

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Regeneração e Transformação Genética de melão
(*Cucumis melo* L.). cv. Gaúcho**

Daiane de Pinho Benemann

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**REGENERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MELÃO (*Cucumis melo*
L.), CV. GAÚCHO**

Daiane de Pinho Benemann

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. José Antonio Peters, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Agosto de 2008**

DAIANE DE PINHO BENEMANN

REGENERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MELÃO (*Cucumis melo* L.), CV. GAÚCHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. José Antonio Peters, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

Banca Examinadora

Dr. Jorge Adolfo Silva

Dr^a. Fabiana Ross Nora

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Dr. José Antonio Peters
(Orientador)

B465r

Benemann, Daiane de Pinho

Regeneração e transformação genética de melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho / Daiane de Pinho Benemann ; orientador José Antonio Peters ; co-orientador Eugênia Jacira Bolacel Braga. – Pelotas, 2008. – 40f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.

1.Biotecnologia. 2.*Cucumis melo*. 3.Melão gaúcho. 4.Regeneração. 5.Acc oxidase. 6.*Agrobacterium tumefaciens*. I.Peters, José Antônio. II.Braga, Eugênia Jacira Bolacel. III.Título.

Aos meus pais Maria Elena e João Carlos Pinho

Ao meu marido Tarso Benemann

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força, por sua fidelidade e por ter me sustentado em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria Elena e João Carlos de Pinho, pelo incentivo e confiança em minha capacidade.

Ao meu marido, pelo amor, carinho, paciência e compreensão em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia Agrícola pela oportunidade e estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Prof. José Antonio Peters pela amizade, carinho, dedicação, ensinamentos e apoio.

Ao amigo Luciano Pinto, pela dedicação e ensinamentos.

Aos Professores Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga pelo carinho e dedicação e ao Dr. Valmor Bianchi pelos seus ensinamentos.

Aos colegas e amigos que me ajudaram na realização deste trabalho, em especial, Maristela Rey, Aniheb Vieira e Fábio Silva.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, pelo convívio e apoio.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento”.

“O que adquire entendimento ama a sua alma; o que conserva a inteligência acha o bem”.

Provérbios 2:6 e 19:8

ÍNDICE

SUMÁRIO.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas.....	2
2 - PROJETO DE PESQUISA.....	4
2.1- Caracterização do Problema.....	5
2.2- Metodologia e Estratégia de Ação.....	7
2.3- Resultados e Impactos Esperados.....	8
2.4- Cronograma.....	10
2.5- Referências Bibliográficas.....	11
3 – ARTIGO I	
Regeneração <i>in vitro</i> de cotilédones de melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	
cv. Gaúcho.....	13
Resumo.....	14
Abstract	14
1- Introdução.....	15
2- Material e Métodos.....	16
3- Resultados e Discussão.....	18
4- Conclusões.....	23
5- Referências Bibliográficas.....	24
4 – ARTIGO II	
Transformação genética de melão (<i>Cucumis melo</i> L.), cv. Gaúcho, um desafio para a técnica.....	27
Resumo.....	28
Abstract	28
1- Introdução.....	29
2- Material e Métodos.....	30
3- Resultados e Discussão.....	33
4- Referências Bibliográficas.....	36
5- CONCLUSÕES GERAIS.....	38
6- APÊNDICE	39

