

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 17

Campinas, novembro de 1958

N.º 5

A POLIPLOIDIA ARTIFICIAL NA OBTENÇÃO DE MELANCIA SEM SEMENTES (*)

DIXIER M. MEDINA, *engenheiro-agrônomo, Seção de Citologia*, OLÍMPIO T. PRADO, *engenheiro-agrônomo, Seção de Olericultura e Floricultura*, A. J. T. MENDES, *engenheiro-agrônomo, Seção de Citologia e* CARLOS ROESSING, *engenheiro-agrônomo, Estação Experimental de Limeira, Instituto Agrônomo*

RESUMO

Frutos desprovidos de sementes apresentam não só o interesse de estudos científicos sobre partenocarpiã como também constituem um característico desejável para o consumidor.

Tendo-se planejado a obtenção de melancias (*Citrullus vulgaris* Shrad.) sem sementes, da variedade Keckley Sweet, executaram-se os trabalhos de laboratório e de campo de acordo com o esquema seguinte:

- a) obtenção de plantas tetraplóides;
- b) cruzamentos entre tetraplóides e diplóides;
- c) plantio das sementes triplóides.

A primeira parte consistiu de tratamentos de sementes diplóides ($2n=22$) recém-germinadas, por solução de colquicina (0,1% durante 8-12 horas), tendo-se conseguido mais de duas dezenas de plantas duplicadas ($2n=44$). Diferençaram-se estas plantas das diplóides normais, pelo modo de ramificação bem menos intenso, e por apresentarem folhas maiores e menos recortadas e flôres também maiores. Os frutos produzidos pelas plantas tetraplóides são menores, arredondados, contendo poucas sementes.

Na segunda parte foram efetuados cruzamentos entre tetraplóides e diplóides, só se obtendo frutos no sentido $\text{♀ } 4n \times \text{♂ } 2n$; quando o cruzamento efetuado foi inverso, isto é, $\text{♀ } 2n \times \text{♂ } 4n$ não houve fertilização.

Na terceira etapa, semeadas as sementes triplóides, com algumas linhas de diplóides entremeadas, conseguiram-se os esperados frutos sem sementes. Estes se mostram, externamente, intermediários entre os diplóides, que são alongados, e os tetraplóides, arredondados; internamente, os frutos triplóides contêm apenas sementes atrofiadas, flácidas e que podem ser comidas juntamente com a polpa, sem necessidade de separação.

No decorrer da investigação foram realizados alguns estudos comparativos do pólen, dos estomas e das sementes, nos três tipos de plantas.

O trabalho continua no sentido de remover dificuldades encontradas tanto na multiplicação das sementes tetraplóides como na germinação das sementes triplóides e tetraplóides.

(*) Os autores agradecem ao Eng.º Agr.º Armando Conagin, pelas análises estatísticas realizadas. Recebido para publicação em 16 de novembro de 1957.

1 — INTRODUÇÃO

A cultura da melancia (*Citrullus vulgaris*, Shrad.) se estende por todo o Brasil, cabendo as maiores colheitas aos Estados da Bahia, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Calcula-se que em 1956 a área cultivada foi de 81 mil hectares, cuja produção se avaliava em 252 milhões de cruzeiros.

No Estado de São Paulo a cultura se iniciou de modo extensivo no município de Americana, há cêrca de um século. Hoje é plantada em diferentes pontos do Estado, como São Pedro, Piraçununga, Bauru, Tupã, Moji Mirim etc.

Há quinze anos os agricultores do Estado se ressentiram da falta de boas sementes de melancia. Foi quando a Seção de Olericultura e Floricultura do Instituto Agrônômico de Campinas iniciou ensaios de competição de variedades, estudando-as quanto a moléstias e à conservação durante o transporte, ao formato, à produção, ao sabor e, principalmente, à aceitação pelos mercados consumidores. Estudando 26 variedades, concluiu-se que tão somente três delas apresentavam um conjunto de qualidades que as recomendavam: a Florida Favorite, a Tom Watson e a Keckley Sweet.

O número de sementes nos frutos normais dessas variedades oscila entre 500 a 1 000 e é de se crer que um fruto sem sementes será apreciado no mercado consumidor e, portanto, alcançará um preço melhor. No Japão já se cultivam variedades híbridas, sem sementes. Os Estados Unidos importam essas variedades para estabelecer suas culturas de melancia sem sementes; nesse país, entretanto, já se iniciaram experiências no sentido de obter variedades próprias, desprovidas de sementes.

Julgou-se, portanto, que seria interessante conseguir frutos sem sementes de uma das três variedades mais cultivadas em S. Paulo.

As primeiras experiências foram feitas pelas Seções de Olericultura e Floricultura e de Fisiologia, do Instituto Agrônômico, pulverizando-se flôres recém-abertas com os seguintes hormônios: ácido beta-naftilacético 10^{-3} ; ácido beta-naftilacético 10^{-4} ; hortomone A e Seradix A, não se tendo conseguido a formação de um fruto, sequer. O método, aliás, é dispendioso e de resultados inseguros para aplicação em culturas de grande extensão.

Foi então iniciada colaboração entre a Seção de Olericultura e

Floricultura e a de Citologia, resolvendo-se encaminhar a solução do problema pela obtenção de frutos triplóides, valendo-se da sua provável esterilidade. Coube a execução dos tratamentos e o estudo do material ao primeiro dos autores, com a colaboração dos demais. Escolheu-se a variedade Keckley Sweet para início dos trabalhos, que consistiram no seguinte: a) duplicação do número de cromossomos, obtendo-se linhagens tetraplóides; b) cruzamento de di- e tetraplóides, para obtenção de triplóides; c) polinização artificial das flôres femininas triplóides com pólen de plantas di- ou tetraplóides, procurando estabelecer linhagens compatíveis cujo pólen induza o desenvolvimento do ovário triplóide sem fecundação, daí resultando os frutos sem sementes. Após essa sucessão de experimentos, caberia ao Instituto Agrônômico manter as linhagens tetraplóides e diplóides, produzir as sementes híbridas e distribuí-las aos interessados, anualmente.

As experiências foram iniciadas em outubro de 1953 e, como veremos adiante, envolveram uma série de obstáculos que aos poucos foram sendo removidos.

Obtiveram-se os desejados frutos triplóides sem sementes. No estágio atual dos trabalhos estudam-se novas combinações híbridas, pois ainda há frutos triplóides que apresentam algumas sementes, se bem que chôchas, mas de tamanho grande. Os próprios tetraplóides podem vir a despertar interesse comercial por apresentarem já um reduzido número de sementes.

Cabrá agora à Seção de Olericultura, multiplicar as sementes tetraplóides, estabelecer os campos de produção de sementes triplóides e verificar a possibilidade desse material se tornar de interesse comercial.

