropagação de Plantas. 1 ed. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. Cap. 6, p. 113-130.
- DONG, Y. Q.; ZHAO, W. X.; LI, X. H.; LIU, X. C.; GAO, N. N.; HUANG, J. H.; WANG, W. Y.; XU, X. L.; TANG, Z. H. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 10, p. 1991-2019, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>
- DRYANOVSKA, O. A.; ILIEVA, I. N. *In vitro* anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences**, v. 36, n. 8, p. 1107-1110, 1983.
- DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 377-424, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x>
- FAO. Faostat – Statistics Database. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#home> >. Acessado 12 de dezembro de 2021.
- HABIBA, R. M. M. Effect of genotypes, sucrose concentrations and their interaction on anther culture response on summer squash. **Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 113-120, 2016.
- HAMIDVAND, Y.; ABDOLLAHI, M. R.; CHAICHI, M.; MOOSAVI, S. S. The effect of plant growth regulators on callogenesis and gametic embryogenesis from anther culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 5, n. 10, p. 1089-1095, 2013.
- KURTAR, E. S. Effects of anti-mitotic agents on dihaploidization and fertility in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) androgenic haploids. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 17, n. 5, p. 3-14, 2018.

- KURTAR, E. S.; BALKAYA, A.; KANDEMIR, D. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 127, p. 497-511, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1074-6>
- KURTAR, E. S.; SEYMAN, M.; KAL, U. An overview of doubled haploid plant production in *Cucurbita* species. **Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Science**, v. 30, n. 3, p. 510-520, 2020. DOI: <https://doi.org/10.29133/yyutbd.741087>
- MÉNDEZ, A. P. Optimización del protocolo de obtención de dobles haploides em *Cucumis melo*. 2020. 45f. Dissertação (Mestrado em Técnicas avanzadas em investigación y desarrollo agrario y alimentario) - Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, Espanha.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, F. I. C. Cultura de tecidos e cruzamentos interespecíficos visando obtenção de haploides de melão. 2018. 81f. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.
- SILVA, C. M. J.; DIAS, R. C. S.; MELO, N. F. The effect of temperature and growth regulators on callus induction in watermelon anthers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, e21180505, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021180505>
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2013. 952p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p.
- TANG, Y.; LI, X.; LI, J.; MA, C.; LAI, J.; LI, H. Effect of different pretreatment on callus formation from anther in balsam pear (*Momordica charantia* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 17, p. 3393-3395, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1752>
- USMAN, M.; BAKHSH, K.; FATIMA, B.; ZAMAN, Q.; SHAH, M. H. Exploring embryogenic competence in anthers of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) cultivar Faisalabad Long. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 25, n. 1, p. 181-188, 2015.