SUMÁRIO

BENEMANN, Daiane Pinho, M.S. Universidade Federal de Pelotas, Agosto de 2008. **Regeneração e transformação genética em melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho.** Orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters. Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo eficiente de regeneração para o melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho, visando posterior transformação genética do mesmo. Para tal fim foram realizados três experimentos. No primeiro, os cotilédones foram divididos em 2, 3, 4 e 5 partes iguais e, inoculados em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,9 mg L⁻¹ BAP, 0,3 mg L⁻¹ ABA e 2,2 g L⁻¹ CaCl₂. No segundo experimento, utilizando o mesmo meio de cultura do experimento anterior, os cotilédones foram submetidos a diferentes densidades de fluxo de fótons. No terceiro procurou-se estabelecer as condições para germinação das sementes e sua influência na regeneração cotiledonar sob diferentes concentrações de BAP. Observou-se que cotilédones seccionados em 5 partes apresentaram maior média de explantes regenerantes. Já os cotilédones que permaneceram sob intensidade luminosa de 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram maior média de explantes regenerantes e os que ficaram no escuro apresentaram maior média de explantes com calos e raiz. Observou-se também que quanto maior o período germinativo e maiores concentrações de BAP no meio regenerativo, menor é a taxa de explantes regenerantes. Após a obtenção do protocolo de regeneração, foi realizado teste de sensibilidade dos explantes ao antibiótico de seleção, determinando-se a concentração de 75 mg L⁻¹ de canamicina como ideal para selecionar as células transformadas. Para a regeneração de brotações os explantes foram cultivados em meio MS contendo 0,9 mg L⁻¹ BAP, 0,3 mg L⁻¹ ABA, 2,2 g L⁻¹ CaCl₂, 75 mg L⁻¹ canamicina e 250 mg L⁻¹ cefotaxima. Para a transformação genética, foi utilizado *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, com um clone da ACC oxidase em orientação antisense, denominado pAP4_{as}. Entretanto, não foi confirmada a inserção da seqüência, pelo teste de PCR, nos tecidos analisados.

Verificou-se que estes estudos descritos com *Agrobacterium* não foram eficientes para a obtenção de plântulas contendo o gene antisense da ACC oxidase.

SUMMARY

BENEMANN, Daiane Pinho, M.S. Universidade Federal de Pelotas, Agosto de 2008. **Regeneration and genetic transformation in melon (*Cucumis melo* L.) cv. Gaucho.** Orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters. Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga.

The objective of this work is to seek a protocol for regeneration of the melon (*Cucumis melo* L.) cv. Gaucho and subsequent genetic transformation of this fruit. To this end were conducted three experiments. In the first, the cotyledons were divided into 2, 3, 4 and 5 equal parts, and inoculated with MS medium containing 30 g L⁻¹ sucrose, 0.9 mg L⁻¹ BAP, 0.3 mg L⁻¹ ABA and 2.2 g L⁻¹ CaCl₂. It was observed that the number of cuts not influenced the percentage of explants regenerated. In the second experiment, using the same means of cultivation of the previous experiment, the cotyledons were submitted to different densities of flow of photons. It was found that the regenerative process was not affected by the absence or presence of light (2 and 21 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), but when the explants remained in the dark had greater formation of callus. In the third experiment sought to establish conditions for seed germination and its effect on the regeneration under different concentrations of BAP. It was the highest rate of explants regenerated lower when the period of germination in the middle and lower the concentration of BAP in the regenerative. After obtaining the protocol for regeneration, was conducted test of sensitivity of explants the selection of antibiotic, setting up the concentration of 75 mg L⁻¹, kanamycin as ideal to select the cells transformed. For the regeneration of the shoots explants were cultivated in MS medium containing 0.9 mg L⁻¹ BAB, 0.3 mg L⁻¹ ABA, 2.2 g L⁻¹ CaCl₂, 75 mg L⁻¹ kanamycin and 250 mg L⁻¹ cefotaxime. For the genetic transformation was used *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, with a clone of ACC oxidase in antisense orientation, called pAP4as. However, it was not confirmed by inserting the sequence, the PCR test, the tissue analyzed. It was found that these studies were not described with *Agrobacterium* efficient to obtain seedlings containing the

antisense gene of ACC oxidase. It was found that these studies were not described with *Agrobacterium* efficient to obtain seedlings containing the antisense gene of ACC oxidase.