2 — MATERIAL E MÉTODO

Como tôdas as variedades, a Keckley Sweet tem 22 cromossomos somáticos (figura 1-A). A solução proposta para o problema, como dissemos atrás, era a duplicação do número de cromossomos; obtida a linhagem tetraplóide ($2n = 44$), tratar-se-ia, em seguida, de obter sementes híbridas, triplóides ($2n = 33$). Os frutos produzidos pelas plantas triplóides provavelmente seriam desprovidos de sementes.

O passo inicial, portanto, era a obtenção de tetraplóides; dada a experiência que já se possui na Seção de Citologia, sôbre métodos de

tratamento com colquicina (8, 9), resolvemos tentar a duplicação dos cromossomos da melancia pelo tratamento de sementes em início de germinação: as sementes eram postas a germinar em ambientes com 90% de umidade relativa e à temperatura de 30° C; quando germinavam e apresentavam uma raiz de 1 a 2 cm de comprimento (o que se dava em geral 50 a 60 horas depois de semeadas) eram submetidas ao tratamento, ficando imersas na solução do alcalóide durante o tempo desejado. A solução de colquicina, recém-preparada, foi usada em duas concentrações (0,05% e 0,10%). No primeiro caso os tempos de tratamento foram 8, 12, 16 e 24 horas; para a concentração maior os tempos foram 4, 8, 12 e 17 horas; como contróle, uma parte das sementes era colocada em vaso contendo simplesmente água, durante o mesmo tempo. Em seguida, lavavam-se as sementes em água corrente e plantavam-se em vasilhos de papel, com terra. Estes vasilhos são feitos de papel de jornal, duplo ou triplo, num molde de madeira que lhes imprime a forma de um paralelepípedo sem fundo, de 6 x 6 cm de base; eram cortados com 15 cm de altura, arranjados uns ao lado dos outros dentro de uma caixa de madeira de mesma altura e cheios com terra. Quando as plantinhas em desenvolvimento já apresentavam dois pares de fôlhas definitivas, as caixas eram levadas para o campo, delas se retiravam os vasilhos de jornal (cada um com uma plantinha) e plantava-se à distância de 3 x 3 metros. O papel era retirado apenas na hora de se colocar a planta na cova e, para que a terra não se esboroasse, molhava-se ligeiramente um pouco antes do transplante.

Tanto em solução de colquicina como em água as sementes em germinação fermentavam e as raízes se maceravam quando a duração do tratamento era superior a 12 horas; um bom número de plantinhas não se recuperou, ao serem levadas para os vasilhos com terra.

As observações iniciais no campo se relacionavam com o modo de ramificação das plantas, tamanho e textura das fôlhas, e tamanho das flôres. Grande parte das flôres era auto-polinizada artificialmente. Colhiam-se os frutos de flôres autopolinizadas e livremente polinizadas, mediam-se e comprimento e a largura e anotava-se o pêso. As sementes eram contadas, medidas e pesadas.

O número de cromossomos era contado em pontas de raízes, colhidas quando as plantinhas emitiam as primeiras fôlhas definitivas; por meio de raízes fixadas em "Craf" e incluídas em parafina após

processo comum de desidratação pelo álcool butílico, cortadas a 8 micros e coloridas pela hematoxilina férrica, fizeram-se contagens de cromossomos em numerosas plantas.

Como auxílio à determinação direta do número de cromossomos procurou-se estabelecer uma correlação entre êsse número e o número de estomas nas fôlhas adultas; os estomas eram contados em pedaços de epiderme inferior, montados em lâminas de vidro em acetato de celulose dissolvido em ácido acético e recobertos com uma lamínula⁽¹⁾.

O pólen era colhido de flôres recém-abertas, colocado numa gôta de carmim acético sôbre uma lâmina de vidro, recoberto com uma lamínula e medido ao microscópio, com o auxílio de uma ocular micrométrica.

A simples determinação de $2n = 44$ cromossomos nas raízes nem sempre era indicação de que a planta tôda estava "duplicada": várias plantas tinham apenas uma parte duplicada. Era do conjunto de dados relativos principalmente a número de cromossomos, tamanho de estomas, tamanho de grão de pólen, formato dos frutos, número e tamanho das sementes, que se tirava finalmente uma conclusão sôbre o efeito parcial ou total do tratamento.

As sementes das plantas tidas como tetraplóides eram semeadas em caixas de Petri ou em germinador com temperatura e umidade controladas, ou diretamente na terra. Sômente após o segundo ciclo de estudos é que se estabelecia definitivamente quais as plantas tetraplóides.

Estas eram polinizadas com pólen de plantas diplóides da mesma variedade; uma parte das flôres era autofecundada, e ao mesmo tempo polinizavam-se as plantas diplóides com pólen das tetraplóides.

Desta forma, ao mesmo tempo que se multiplicavam as sementes tetraplóides, obtinham-se frutos com sementes que deveriam ser híbridas, triplóides ($2n = 33$).

As sementes triplóides eram contadas em cada fruto, medidas e pesadas. Postas a germinar seguiam-se os estudos relativos à porcentagem de germinação, desenvolvimento das plantas, contagens de cromossomos, contagem de estomas, observação sôbre o pólen, polinização, formação dos frutos. Êstes finalmente eram medidos, pe-

(1) Método de impressão dos estomas, desenvolvido na Seção de Citologia, que serviu de meio de montagem e conservação das lâminas. (Nota a ser publicada).

sados e abertos para a constatação da existência ou não de sementes. Como veremos mais adiante, nem sempre o fruto triplóide se mostrou desprovido de sementes.

3 — OBTENÇÃO DE TETRAPLÓIDES

Os primeiros tratamentos de sementes foram realizados em setembro-outubro de 1953.

As plantinhas afetadas pelo tratamento apresentavam desde logo uma paralisação no crescimento da raiz; o hipocótilo se engrossava bastante durante alguns dias, depois novas raízes eram emitidas e os cotilédones surgiam espessos; as folhas definitivas eram grossas e menos recortadas que as das plantas normais.

Plantas assim afetadas resultaram de todos os tratamentos com colquicina (estampas 1 e 2); a concentração menor e os tempos menos longos determinaram maior número de plantas restabelecidas, porém menos afetadas. Dos tratamentos a maior concentração e mais demorados, em muitos indivíduos o hipocótilo se apresentava engrossado demasiadamente, não havia emissão de novas raízes nem se formavam as folhas definitivas; assim, do tratamento 0,10% — 17 horas nenhuma planta chegou ao estado adulto.

Foi, portanto, dos tratamentos intermediários (0,05% e 0,10%) a 8, 10 e 12 horas que se conseguiu o maior número de plantas afetadas. Estas eram, a princípio, transplantadas para caixas com terra, e depois de alguns dias levadas para local definitivo. Frisemos, neste ponto, que houve muito insucesso no transplante; o sucesso foi maior, mais tarde, quando em outros tratamentos adotamos o uso de vasiinhos de papel de jornal, como já descrevemos.

Dos tratamentos efetuados em 1953 (ao todo 306 sementes tratadas, excluindo-se as testemunhas) apenas quatro plantas chegaram a florescer e frutificar. Dessas plantas tivemos frutos de polinização controlada cujas sementes puderam ser estudadas; uma única planta se sobressaiu entre as demais pela sua folhagem mais espessa.

