

## REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE MELOEIRO (*Cucumis melo* L.) APARTIR DE NÓS COTILEDONARES

**AMARAL, Marcelo Nogueira do<sup>1</sup>; CASTRO, Rodrigo Inacio<sup>1</sup>; NORA, Fabiana Roos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico-Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas-UFPEL. e-mail: fabiana.nora@gmail.com

**PETERS, José Antônio<sup>2</sup>.**

<sup>2</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – Departamento de Botânica. Instituto de Biologia/UFPEL. e-mail: japeters1@hotmail.com

### 1. Introdução

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma planta anual, herbácea, da família Cucurbitaceae. Produz frutos classificados como climatérios, muito perecíveis devido à elevada percentagem de água e produção de etileno (conhecido como o hormônio do amadurecimento), com baixa acidez, e estrutura celular caracterizada pela presença de grandes vacúolos (PECH; RAYNAL; LATCHÉ, 1994). A associação de técnicas bioquímicas, moleculares e de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais permite a manipulação genética de plantas visando o controle da expressão de genes envolvidos na biossíntese do etileno para induzir maior potencial de conservação pós-colheita (CARA; GIOVANNONI, 2008). Neste contexto, métodos eficientes de transformação e regeneração de plantas são indispensáveis na implementação das referidas técnicas. Na regeneração, o comportamento distinto de explantes na etapa de multiplicação de brotos *in vitro*, fundamentalmente em função de variações genotípicas, constitui o principal obstáculo na identificação das condições de cultivo mais adequadas. No presente estudo buscou-se desenvolver um método para obtenção de explantes de melão Gaúcho com elevado número de brotações, portanto com maior potencial de regeneração.

### 2. Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Núcleo de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), em colaboração com o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Instituto de Biologia da UFPEL. Sementes comerciais de *Cucumis melo* L. da cultivar Gaúcho foram utilizadas. As sementes foram descascadas manualmente e desinfetadas por 20 min em hipoclorito de sódio 1% e 0,01% de Tween-20. Após enxague triplo em água destilada estéril as sementes colocadas para germinar em Placas de Petri sobre meio sólido de Murashige e Skoog (1962), adicionado de 30,0 g·L<sup>-1</sup> sacarose, 7,0 g·L<sup>-1</sup> de Agar e de hormônio BAP, em diferentes concentrações (Tabela 1). Após sete dias em meio de germinação, foram removidos os epicótilos e hipocótilos para a obtenção dos nós cotiledonares (explantes). Os nós cotiledonares preparados foram transferidos para vidros sobre meio de cultivo para multiplicação de brotos, com diferentes concentrações de hormônio BAP (Tabela 1). Os nós cotiledonares foram mantidos nos meios 5, 6 e 7 por um período de 30 dias, quando procedeu-se a primeira avaliação. Logo após este período foi removida a brotação apical desenvolvida em cada explante. Decorridos 15 dias os explantes foram novamente

avaliados. Todos os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 23 °C, 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h (lâmpadas brancas fluorescentes).

Tabela 1. Tratamentos realizados no processo de multiplicação de brotos de meloeiro (*Cucumis melo* cv. Gaúcho)

Tratamentos	Meios de germinação		Meios de multiplicação de brotos
	Meio 1 (MS)		
T1	Meio 2 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 5 (MS 0,25 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T2	Meio 2 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 6 (MS 0,50 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T3	Meio 2 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 7 (MS 0,90 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T4	Meio 3 (MS 1,0 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 5 (MS 0,25 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T5	Meio 3 (MS 1,0 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 6 (MS 0,50 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T6	Meio 3 (MS 1,0 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 7 (MS 0,90 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T7	Meio 4 (MS 1,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 5 (MS 0,25 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T8	Meio 4 (MS 1,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 6 (MS 0,50 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T9	Meio 4 (MS 1,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)		Meio 7 (MS 0,90 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)