1- INTRODUÇÃO GERAL

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma cucurbitaceae proveniente da Ásia tropical. É uma planta anual, herbácea, prostrada, de hastes trepadoras e folhas pecioladas, grandes e aveludadas, com 3 a 5 lobos. O melão é razoavelmente rico em vitaminas, possui propriedades estimulantes, diuréticas e laxativas (GAYET, 2003). Segundo Kirkbride et al. (1993), as diferentes variedades são classificadas de acordo com suas características fenotípicas, incluindo-se entre as principais, agrestis, flexuosos, conomon, chito, dudaim, momordica, cantalupensis e inodorus, sendo as duas últimas as mais utilizadas comercialmente.

A região Nordeste é a maior produtora de melão do Brasil, com uma produção de 332.879 toneladas e uma área plantada de 13.249 ha. O Estado do Rio Grande do Sul ocupa o segundo lugar com uma produção de 14.586 toneladas e 2.392 ha de área colhida. A região Sul do RS é a principal produtora desta fruta, com uma produção de 12.394 t e 2.126 ha de área colhida. O Brasil é um país exportador de melão, principalmente para a Europa, incluindo Espanha (19.119 ton) e Países Baixos (17.736 t) (AGRIANUAL, 2008). Além de sua importância na pauta de exportações do agribusiness, o cultivo de melão, sob o ponto de vista sócio-econômico, representa uma importante atividade geradora de empregos, sobretudo por ser desenvolvida quase que exclusivamente por pequenos produtores em áreas tipicamente de agricultura familiar (TEIXEIRA, 2004).

Um dos graves problemas da cultura do melão é a rápida deterioração de suas frutas (PECH et al. 1994). De maneira geral, os melões são enquadrados como frutos climatéricos, altamente perecíveis, com uma vida de prateleira de 4 a 10 dias, dependendo da cultivar, das condições de cultivo e ponto de colheita. As principais causas dessa alta perecibilidade são a elevada percentagem de água, a baixa

acidez, a estrutura celular com grandes vacúolos e espaços intercelulares e o acelerado metabolismo, envolvendo principalmente elevada produção de etileno, considerado o hormônio do amadurecimento (ZAREMBINSKI; THEOLOGIS, 1994).

Para contornar estas dificuldades, a associação de técnicas bioquímicas, moleculares e de cultura *in vitro* de tecidos vegetais, permite a manipulação genética de plantas buscando o controle da expressão de genes envolvidos na via da biossíntese do etileno (PENROSE; GLICK, 1997).

O objetivo no presente trabalho foi o de desenvolver um protocolo de regeneração eficiente para o melão, cv. Gaúcho, para posterior transformação genética das células/tecidos desta cultivar, a fim de aumentar o seu tempo de prateleira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- AGRIANUAL. FNP – Consultoria & Comércio. **Anuário da Agricultura Brasileira**. ARGOS, São Paulo, p.186-191, 2008.
- GAYET, J.P. Melão para exportação: procedimentos de colheita e pós colheita. **Frupep**. Brasília, p.36, 2003.
- KIRKBRIDE, J.H.Jr. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae). **Parkway Publishers**, Bonne, North Carolina (USA), p.159, 1993.
- PECH, J.C., RAYNAL, J.; LATECHÉ, A. Physiologie des fruits à noyau lors du développement et de la maturation sur l'arbre. In Actas del seminário celebrado em la fira de lleida, **Lleida-España**, Octubre, p.17-35, 1994.
- PENROSE, D.M, GLICK, B.R. Enzymes that regulate ethylene levels. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.35, n.1, p.1-7, 1997.
- TEIXEIRA, A.P.M. **Identificação de marcadores moleculares ligados a gene de resistência ao vírus do mosaico (PRSV-W) em melão (*Cucumis melo* L.)**. 2004. 4f. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo.

ZAREMBINSKI, T.I.; THEOLOGIS, A. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1579-1597, 1994.