De 754 sementes tratadas em 1954, o número de plantas aparentemente "duplicadas" foi de 26, num campo onde se achavam 170 plantas. Dessas plantas, possivelmente tetraplóides, nem tôdas forneceram material para a sua identificação posterior; algumas delas, produzindo poucas sementes, não puderam ser multiplicadas.

4 — OBSERVAÇÕES SÔBRE AS PLANTAS TETRAPLÓIDES

As plantas tetraplóides apresentam um aspecto caracteristicamente diferente das diplóides: não se ramificam tanto quanto estas (figura 2-A), as ramas são mais grossas, as fôlhas maiores, mais espessas, menos recortadas; as flôres são também maiores (estampa 3-A, a, b) e de um amarelo mais intenso. Ao microscópio, além do dôbro do número de cromossomos ($2n = 44$, figura 1-C) apresentam grãos de pólen maiores (quadro 2) e menor número de estomas por milímetro quadrado.

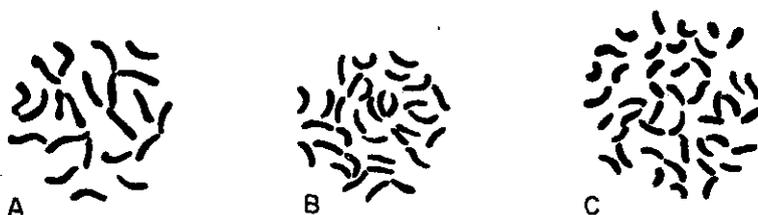


FIGURA 1 — Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. A a C — Metáfases somáticas de plantas diplóide ($2n=22$), triplóide ($2n=33$), e tetraplóide ($2n=44$), respectivamente. ($\times 2\ 800$).

Florescem abundantemente, são auto-férteis e quando polinizadas por plantas diplóides frutificam bem. Não temos indicação quanto à porcentagem de frutificação em relação ao número de flôres, porém é evidente que produzem menor número de frutos por planta que as diplóides; isto deve ser levado à conta do tamanho relativo das plantas pois, como dissemos, as plantas diplóides ramificam muito mais. É possível que plantadas a menor distância, a produção rivalize com as diplóides, por unidade de área.

Em um campo em que havia 50 plantas tetraplóides cuja finalidade era a obtenção de sementes triplóides, fizemos algumas observações sôbre o número de frutos por planta e número de sementes por fruto, a saber:

N.º do tetraplóide	N.º de plantas	N.º total de frutos	Média de frs. por planta	N.º total de sementes	Média de sementes p/ fruto
Cit 2938	27	18	0,7	432	24
Cit 2617	23	27	1,2	1 082	40

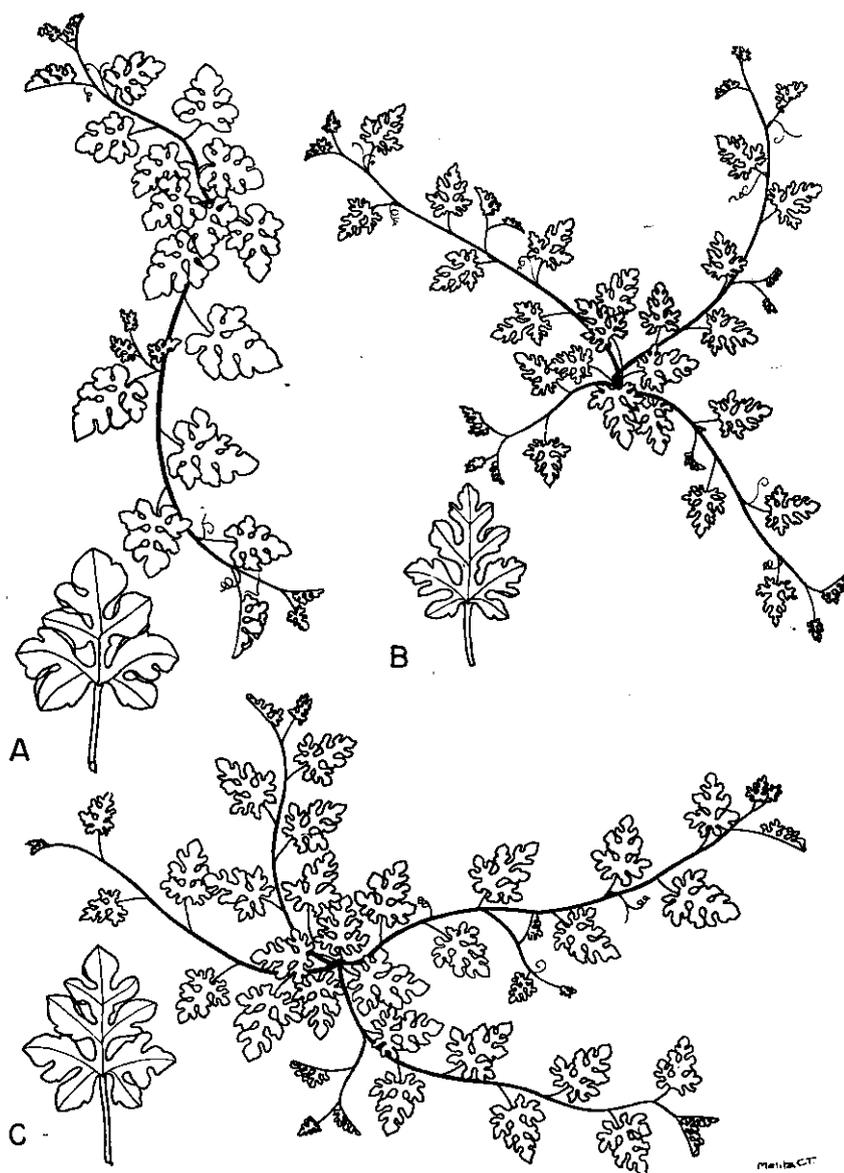


FIGURA 2 — Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. Desenho esquemático mostrando os três tipos de planta em desenvolvimento: A— tetraplóide; B— diplóide; C— triplóide.

Os dados atrás se referem apenas aos frutos cujo pêso era superior a 3 kg, por onde se vê que além do pequeno número de frutos por planta, é também reduzido o número de sementes por fruto.

Os frutos são mais curtos e mais largos (estampa 3-A, c) que os da variedade original (estampa 3-C, c), às vêzes quase esféricos, a casca é resistente, o "branco" de espessura reduzida, a polpa muito vermelha, mais doce e com menor número de sementes que a variedade diplóide, apresentando ainda grande quantidade de sementes tanto chôchas como atrofiadas. O maior número de sementes até agora obtido foi 358, em um fruto tetraplóide de 9 600 g.

As sementes (estampa 3-A, d) são mais largas, mais espêssas e mais pesadas que as da variedade diplóide (quadro 1). Germinam com certa dificuldade (quadros 3 e 4).

