

INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE ÁPICES DE RAIZES DE MELÃO

**AMARAL, Marcelo Nogueira do¹; FANTE, Gabriel Seibt²; NORA, Fabiana Roos³;
PETERS, José Antônio⁴**

¹Universidade Federal de Pelotas, Ciências Biológicas; ²Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; ³Universidade Federal de Pelotas, Centro de desenvolvimento Tecnológico – Núcleo de Biotecnologia; ⁴Universidade Federal de Pelotas – Instituto de Biologia. theoamaral@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O Melão (*Cucumis melo* L.) representa uma das espécies de maior importância econômica dentro da família Cucurbitaceae (SOUZA et al., 2006), sendo a região Nordeste a maior produtora brasileira, seguida pelo Rio Grande do Sul (AGRIANUAL, 2008). Entretanto, perdas comerciais ocorrem pela presença de doenças na cultura (JARL; BOKELMANN; DE HAAS, 1995) e, principalmente, pela rápida deterioração do fruto, característico de frutos climatéricos (PETERS et al., 1999).

A utilização de técnicas de transformação genética possibilita a introdução de características agrônômicas desejáveis (AYUB et al., 1996), entretanto, uma das dificuldades para utilização de tais tecnologias é a falta de um sistema eficiente de regeneração para a transformação de plantas (GRAY; MCCOLLEY; MICHAEL, 1993). Relatos na literatura demonstram que a taxa de eficiência e regeneração de melão é extremamente difícil e altamente dependente do genótipo (CHOVELON et al., 2011) e da origem do explante utilizado (GUIS et al., 2000).

Dentro do grupo *saccharinus*, que apresentam tamanho de frutos médios a grande, com polpa esbranquiçada ou amarelada e doce (KIRKBRIDE, 1993), enquadra-se a cultivar Gaúcho, que possui uma área de plantio bastante representativa no sul do País, porém produz frutos altamente perecíveis, com uma vida de prateleira de quatro a seis dias. Trabalhos vêm sendo realizados para a obtenção de protocolos mais eficientes de regeneração *in vitro* da cultivar Gaúcho (NORA, 2001; PINHO et al., 2008) visando a transformação genética. Entretanto, a eficiência de regeneração desta cultivar via organogênese direta e principalmente a percentagem de plantas que chegam ao seu desenvolvimento adulto por esta via ainda é muito baixa. Com isto, ainda se torna necessário estudos que visem à otimização de protocolos de regeneração para esta cultivar, sendo a embriogênese somática uma possível alternativa.

Diversos fatores, como idade e fonte do explante, composição do meio de cultura, condições ambientais e genótipo afetam significativamente a regeneração e embriogênese somática em *C. melo* (KINTZIOS; TARAVIRA, 1997). Desta forma, o objetivo do presente trabalho é desenvolver um protocolo para a embriogênese somática a partir de ápices de raízes de melão, cultivar Gaúcho.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Material Vegetal

Sementes maduras comerciais de *C. melo* L. Cultivar Gaúcho, descascadas manualmente, foram desinfestadas superficialmente por imersão

durante 20 minutos em hipoclorito de cálcio 1% adicionado de 0,01% de Tween-20, seguido de três lavagens com água estéril e germinadas em placas de Petri em meio MS semi-sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionado de 30g.L⁻¹ de sacarose, 7g.L⁻¹ de Ágar e mantidas em sala de crescimento, no escuro a 23°C. Após a emissão das radículas, estas tiveram seus ápices radiculares excisados em torno de cinco milímetros, e seus ápices foram utilizados como explante.

2.2 Indução de calos e embriões somáticos

Para indução de calos, ápices radiculares foram cultivados em meio MS semi-sólido adicionado de 30g.L⁻¹ de sacarose, 7g.L⁻¹ de Ágar, e contendo auxina 2,4-D, e citocinina BAP, em diferentes concentrações e combinações (mg.L⁻¹): 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.L⁻¹. A indução dos calos foi realizada no escuro à temperatura de 23° C. Após quatro semanas em cultura, os explantes foram avaliados quanto ao número de calos por tratamento, porcentagem de calos formados e características do calo.