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico

PROJETO DE PESQUISA

**REGENERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MELÃO, CV.
GAÚCHO**

**Equipe: Eng^o. Agr. Dr. José Antonio Peters
Bióloga Daiane de Pinho Benemann**

Pelotas, Maio de 2008

2.1 Caracterização do Problema

O Brasil é um país exportador de frutos de melão, sendo a cultura desenvolvida principalmente na região Nordeste, com uma produção de 332.879 toneladas em uma área de 13.249 ha, O Estado do Rio Grande do Sul é o segundo pólo produtor desta fruta, com uma produção de 12.394 toneladas e 2.126 ha de área colhida (AGRIANUAL, 2008). Além de sua importância na pauta de exportações do agribusiness, o cultivo de melão, sob o ponto de vista sócio-econômico, representa uma importante atividade geradora de empregos, sobretudo por ser desenvolvida quase que exclusivamente por pequenos produtores em áreas tipicamente de agricultura familiar (TEIXEIRA, 2004).

Um dos graves problemas do melão é a sua rápida deterioração, que pode ser devido o processo de senescência, injúrias físicas e mecânicas, danos causados por microrganismos e por outros seres, alterações puramente químicas ou distúrbios fisiológicos (PECH et al. 1994). De maneira geral, os melões são enquadrados como frutos altamente perecíveis, com uma vida de prateleira de 4 a 10 dias, dependendo da cultivar, das condições de cultivo e ponto de colheita. As principais causas dessa alta perecibilidade são a elevada percentagem de água, a baixa acidez, a estrutura celular com grandes vacúolos e espaços intercelulares e o acelerado metabolismo. A maioria dos eventos fisiológicos relacionados com a maturação de melões do tipo climatérico é coordenada pelo etileno (ZAREMBINSKI; THEOLOGIS, 1994). Este fitorregulador de crescimento desempenha um papel fundamental na indução da maturação/senescência dos frutos. Para contornar estas dificuldades, a associação de técnicas bioquímicas, moleculares e de cultura *in vitro* de tecidos vegetais, permite a manipulação genética de plantas buscando o controle da expressão de genes envolvidos na via da biossíntese deste hormônio (PENROSE; GLICK, 1997).

Os últimos avanços no campo da engenharia genética têm possibilitado a obtenção de plantas geneticamente modificadas de melão, apresentando uma maturação retardada dos frutos após a colheita (AYUB; PECH, 1997). Porém, para a aplicação desta tecnologia é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos eficientes de regeneração de plantas, através da cultura de tecidos. Gemas e brotos de melão foram obtidos diretamente de cotilédones (NIEDZ et al., 1989) e

folhas (YADAV et al., 1996) e indiretamente de calos derivados de cotilédones (MOLINA; NUNEZ, 1995) e hipocótilos (KATHAL et al., 1986). Dentre diferentes tipos de explantes utilizados, Molina e Nuez (1995) observaram maior frequência de regeneração quando utilizaram explantes foliares e cotiledonares, embora os últimos tenham, segundo Dirks e Van Buggenum (1989), respostas mais rápidas.

A transformação genética consiste em transferência específica de genes que controlam características, também específicas, de um ser para outro, produzindo com isso, os organismos geneticamente modificados (MACHADO; MELO, 1999). Os métodos mais empregados atualmente para a técnica da transformação são o de bombardeamento de partículas, eletroporação (método direto) e *Agrobacterium* (método indireto). O desenvolvimento de uma planta transformada envolve algumas etapas como transferência e integração de DNA exógeno em uma planta receptora, seleção do material vegetal transformado, regeneração de plantas e, análise e verificação da expressão dos genes de interesse (FERREIRA et al., 1998).

As primeiras plantas transgênicas de meloeiro, obtidas pela transformação de cotilédones com *Agrobacterium tumefaciens*, foram obtidas por Fang e Grumet (1990). A partir daí, várias plantas de meloeiro foram transformadas, utilizando este sistema (DONG et al., 1991; EZURA et al., 1992; GONÇALVES et al., 1994; AYUB et al., 1996; SILVA, 2000), e por biobalística (GABA et al., 1992).