5 — OBTENÇÃO DE SEMENTES TRIPLÓIDES

A partir de 1954, ao mesmo tempo que se faziam observações sôbre os tetraplóides e se cuidava da sua multiplicação, tentava-se também a obtenção de triplóides. A princípio, os cruzamentos para êsse fim eram efetuadas nos dois sentidos: $2n(\varphi) \times 4n$ e $4n(\varphi) \times 2n$; mais de 170 flôres polinizadas no sentido $2n \times 4n$ produziram apenas dois frutos de tamanho normal, um dêles com 290 sementes chôchas e outro com 842 sementes diplóides; dado êsse insucesso, os cruzamentos passaram a ser feitos exclusivamente no outro sentido, aliás com bom pagamento.

Assim, em 1955 um campo foi instalado em Limeira, com plantas tetraplóides tendo de permeio algumas linhas de plantas diplóides para fornecerem o pólen para os cruzamentos. O serviço se resumiu à castração das flôres masculinas das plantas tetraplóides deixando que as flôres femininas fôssem naturalmente polinizadas pelo vento ou por insetos, com pólen das plantas diplóides. Obtiveram-se, dêsse modo, 59 frutos com um total de 1 580 sementes triplóides.

Os frutos colhidos das plantas tetraplóides polinizadas por diplóides não diferiam externamente dos autofecundados ou cruzados com outro tetraplóide. Suas sementes, relativamente numerosas em alguns casos e escassas em outros, aparentemente eram idênticas às tetraplóides: largas e grossas; em medições feitas nos três tipos de

sementes (quadro 1) a análise estatística confirmou essa observação: as sementes diplóides formam um grupo e as tri- e tetraplóides formam outro grupo em que elas se apresentam mais largas, mais espessas e mais pesadas.

QUADRO 1 — Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. Medições de sementes di—, tri— e tetraplóides (*)

Natureza da Semente	Dimensões			Pêso
	Compr.	Larg.	Espess.	
	<i>mm</i>	<i>mm</i>	<i>mm</i>	<i>g</i>
Diplóide	13,06	7,61	2,22	0,083
Triplóide	13,38	8,85	2,91	0,096
Tetraplóide	13,14	8,52	2,97	0,094

(*) Médias das medições de 40 sementes em cada caso.

6 — OBSERVAÇÕES SOBRE AS PLANTAS TRIPLÓIDES

Em 1955 semearam-se as primeiras sementes híbridas, de que deveriam resultar as plantas triplóides. Ao mesmo tempo, semearam-se alguns triplóides da variedade Yamato, originários do Japão.

Os triplóides japoneses apresentavam-se bastante resistentes à antracnose; os frutos eram quase totalmente desprovidos de sementes, ou seja, estas eram na maioria abortadas mas perfeitamente comestíveis, com muito raras exceções.

Os nossos primeiros triplóides, no entanto, foram realmente decepcionantes quanto ao resultado que se esperava: seus frutos, uns alongados como os diplóides, outros arredondados como os tetraplóides, não eram desprovidos de sementes: estas eram atrofiadas, porém não tanto que pudessem ser comestíveis; além disso eram numerosas.

Em 1956 novos híbridos (dos trabalhos de 1955 em Limeira) foram semeados, juntamente com diplóides e tetraplóides.

Verificou-se que entre os novos híbridos algumas plantas apresentavam-se muito mais aproximadas das diplóides do que das tetraplóides, quanto à ramificação da planta e ao aspecto geral da folhagem. Observadas, porém, as folhas e flôres em separado, elas se assemelhavam mais à planta tetraplóide (fig. 2 e estampa 3). Os tri-

plóides foram livremente polinizados; os tetraplóides foram utilizados para a sintetização de novos triplóides.

Colheram-se, em janeiro de 1957, as melancias dêste campo, sendo possível então comparar frutos triplóides com di- e tetraplóides. Verificou-se que alguns híbridos triplóides produziram os almejados frutos sem sementes.

O fruto triplóide é de forma oboval e, nas dimensões, intermediário entre di- e tetraplóides (estampa 3-B, c).

A ausência de sementes não é total: surgem uma, duas ou algumas aparentemente normais e semelhantes às tetraplóides; a maior parte das sementes é atrofiada, perfeitamente comestível, as quais, retiradas do fruto e postas a secar, se reduzem a minúsculos fragmentos, finos como papel.

Em alguns frutos, porém, encontram-se sementes que se enquadram mais no tipo "chôchas" que propriamente atrofiadas, não sendo portanto comestíveis. Não se sabe ainda a causa de se obter ora um, ora outro tipo de fruto triplóide.

A polpa é doce, sanguínea; o "branco", de espessura reduzida como nos frutos diplóides.

7 — CITOLOGIA

7.1 — IDENTIFICAÇÃO DOS TETRAPLÓIDES E TRIPLÓIDES

À medida que iam sendo feitos os tratamentos pela colquicina, era de interesse imediato a identificação dos tetraplóides obtidos, pela contagem dos seus cromossomos. Em vista, porém, de o material ser escasso e mais ainda dos danos causados à planta para a colheita tanto de raízes como de botões para microsporogênese (uma vez colhidas as raízes a planta não mais resiste ao transplante, que normalmente já é difícil), a contagem dos cromossomos foi feita mais tarde: primeiramente foram multiplicados os supostos tetraplóides, por meio de autofecundações, e depois identificados através de sua progênie.

Logo de início encontrou-se alguma dificuldade de ordem técnica quer na colheita das raízes quer no processo de coloração das lâminas: quando as sementes germinam em caixa de Petri, sobre papel chupão umedecido, não fornecem material apropriado para exame ao microscópio, de modo que para nossos trabalhos passamos a colhêr o ma-

terial depois de as plantas estarem suficientemente enraizadas na terra.

Quanto à coloração pela hematoxilina férrica, seguindo a mesma técnica adotada para café e outras plantas estudadas na Seção de Citologia, não tivemos bons resultados com a melancia; conseguimos nossas contagens de cromossomos introduzindo ligeira modificação na concentração do mordente: alumen de ferro a 1% durante 30 minutos, em lugar de a 2% durante 2 horas.

A natureza tetraplóide das plantas obtidas era verificada muitas vezes em suas progênies; houve um caso em que se determinou $2n = 44$ em sete plantas obtidas pela autofecundação de um mesmo tetraplóide; nas progênies F_2 ainda se constatou a tetraploidia; no entanto, quando a planta original fôra polinizada por diplóide, as sementes obtidas deram plantas com $2n = 22$ e não $2n = 33$. Isto indica que a planta original era provavelmente uma quimera; a progênie tetraplóide formou-se a partir de uma zona de tecido com $2n = 44$; a flor polinizada por diplóide formou-se em zona de tecido com $2n = 22$.

Em 1954 foram selecionados pelos característicos vegetativos das plantas de que provieram, pela forma do fruto e pelo tipo das sementes, 64 frutos. Contando os cromossomos em plantas que se originaram dessas sementes, pudemos correlacionar o tipo das sementes com o número de cromossomos: tendo verificado que dentro de determinados tipos de semente os embriões eram diplóides, descartamos todo o material desse tipo, sem exame citológico; passando a examinar somente as plantas originárias de sementes largas e grossas, encontramos cinco tetraplóides; por analogia e também por comparações de número de estomas, selecionamos mais 19 tetraplóides.