BAP:6-Benzilaminopurina ABA: ácido abscísico

### 3. Resultados e discussão

Sementes germinadas sobre meio de cultivo adicionado de citocinina (BAP) originaram plântulas com primórdios foliares mais evidentes, epicótilos e hipocótilos espessos, raízes engrossadas, curtas e sem raízes secundárias. Apesar destas modificações nas plântulas, o referido tratamento foi associado com maior multiplicação celular e favorecimento do processo de multiplicação brotos. Na Fig. 1 são apresentados os resultados da primeira avaliação, após 30 dias de cultivo dos explantes em meios para multiplicação de brotos. A utilização da concentração mais baixa da citocinina BAP (0,5 mg·L<sup>-1</sup>) durante a germinação, combinada com a utilização da concentração mais alta deste hormônio na multiplicação de brotos (0,9 mg·L<sup>-1</sup>), resultaram em moderada indução de gemas e brotações iniciais nas laterais do broto principal (Fig. 1C). Neste tratamento apesar do broto principal ter se desenvolvido, apresentando dominância apical, produziu um broto de tamanho pequeno. A mesma concentração de BAP (0,5 mg·L<sup>-1</sup>) na germinação da semente e na multiplicação de brotos resultou em maior dominância apical e um broto principal de maior tamanho (Fig. 1B). A combinação das duas concentrações mais baixas de BAP (0,5 mg·L<sup>-1</sup> na germinação da semente e 0,25 mg·L<sup>-1</sup> na multiplicação) resultou em explantes com brotação apical considerada normal, sem nenhuma evidência de multiplicação lateral (Fig. 1A). A utilização da concentração mais alta de citocinina BAP (1,5 mg·L<sup>-1</sup>) na germinação da semente, combinada com a concentração mais baixa deste hormônio (0,25 mg·L<sup>-1</sup>) na multiplicação de brotos, resultou em explante com brotação principal semelhante a brotação desenvolvida diretamente da semente. O mesmo ocorreu quando se empregou concentração de 1,0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP na germinação da semente e 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de BAP na multiplicação de brotos (Fig. 1D-E). A concentração mais alta de BAP (1,5 mg·L<sup>-1</sup>) na germinação da semente, combinada com a concentração intermediária (0,5 mg·L<sup>-1</sup>) na multiplicação, reduziu a dominância apical do broto principal e induziu a formação de gemas laterais (Fig. 1F). Finalmente, a concentração mais alta de BAP (1,5 mg·L<sup>-1</sup>) na germinação da semente, combinada com a concentração mais alta deste hormônio (0,9 mg·L<sup>-1</sup>) na multiplicação de brotos, resultou em menor dominância apical (Fig. 1G).

O conjunto de resultados sugere que a exposição à citocinina exógena no período de germinação, diferente desta mesma exposição no período de multiplicação de brotos, não foi determinante para o aumento do número de brotações. Nenhum dos tratamentos testados resultou em plena quebra de dominância apical. A biossíntese e ação do hormônio AIA, auxina mais abundante e de maior relevância fisiológica, provavelmente foi determinante na manutenção da referida dominância apical. A produção de AIA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente nas partes aéreas. Embora quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzir AIA, ainda que em baixas concentrações, os meristemas apicais de caules e as folhas jovens são os principais locais de síntese desse hormônio (LJUNG, K.; BHALERAO, R.P.; SANDBERG, G., 2001). O ápice caulinar responde pela quase totalidade da auxina produzida na planta. O transporte da auxina (transporte polar) do ápice do caule até o ápice da raiz resulta em um gradiente de auxina entre estes órgãos. Este gradiente longitudinal de auxina da parte aérea até a raiz afeta vários processos de desenvolvimento, dentre eles a dominância apical, caracterizada pelo crescimento dominante do eixo central da planta sobre os eixos que dele emergem (ramos laterais). A dominância apical ocorre pela inibição da formação de outros ramos na proximidade do ramo central pela ação da auxina produzida no ápice do mesmo. Acredita-se que as concentrações de citocinina exógena (BAP) empregada nos tratamentos não foram suficientemente elevadas para inibir a dominância apical mantida pela ação das auxinas endógenas. Por lado, concentrações excessivas de citocinina exógena são deletérias na regeneração. Os resultados obtidos sugerem que a concentração de citocinina adequada para a regeneração de explantes meristemáticos de melão Gaúcho é ligeiramente superior às testadas neste estudo, em uma faixa de concentrações bastante restrita. Plantas de melão Gaúcho obtidas de sementes comerciais se caracterizam pela grande variabilidade genotípica e pela diversidade de respostas quando submetidas ao mesmo tratamento com citocininas exógenas. Assim, faz-se necessário caracterizar um número significativo de genótipos de melão Gaúcho na definição de um tratamento de regeneração adequado para esta cultivar de melão. O maior desafio na utilização de nós cotiledonares como explante na regeneração de melão Gaúcho tem a sido a persistente dominância apical desta espécie. A identificação do adequado regime de hormônios exógenos para regeneração de melão Gaúcho deve assegurar a quebra de dominância apical, a indução de novos meristemas e múltiplos brotos laterais. A remoção da brotação principal aos 30 dias e o cultivo destes explantes por mais 15 dias em meio de multiplicação pareceu ser essencial e suficiente para controlar a dominância apical e melhorar significativamente a indução de gemas e brotações laterais (Fig. 2). A remoção da brotação principal aos 15 dias resultou em uma retomada da dominância apical (resultados não apresentados).