Hipóteses:

- Células e/ou tecidos de plantas têm a capacidade de regenerar uma nova planta, quando colocadas sob condições adequadas;
- A capacidade de regeneração depende do tipo de explante e das condições de cultura a que são submetidas as células e/ou tecidos *in vitro*;
- Genes para determinadas características qualitativas podem ser inseridas e integradas no genoma de células cultivadas *in vitro*.

Objetivos:

O objetivo deste trabalho é buscar um protocolo de regeneração eficiente para a cv. Gaúcho de melão para posterior transformação genética visando a diminuição da produção de etileno.

2.2 Metodologia e Estratégia de ação

2.2.1 Explantes

Para este estudo serão utilizados explantes cotiledonares, oriundos de sementes maduras de melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho.

2.2.2 Regeneração

Para a obtenção de um protocolo de regeneração eficiente, será testado diferentes meios (MS, 2mg L⁻¹ ANA e 2 mg L⁻¹ BAP) e tempos (1, 2, 3 e 4 dias) de germinação das sementes e diferentes meios de regeneração (2,2 g L⁻¹ CaCl₂ + 0,3 mg L⁻¹ ABA + 0,5; 0,9; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ BAP). Também será verificado se o tamanho dos cotilédones afetará no desenvolvimento regenerativo dos explantes, para isto, estes serão cortados em 2, 3, 4 e 5 partes iguais e, se as diferentes densidades de fluxo de fótons(escuro e claro) interferem no desenvolvimento dos explantes.

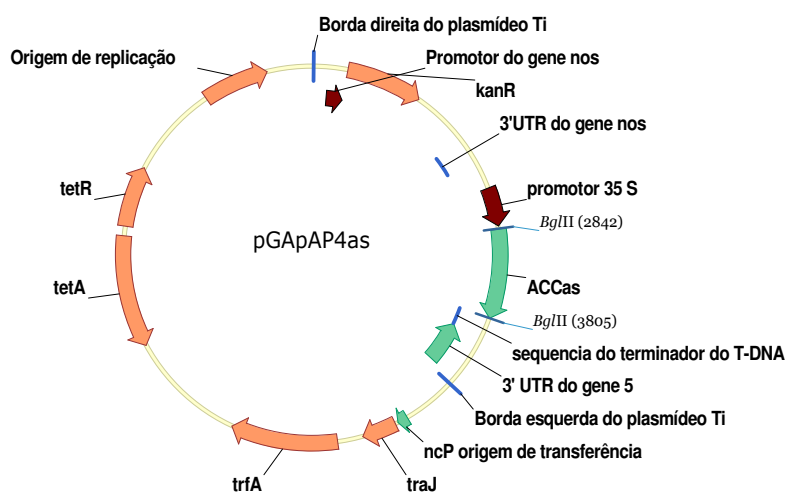
2.2.3 Seleção dos explantes transformados

Para a seleção dos explantes transformados, será realizado o teste com diferentes concentrações de canamicina.

2.2.4 Transformação Genética

O método de transformação utilizado será por *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404, contendo um plasmídeo com o gene da ACC oxidase em orientação antisense, denominada pAP4_{as}.

Desenho do plasmídeo pGApAP4 em orientação antisense utilizado para transformação genética em melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho.



2.2.5 Testes para verificação da transformação

Para a verificação da inserção do gene da ACC oxidase será extraído o DNA das plantas que supostamente foram transformadas e então será verificada a presença dos genes de interesse pela técnica de PCR.

2.2.6 Sequenciamento

Os fragmentos serão amplificados e preparados com DYEnamic ET terminators sequencing kit (GE Healthcare) e analisados por sequenciamento em um seqüenciador automático MegaBACE 500 (GE Healthcare). A qualidade da sequência de DNA será verificada pela sobreposição dos fragmentos reunidos usando os programas BioEdit, Vector NTI 10.0, AlignX and ContigExpress (Invitrogen). Os fragmentos de elevada qualidade serão reunidos com o programa CLUSTALX (Thompson et al., 1997).

2.3 Resultados e Impactos esperados

Protocolo de regeneração eficiente e a presença do gene de interesse inserido no genoma da planta de melão.