Em 1956 foram feitas as primeiras contagens de cromossomos em plantas triplóides ($2n = 33$, figura 1-B).

Quanto à microsporogênese, não foi estudada ainda em plantas triplóides; fizemos, apenas nos tetraplóides, algumas observações, constatando a formação desde mono- até tetravalentes em *Metáfase I*; ao lado de separações anafásicas regulares, verificamos muitas irregulares; microsporócitos com "tetrades" anormais, dividindo-se em 5 ou 6 "microspórios" de tamanhos diferentes, também são encontrados.

Não temos observações suficientes para avaliar a proporção em que essas irregularidades ocorrem nos tetraplóides; elas devem preju-

dicar a sua fertilidade e talvez sejam a causa da diminuição do número de sementes e da formação de sementes "chôchas".

As numerosas contagens de cromossomos realizadas em plantas com $2n = 22$, 33 e 44 , sem se deparar com mono- ou trissômicas, indicam que não há, provavelmente, formação de gametas férteis a não ser com $n = 11$ e $n = 22$.

7.2 — GRÃOS DE PÓLEN

Observações especiais foram feitas sobre os grãos de pólen: de cinco plantas diplóides, cinco triplóides e cinco tetraplóides colheram-se cinco flôres de cada uma, devidamente protegidas na véspera da abertura. Com o pólen de uma flor se preparava uma lâmina com carmin acético, fazendo-se observações individuais de 100 grãos em cada lâmina.

Os grãos de pólen das plantas triplóides se apresentavam sempre enrugados, irregulares e vazios de citoplasma, o que confere a essas plantas completa esterilidade masculina. Nas plantas diplóides e tetraplóides ocorrem de 2 a 30% de pólen vazio de citoplasma; nas primeiras essa porcentagem se avizinha do limite inferior; nas tetraplóides avizinha-se de 30% e chega, às vezes, a 40 ou 50%.

As medições foram feitas com o auxílio de uma ocular micrométrica e referem-se somente aos grãos de pólen arredondados, aparentemente normais e que se colorem pelo carmin acético; como este tipo de grãos não ocorre nos triplóides, as medições só foram feitas nos diplóides e tetraplóides.

Os resultados encontram-se no quadro 2, onde se pode verificar a média geral de 64,18 micros para as diplóides e 78,53 micros para as tetraplóides. A diferença estatística entre essas médias é altamente significativa.

Pela análise estatística verificou-se que há maior variabilidade entre flôres da mesma planta, que entre plantas pertencentes ao mesmo tipo (diplóide ou tetraplóide). Essa variabilidade pode ser atribuída à ocorrência de umas poucas flôres que apresentaram uma variação extraordinária no tamanho dos grãos de pólen; esse fato foi notado tanto dentro do grupo das diplóides como dentro do grupo das plantas tetraplóides e ainda não temos para ele uma explicação satisfatória.

QUADRO 2 — Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. Médias das medições feitas em 100 grãos de pólen em cada uma das 5 flôres colhidas: 5 plantas diplóides e 5 plantas tetraplóides

Natureza da planta	N.º da Planta	Medições do pólen					Média por planta	Média Geral para o grupo
		1.ª Flor	2.ª Flor	3.ª Flor	4.ª Flor	5.ª Flor		
Diplóide.....	1	62,68	62,50	60,95	65,42	62,03	62,71	64,18
Diplóide.....	2	64,47	60,01	63,15	60,80	72,97	64,27	
Diplóide.....	3	60,91	60,30	64,06	62,27	63,77	62,27	
Diplóide.....	4	61,68	61,65	61,94	63,30	77,44	65,21	
Diplóide.....	5	81,38	68,53	59,65	61,36	61,24	66,41	
Tetraplóide....	1	73,35	72,41	82,35	71,47	121,51	84,23	78,53
Tetraplóide....	2	75,15	72,24	73,76	81,06	100,49	80,52	
Tetraplóide....	3	73,53	76,53	72,41	75,47	72,91	74,17	
Tetraplóide....	4	72,97	79,97	73,94	73,53	89,05	77,41	
Tetraplóide....	5	73,18	76,85	72,56	81,38	77,44	76,29	

7.3 — NÚMERO E TAMANHO DOS ESTOMAS

Seções da epiderme inferior das fôlhas de melancia podem ser facilmente destacadas desde que estas estejam começando a murchar.

As seções montadas sobre uma gôta de acetato de celulose em lâmina de vidro e rocobertas com uma lamínula podem ser conservadas indefinidamente para exame ao microscópio.

Com o intuito de observar a correlação entre o número de cromossomos e o número de estomas, colhemos, em duas épocas, material de cinco plantas de cada nível de ploidia.

Na primeira época, tomamos uma fôlha adulta de cada planta, realizando contagens em 50 campos de cada fôlha. Na segunda época foram colhidas cinco fôlhas adultas de cada planta efetuando contagens em 20 campos de cada fôlha. Sempre que possível as fôlhas da segunda época eram colhidas nas mesmas plantas usadas na primeira.

Tanto numa como noutra época houve diferença significativa entre as médias encontradas para os três tipos de planta; não houve diferença entre os números encontrados nas duas épocas para o mesmo nível de ploidia.

Pode-se dizer, portanto, que a correlação negativa esperada entre

o número de cromossomos e o número de estomas foi confirmada, tendo-se achado em média 439, 315 e 245 estomas por mm² respectivamente para as plantas diplóides, triplóides e tetraplóides.

Quanto ao tamanho, se bem que não tenham sido realizadas medições com o intuito de se proceder a uma análise estatística, observamos que os estomas são maiores nos tetraplóides, médios nos triplóides e menores nos diplóides.

8 — GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Uma experiência sôbre o poder germinativo das sementes tri- e tetraplóides foi realizada em setembro de 1956, comparativamente com as diplóides, tôdas colhidas nesse mesmo ano.

QUADRO 3 — Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. Observações sôbre a germinação de sementes di—, tri— e tetraplóides em germinador, a temperatura e umidade constantes

N.º da planta	Cromossomos	Sementes					Germinação
		semeadas	germinadas				
			29/9	2/10	3/10	4/10	
	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	%
.....	22	100	74	20	—	—	94
Cit 5263	33	100	10	39	17	8	74
5264	33	100	9	30	23	14	76
5233	44	100	—	44	35	14	93
5240	44	100	—	47	29	2	78
5245	44	98	—	—	48	6	55
5255	44	100	—	—	49	8	57
5257	44	100	—	—	43	9	52
5260	44	100	—	30	33	8	71

Entraram nesta experiência apenas as plantas das quais se dispunha de maior quantidade de sementes. Assim, 11 tetraplóides e duas triplóides foram comparadas com a diplóide: a experiência foi realizada em germinador, à temperatura de 30° C e umidade relativa de 90%, com 100 sementes de cada planta, distribuídas em parcelas de 20, ao acaso, pelo germinador.