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

O experimento foi constituído de dois blocos com 10 explantes, totalizando 20 explantes por tratamento. Os tratamentos foram constituídos de cinco concentrações de auxina em combinação com cinco concentrações de citocinina em um esquema fatorial simples, totalizando 25 tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Observou-se a formação de calos em todos os tratamentos, exceto os que não continham a auxina 2,4-D. Explantes cultivados sem a presença de nenhum regulador de crescimento apresentaram crescimento longitudinal, com formação de raízes secundárias e pelos absorventes em alguns explantes (Fig. 1A). Com a adição de citocinina, houve uma diminuição do crescimento longitudinal e um aumento em espessura, com surgimento de pequena massa celular na região do corte (Fig. 1B-E). A utilização de BAP em conjunto com 2,4-D induziu um aumento no percentual de formação de calos, indicando um sinergismo entre esses dois reguladores de crescimento.

Todos os tratamentos que possuíam 2,4-D no meio de cultura mantiveram um padrão de comportamento, independente da concentração de BAP. As concentrações de 0,5mg.L⁻¹ (Fig. 1F) e 1,0mg.L⁻¹ (Fig. 1G) de auxina apresentaram uma porcentagem de formação de calos superiores em relação aos tratamentos com 1,5mg.L⁻¹ (Fig. 1H) e 2,0mg.L⁻¹ (Fig. 1I), o que demonstra um efeito inibitório provocado por concentrações mais altas desse regulador de crescimento. Esse fato pode estar associado a um efeito citotóxico causado por concentrações mais elevadas de auxina. Os melhores percentuais de formação de calos foram obtidos

com os tratamentos contendo $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de 2,4-D (100%), ambos apresentando calos friáveis e de coloração amarelada.

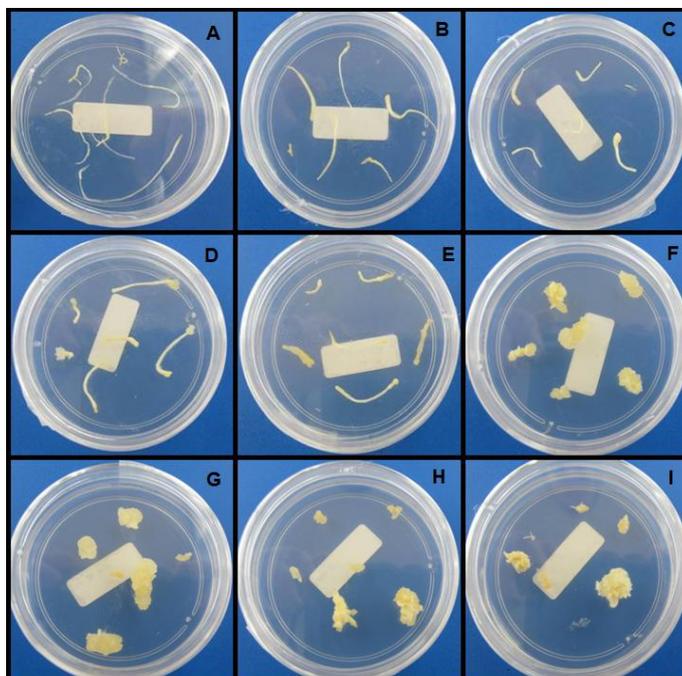


Figura 1 - Ápices radiculares cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de auxina e citocinina. A-E: Sem adição de auxina e 0; 0,5; 1,0; 1,5 e $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, respectivamente. F-I: Concentração fixa de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP adicionado de 0,5; 1,0; 1,5 e $2,0\text{mg.L}^{-1}$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

Após duas e quatro semanas em meio MS para desenvolvimento de embriões, nenhum dos calos oriundos dos tratamentos testados foi capaz de originar embriões somáticos. Os calos apresentaram um aumento de tamanho, e adquiriram um aspecto mais translúcido e com algumas regiões esverdeadas, demonstrando a necessidade de se testar novos tratamentos para indução de embriões somáticos.

4 CONCLUSÃO

Os dados demonstram a formação de calos somente nos tratamentos que continham a auxina 2,4-D, mostrando o papel fundamental desse regulador de crescimento para a divisão celular, porém observou-se um decréscimo na percentagem de calos nos tratamentos com as concentrações mais altas, indicando um possível efeito inibitório. Os tratamentos com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de 2,4-D apresentaram as porcentagens mais altas de formação de calos (100%).

Entretanto nenhum dos tratamentos foi capaz de induzir a formação de calos embriogênicos, havendo necessidade de testar novas concentrações e diferentes reguladores de crescimento, bem como novas condições de cultivo.

5 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NORA, Fabiana. **Transformação genética do meloeiro (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho**. 2001. 90f. Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PETERS, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C.V. Transformação genética do meloeiro e da macieira. **Biociência**, v.4, p.11-15, 1999.

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

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