Indicadores de resultados ao final do projeto:

Caso isto ocorra a técnica de transformação genética poderá ser evidenciada como uma ferramenta para retardar a síntese do etileno e consequentemente o atraso na maturação da fruta, aumentando, o tempo de prateleira.

Repercussão e/ou impactos dos resultados:

Os resultados, caso positivos, servirão de subsídios para trabalhos de melhoramento para em melão, utilizando a biotecnologia como uma ferramenta, pois estes dependem de um conhecimento preciso da técnica de transformação genética e também de regeneração de plantas.

Riscos

Os maiores riscos poderão ser as contaminações dos explantes, e a não obtenção das plantas transformadas.

2.5 Referências Bibliográficas

- AGRIANUAL. FNP – **Consultoria & Comércio. Anuário da Agricultura Brasileira.** São Paulo: ARGOS, p.186-191, 2008.
- AYUB, R.A.; GUIS, M.; BEM-AMOR, M.; LACHE, A. BOUZAYEM, M.; PECH, J.C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of Cantaloup melon fruits. **Nature Biotechnology**, n.14, p.826-866, 1996.
- AYUB, R.A.; PECH, J.C. Uso da estratégia do RNA antisense no desenvolvimento de uma variedade de melão transgênico e maturação retardada. **In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal**, Anais, Gramado, v.2, p. 28, 1997.
- DIRKS, R.; VAN BUGGENUM, M. In vitro plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, New York, v.7, p.626-627, 1989.
- DONG, J.Z.; YANG, M.Z.; JIA, S.R.; CHUA, N.H. Transformation of melon and expression from cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. **Biotechnology**. v.9, p.858-863, 1991.
- EZURA, H.; AMAGAI, H.; YOSHIOKA, K.; OSAWA, K. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in the tissue cultures of melon. **Plant Cell Reports**. v.9, p.160-164, 1992.
- FANG, G.; GRUMET, R. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. **Plant Cell Reports**. v.9, p.160-164, 1990.
- FERREIRA, A.T.; PETERS, J.A.; TORRES, A.C. Transformação de plantas e estratégias para a produção de plantas transgênicas resistentes a vírus. **ABCTP Notícias**, n.31, 1998.
- GABA, V.; KLESS, H.; ANTIGNUS, Y. Transformation of melon by particle acceleration. **Plant Physiology**, v.99, p.137,1992.
- GONÇALVES, C.; XUE, B.; YEPES, M.; et al. Transdering cucumber mosaic virus – white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. **Journal of American Society in Horticulture Sciences**. v.119, p.345-355, 1994.
- KATHAL, R; BHATNAGAR, S.P.; BHOJWANI, S.S. Regeneration of shoots from hypocotyl callus of *Cucumis melo* cv. Pusa sharbati. **Journal Plant Physiology**, v.126, p.59-62, 1986.
- MACHADO, J.R.A.; MELO, B. **Circular Monsanto**, 1999.

- MOLINA, R.V.; NUEZ, F. Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.129-132, 1995.
- NIEDZ, R.P.; SMITH, S.S.; DUNBAR, K.V.; STEPHENS, C.T.; MURAKISHI, H.H. Factors affecting shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.18, p.313-319, 1989.
- PECH, J.C., RAYNAL, J.; LATECHÉ, A. Physiologie des fruits à noyau lors du développement et de la maturation sur l'arbre. In Actas del Seminário Celebrado em la Fira de Lleida, **Lleida-España**, Octubre, p.17-35, 1994.
- PENROSE, D. M. & GLICK, B. R. Enzymes that regulate ethylene levels. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.35, p.1-17, 1994
- SILVA, J.A. **Caracterização bioquímico-molecular e inibição da síntese de ACC oxidase em frutos climatérios**. Pelotas, 2000. 83f. Tese de Doutorado em Biotecnologia – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- TEIXEIRA, A. P. M. **Identificação de marcadores moleculares ligados a gene de resistência ao vírus do mosaico (PRSV-W) em melão (*Cucumis melo* L.)**. São Paulo, 2004. 4f. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- THOMPSON, J.D.T.J.; GIBSON, F.; PLEWNIAC, F. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.
- YADAV, R.S.; SALAH, M.T.; GRUMET, R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.45, p.207-214, 1996.
- ZAREMBINSKI, T.I.; THEOLOGIS, A. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p.1579-1597, 1994.