Como se pode verificar pelo quadro 3, as triplóides e tetraplóides levaram mais tempo para germinar que as diplóides; quanto à porcentagem de germinação, somente uma das tetraplóides apresentou-a tão alta quanto a diplóide (93% e 94% respectivamente), tôdas as demais tri- e tetraplóides apresentaram uma germinação que variou de 52 a 78%.

Tendo-se decidido plantar um campo com triplóides e tetraplóides ao lado de um outro onde se comparavam diversas variedades diplóides, a sementeira foi feita diretamente nas covas. Notamos então que as sementes diplóides do campo de variedades germinaram quando caíram as primeiras chuvas, enquanto as tri- e tetraplóides do nosso

QUADRO 4 — Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. Observação sôbre a germinação de sementes triplóides e tetraplóides, semeadas diretamente na cova

N.º da planta	Cromossomos	Sementes		Germinação
		semeadas	germinadas	
	<i>n.º</i>	<i>n.º</i>	<i>n.º</i>	%
Cit 5263	33	96	20	21
5264	33	192	11	6
5233	44	96	15	16
5240	44	96	9	9
5245	44	72	3	4
5255	44	72	1	1
5257	44	72	2	3
5260	44	72	3	4

campo só germinaram após chuvas mais demoradas. Além disso, a porcentagem de germinação destas últimas foi muito baixa (quadro 4).

Tudo indica, portanto, que as sementes tri- e tetraplóides necessitam de cuidados especiais para que reproduzam, no campo, o poder germinativo demonstrado em experiências de laboratório.

9 — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Frutos partenocárpicos ocorrem naturalmente em citros, banana, abacaxi, pepino e muitas outras espécies vegetais. Artificialmente, a partenocarpia tem sido induzida em numerosas plantas (3) pela aplicação de hormônios às flôres, suprimindo-se a polinização: não havendo fertilização, os frutos se desenvolvem sem sementes. O processo envolve trabalho manual constante e aplicação de drogas caras quais sejam os ácidos indolacético, indolbutírico, naftalenoacético e muitas outras. Melancias sem sementes foram primeiramente obtidas por Wong (11) em 1938, usando os tratamentos químicos a que nos referimos.

Por outro lado, a polinização de uma planta por pólen de outra planta, o qual não é capaz de fertilizá-la, pode induzir à formação de frutos sem sementes que se desenvolvem com o estímulo causado pela polinização. Apenas para exemplificar veja-se a ocorrência de frutos partenocárpicos em *Coffea canephora* diplóide quando polinizada por *C. canephora* tetraplóide (10). O mesmo aconteceu em *Citrullus vulgaris* polinizada por *C. colocynthis* (1) de igual número de cromossomos. Quando a hibridação inter- ou intra-específica ocorre dando formação a plantas triplóides, estas são estéreis devido à meiose irregular; entretanto, se forem devidamente polinizadas, os frutos se desenvolvem e são partenocárpicos pela falta da fertilização. A esterilidade dos autotriplóides obtidos na melancia foi aproveitada na prática e com sucesso pelos japoneses (5). Hoje a quantidade de sementes triplóides exportadas para os EE.UU. da América do Norte é uma fonte de dólares para o Japão (4).

Tendo planejado a obtenção de triplóides de melancia, o nosso trabalho consistiu na duplicação do número de cromossomos de uma variedade diplóide e em seguida na hibridação da tetraplóide com a diplóide. Vencidas as dificuldades; tanto materiais como técnicas, obtivemos várias linhagens tetraplóides e sintetizamos diversos triplóides.

Nem todos os frutos triplóides, no entanto, eram completamente desprovidos de sementes, sendo que uma mesma planta produziu frutos sem sementes, frutos com sementes atrofiadas e comestíveis e frutos com sementes atrofiadas mas não comestíveis.

Os autores japoneses (5, 6) também usaram idêntico processo para obtenção da melancia sem sementes. Encontraram a mesma dificuldade com relação a um certo número de sementes "chôchas" formadas nos frutos em vez de sementes completamente abortadas e comestíveis (2, 7).

Não temos conhecimento, por meio da literatura, de como teriam os japoneses vencido essa dificuldade. Conhecemos três dos seus triplóides: 1) Fumin x Miako No. 3; 2) Yamato x Miako No. 3; 3) Yamato x Asahi Yamato cujas sementes nos foram cedidas gentilmente pelo Dr. Norio Kondo, em 1955. Tivemos oportunidade de semear algumas e de verificar o pequeno número de sementes chôchas nos frutos triplóides. Além disso, pudemos notar que se trata de plantas bem resistentes à antracnose.

Se a qualidade do pólen usado para polinizar as flôres triplóides tem alguma influência sobre o aparecimento em maior ou menor número de sementes chôchas, não se sabe; mesmo as experiências feitas por Furusato e Miyasawa (2) não permitiram uma conclusão a respeito.

Ensaio a serem realizados, possivelmente esclarecerão este problema; da mesma forma, há necessidade de experimentos para a solução do problema referente ao aproveitamento total da potência germinativa das sementes tri- e tetraplóides.

As observações realizadas quanto ao número de frutos por planta e número de sementes por fruto, conduzem à conclusão de que no prosseguimento desses estudos devem se encontrar tetraplóides que apresentem capacidade de combinação superior para a produção de sementes híbridas.

Vencidas mais essas etapas de trabalho, estaremos em condições de oferecer aos serviços técnicos oficiais sementes de linhagens que deverão ser multiplicadas; a produção das sementes híbridas se fará em campos de tetraplóides com linhas diplóides entremeadas; as flôres masculinas das plantas tetraplóides deverão ser eliminadas, só sendo permitida a polinização natural, pelo pólen das diplóides.

O lavrador, por seu lado, semeará as sementes triplóides e de espaço a espaço, uma linha de diplóides. Não precisará qualquer trabalho adicional; a polinização das triplóides e subsequente formação dos frutos sem sementes, dependerá unicamente do transporte do pólen das plantas diplóides, pelo vento e pelos insetos.

ARTIFICIAL POLYPLOIDY IN THE PRODUCTION OF SEEDLESS WATERMELONS (*CITRULLUS VULGARIS* SCHRAD.)

SUMMARY

Watermelons (*Citrullus vulgaris* Schrad.) are in general provided with numerous seeds: large in the "American" varieties and small in the "Japanese" varieties.

Triploids ($2n=33$) of the "Japanese" varieties are already under cultivation by American farmers who import the hybrid seeds from Japan and seedless fruits are being produced in ever increasing amounts.

In Brazil the Japanese diploid ($2n=22$) varieties are only of recent introduction; among the American varieties ($2n=22$), "Keckley Sweet" is one of the best known and preferred for its good taste. For the obtention of seedless watermelons it seemed advisable to start the work with such a variety because of its commercial significance.