#### 4. Comentários finais

Acredita-se que o estágio de desenvolvimento das células do nó cotiledonar que origina o explante é de extrema importância no posterior controle da dominância apical e conseqüentemente na indução de brotações laterais. Salienta-se que as características do nó cotiledonar isolado para o processo de multiplicação afetou o crescimento e a dominância apical. Isto foi observado quando nós cotiledonares preparados com e sem o auxílio de um stereoscópio foram submetidos aos mesmos tratamentos. Com o auxílio de stereoscópio retira-se mais células da base dos cotilédones e supostamente mais células associadas à formação de

primórdios ou meristema. Nós cotiledonares isolados com auxílio de stereoscópio resultaram em explantes com menor dominância apical e com maior crescimento de brotações laterais em todos os tratamentos avaliados (Fig. 1A-G e Fig. 2A-D). Entretanto, ainda que o padrão de reposta frente às diferentes concentrações da citocinina tenham sido semelhantes, a persistência da dominância apical foi exacerbada em explantes originados de nós cotiledonares isolados sem o auxílio de stereoscópio.

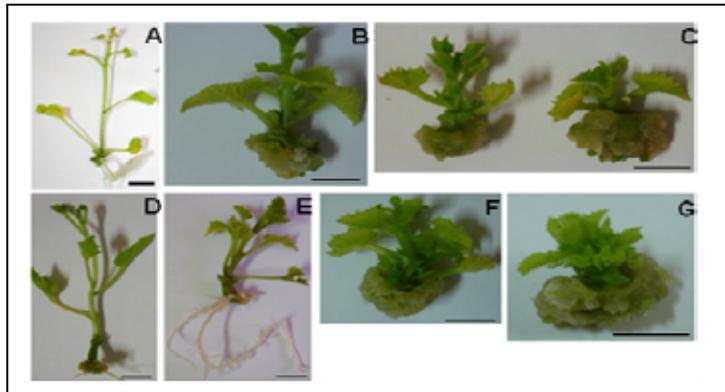


Figura 1. Multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos utilizando-se nós cotiledonares preparados sem o auxílio do stereoscópio. A-G= explantes com 30 dias, primeira avaliação. A:T1. B:T2. C: T3. D:T4. E:T7. F:T8. G:T9. T= Tratamentos. A a G (Barra 1cm).

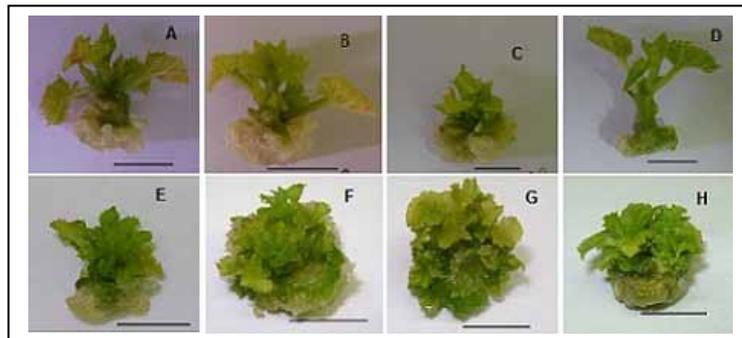


Figura 2. Multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos a partir de nós cotiledonares preparados com o auxílio do stereoscópio. A-D= explantes com 30 dias, primeira avaliação. E-H= explantes com 45 dias, segunda avaliação. A e E:T4. B e F:T5. C e G:T6. D e H:T8. T= Tratamentos. A a H (Barra 1cm).

## 5. Referencias

CARA, B.; GIOVANNONI, J. J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation **Plant Science**, v.175, n.1-2, p103-113, 2008.

LJUNG, K.; BHALERAO, R.P.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **Plant J.** **28**, 465–474, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

PECH, J.C.; RAYNAL, J.; LATCHÉ, A. Physiologie des fruits à noyau lors du développement et de la maturation sur l'arbre. In: **SEMINARIO CELEBRADO EN LA FIRA DE LLEIDA**, Lleida-España. Actas... IRTA: CIHEAL y Ajuntament de Lleida, p.17- 35, 1994.