ARTIGO 1

REGENERAÇÃO DE COTILÉDONES DE MELÃO CV. GAÚCHO

Revista Acta Scientiarum. Agronomy (on-line)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de estabelecer um protocolo de regeneração eficiente *in vitro* de explantes cotiledonares de melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho. Para tal fim, foram realizados três experimentos, nos quais cotilédones obtidos em diferentes períodos de germinação das sementes, foram divididos em vários explantes e submetidos a diferentes meios de regeneração e densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. No primeiro experimento, os cotilédones foram divididos em 2, 3, 4 e 5 partes iguais e, inoculados em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,9 mg L⁻¹ BAP, 0,3 mg L⁻¹ ABA e 2,2 g L⁻¹ CaCl₂. No segundo, utilizando o mesmo meio de cultura do experimento anterior, os cotilédones foram submetidos a diferentes densidades de fluxo de fótons. Finalmente, procurou-se estabelecer as condições ideais para germinação das sementes e suas influências na regeneração cotiledonar quando os mesmos foram submetidos a diferentes concentrações de BAP. Observou-se que cotilédones seccionados em 5 partes apresentaram maior média de explantes regenerantes. Já os cotilédones que permaneceram sob intensidade luminosa de 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram maior média de explantes regenerantes e os que ficaram no escuro apresentaram maior média de explantes com calos e raiz. Observou-se também que quanto maior o período germinativo e maiores concentrações de BAP no meio regenerativo, menor é a taxa de explantes regenerantes.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L., meio de cultura, densidade de fluxo de fótons .

ABSTRACT

The objective of the present work was to establish an efficient *in vitro* regeneration protocol for melon (*Cucumis melo* L.), cv. 'Gaúcho' using cotyledons as explants. Here we performed three experiments; cotyledons obtained from different periods of germination were sectioned in segments and cultivated on different regeneration mediums under different density of photosynthetic actives photon flux. In the first experiment, the cotyledons were sectioned in 2, 3, 4 and 5 equal parts and cultivated on MS medium containing 30 g L⁻¹ of sucrose, 0,9 mg L⁻¹ BAP, 0,3 mg L⁻¹ ABA and 2,2 g L⁻¹ CaCl₂, under normal light conditions. The second experiment was equal to the first experiment excepted the cotyledons were regenerated under different density of photon flux. In the third experiment, we aimed to

establish the right conditions for seed germination in terms of period, BAP concentration and their influence in the cotyledon regeneration. The frequency of regeneration was higher when the cotyledons were sectioned into five segments and cultivated under light intensity of $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cotyledons cultivated in the dark formed callus and roots. Longer germination period and higher concentration of BAP in the regeneration medium were associated with lower frequency of regeneration.

Key-words: *Cucumis melo* L., culture medium, flux of photons density

INTRODUÇÃO

A morfogênese, ou seja, o estudo da emergência e da forma de novos órgãos, resulta da interação de processos de indução, competência celular, determinação e diferenciação celular, os quais são influenciados pelo meio de cultivo, genótipo, tipo e condições fisiológicas dos explantes e condições físicas do cultivo *in vitro* (Klerk, 1990; Litz, 1993).