The first step was the obtention of tetraploids ($2n=44$); the adopted method consisted in the treatment of germinating seeds in an aqueous colchicine solution; best results were achieved using an 0.1% solution for 8 to 12 hours.

The tetraploids are of more stunted growth, with larger leaves and flowers; the fruits are smaller, round and few-seeded.

In attempting to cross tetraploids with diploids, successful results were obtained when ♀ $4n$ flowers were pollinated with pollen from $2n$ plants. Triploid ($2n=33$) plants, obtained from hybrid seeds, were completely male sterile but set fruits when pollinated with pollen from $2n$ plants.

The triploid plants are somewhat intermediate between di— and tetraploids as to the size of leaves and growth habit; the fruits are less elongated than in the diploids and not round as in the tetraploids. Some fruits are seedless, i.e. with aborted seeds that can be eaten together with the pulp; others show from few to many empty seeds which are flacid, but not quite fit to be eaten.

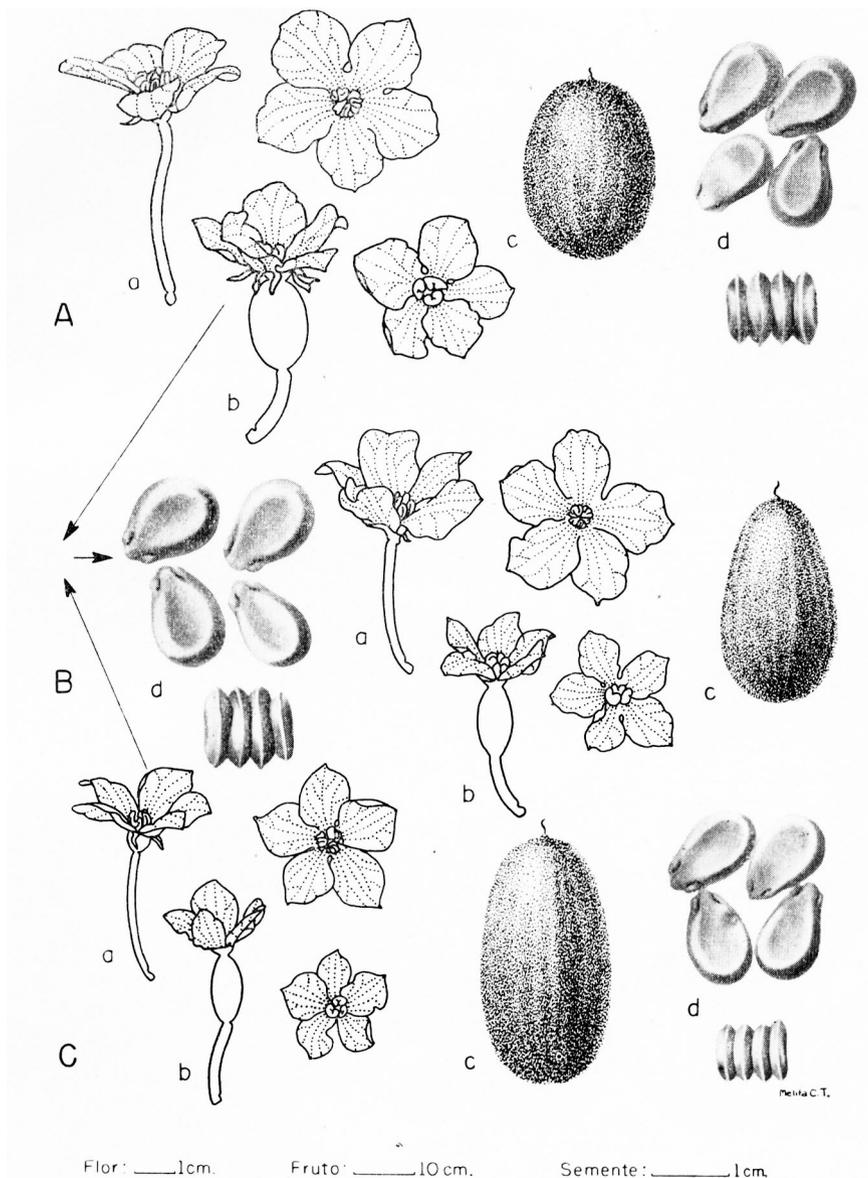
Comparative studies have been made of pollen, stomata and seeds of $2n$, $3n$ and $4n$ plants.

Studies are in progress to solve some problems encountered in the mass production and germination of tetraploid and triploid seed; up to now they are handicaps to the commercial utilization of these "seedless watermelons".

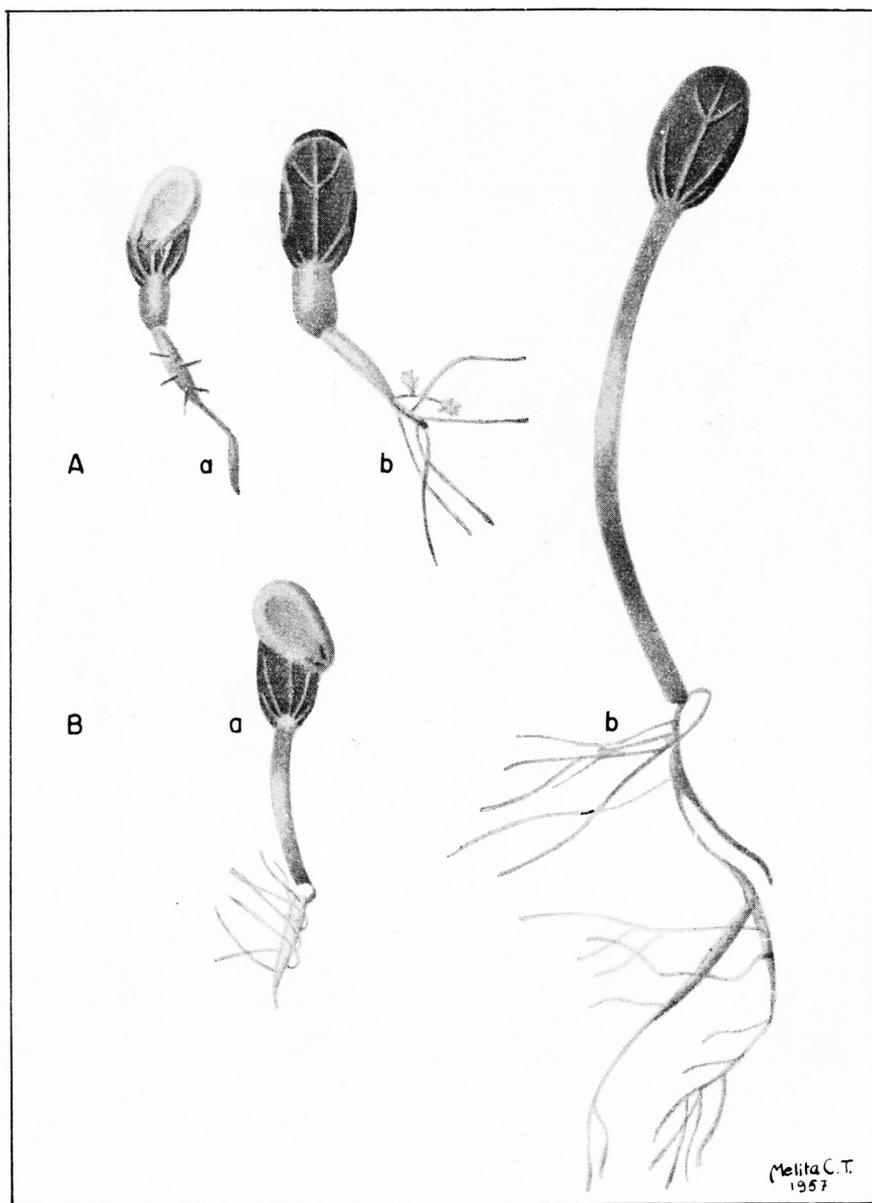
LITERATURA CITADA

1. FURUSATO, KAZUO & MIYASAWA, AKIRA. Hybridization experiments with *Citrullus vulgaris* and *C. colocynthis*. National Institute of Genetics (Japan), Annual Report 1954:67. 1955.

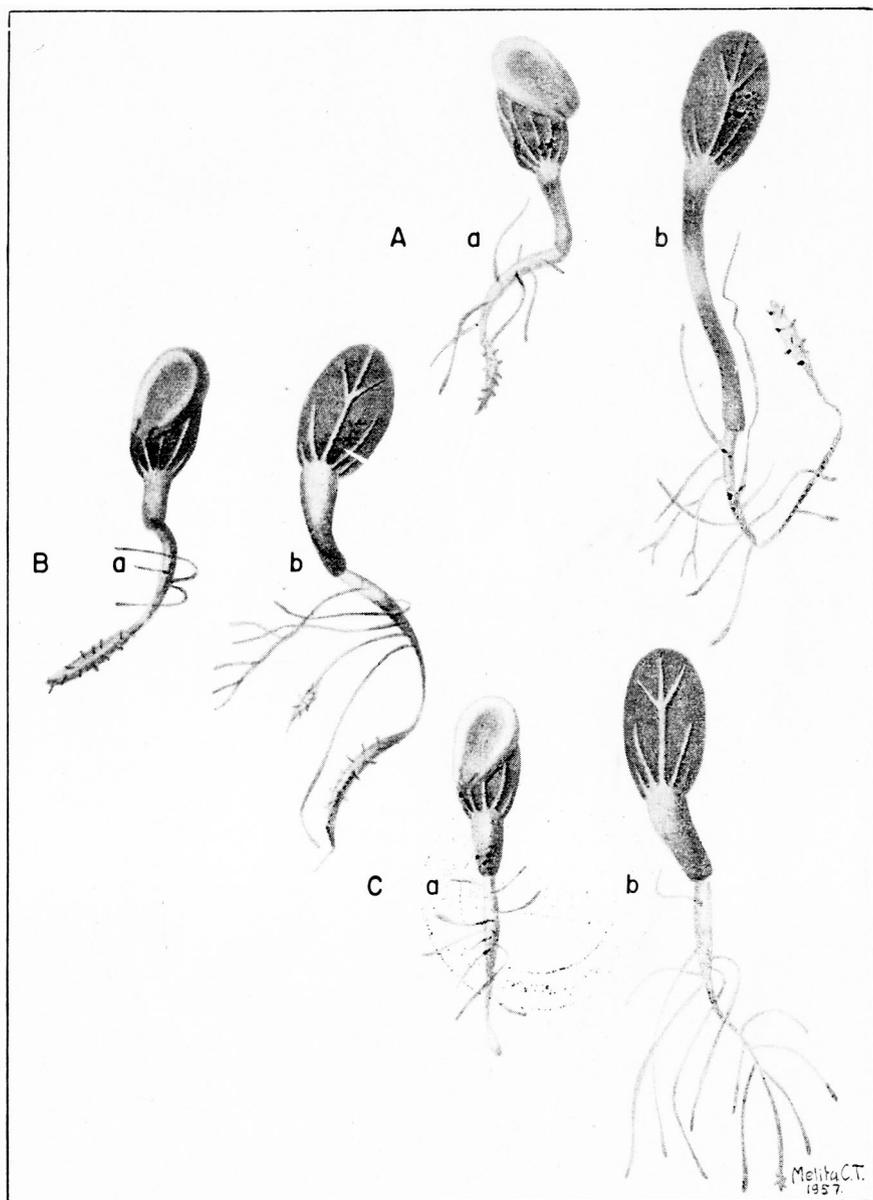
2. ——— Report on pollination of triploid watermelons with pollen of various diploid varieties. *Seiken Zihô* 5:128-130. 1952.
3. GUSTAFSON, FELIX G. Parthenocarpy: natural and artificial. *Bot. Rev.* 8: 599-654. 1946.
4. JOHNSTONE, FRANCIS E. (júnior). The customers came back for more. *Stn. Seedsman* 16(12):37,87. 1953.
5. KIHARA, H. & NISHIYAMA, I. An application of sterility of autotriploids to the breeding of seedless water-melons. *Seiken Zihô* 3:[93]-103. 1947.
6. ——— & YAMASHITA, Y. A preliminary investigation for the formation of tetraploid water-melons. *Seiken Zihô* 3:[89]-92. 1947.
7. KOYAMA, M. Studies on empty seeds (shiina) in triploid watermelon I. *Seiken Zihô* 5:[105]-109. 1952.
8. MENDES, A. J. T. Duplicação do número de cromossômios em café, algodão e fumo, pela ação da colchicina. Campinas, Instituto agrônômico, 1938. 21 p. (Bol. Tecn. n.º 57)
9. ——— Observações citológicas em *Coffea*. XI — Métodos de tratamento pela colchicina. *Bragantia* 7:[221]-230. 1947.
10. ——— Partenogênese, partenocarpia e casos anormais de fertilização em *Coffea*. *Bragantia* 6:[265]-274. 1946.
11. WONG, C. Y. Chemically induced parthenocarpy in certain horticultural plants with special reference to watermelon. *Bot. Gaz.* 103:64-86. 1941.



Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. A a C — Flôres masculinas e femininas, frutos e sementes respectivamente tetraplóides, triplóides e diplóides. As setas indicam o modo de obtenção das sementes triplóides (B, d) que irão produzir o fruto (Bc) sem sementes.



Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. *A* — Semente em germinação, submetida ao tratamento de colquicina a 0,1% durante 17 horas; *B* — testemunha, que permaneceu em água por um tempo igual; *a* e *b*, aspectos que elas apresentam aos 3 e 10 dias após o tratamento. (Tamanho natural).



Melancia, variedade Keckley Sweet Leesburg. *A a C* — Sementes em germinação submetidas ao tratamento de colquicina a 0,1% durante 3, 8 e 12 horas, respectivamente; *a e b*, aspectos que elas apresentam aos 3 e 10 dias após o tratamento (Tamanho natural).