Os últimos avanços no campo da engenharia genética têm possibilitado a obtenção de plantas geneticamente modificadas de melão, apresentando uma maturação retardada dos frutos após a colheita (Ayub e Pech, 1997). Porém, para a aplicação desta tecnologia é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos eficientes de regeneração de plantas, através da cultura de tecidos. Gemas e brotos de melão têm sido obtidos diretamente de cotilédones (Niedz *et al.*, 1989) e folhas (Yadav *et al.*, 1996) e indiretamente de calos derivados de cotilédones (Molina e Nunez, 1995a) e hipocótilos (Kathal *et al.*, 1995). Dentre os diferentes tipos de explantes utilizados para regeneração em melão, explantes foliares e cotiledonares têm apresentado maior taxa de regeneração (Molina e Nuez, 1995a), embora os últimos têm apresentado resposta mais rápida (Dirks e Van Buggenum, 1989).

As respostas para regeneração *in vitro* são altamente dependentes do genótipo empregado, fato observado em vários trabalhos com melão (Oridate *et al.*, 1992; Gray *et al.*, 1993; George, 1993; Molina e Nuez, 1995b;). Por esta razão é muito importante o desenvolvimento de protocolos de regeneração para variedades específicas visando à otimização da resposta *in vitro*. Convém salientar ainda, que a maioria dos estudos já realizados são com melões do grupo cantalupensis e, se faz necessário, portanto, estudos com outras variedades (Guis *et al.*, 1997).

Outro fator que afeta a regeneração é a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos a que as culturas são submetidas *in vitro*. Assim, Dong *et al.* (2006) verificaram que baixas intensidades luminosas melhoravam as taxas de regeneração de explantes de folhas de

Parthenium argentatum em 3 a 4 vezes quando comparada à explantes expostos a altas densidade de fluxo de fótons. Semelhantemente, Cade *et al.*, (1988) e Malepszy, (1988) demonstraram que baixa intensidade luminosa ou mesmo ausência completa de luz, induzia a formação de brotações e a embriogênese somática de algumas espécies de cucurbitáceas.

Assim, o estabelecimento de protocolos eficazes de regeneração *in vitro* é absolutamente necessário para a aplicação de modernas técnicas de biologia molecular e de transformação genética. Em consequência do exposto acima, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a regeneração *in vitro* de explantes cotiledonares de melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho, em diferentes meios de cultura, cortes cotiledonares e densidades de fluxo de fótons.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo utilizaram-se explantes cotiledonares, oriundos de sementes maduras de melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho. Após serem separadas do seu tegumento, as sementes foram desinfestadas através da imersão por 20 min em hipoclorito de sódio 2%, juntamente com uma gota de detergente, seguida de três lavagens em água destilada e esterilizada, antes de serem colocadas para germinação.

Experimento I

Para verificar a influência do número de cortes dos cotilédones sobre a eficiência na regeneração dos mesmos, as sementes após desinfestação foram colocadas para germinação em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) sob condições assépticas. Após 24h, os cotilédones foram separados, divididos em 2, 3, 4 e 5 partes iguais e, inoculados em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,9 mg L⁻¹ BAP (benzilaminopurina), 0,3 mg L⁻¹ ABA (ácido abscísico) e 2,2 g L⁻¹ CaCl₂ (cloreto de cálcio). Os meios tiveram seus pHs ajustados para 5,8 antes da adição do ágar (7 g L⁻¹) e foram autoclavados durante 20min a 121 °C e 1,5 atm. O ABA, esterilizado através de filtro millipore, foi adicionado aos meios após autoclavagem.

Após inoculação dos explantes nos meios de cultura, os frascos foram transferidos para sala de crescimento, com fotoperíodo de 16h, temperatura de 25 ± 2 °C e, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 21 μmol m⁻² s⁻¹, por 45 dias.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por 10 explantes, totalizando 30 explantes por tratamento. Ao final do experimento foi avaliado o número médio de explantes regenerantes obtidos das diferentes excisões cotiledonares.

Os dados foram submetidos à análise de variância considerando intensidade de luz como fator fixo e qualitativo, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System, 2002). Os valores referente à variável explantes regenerantes foram transformados para raiz quadrada de $(x+1)$.

Experimento II

Visando analisar qual a densidade de fluxo de fótons ideal para regeneração dos explantes, cotilédones divididos em cinco partes e obtidos conforme descrito acima, foram inoculados no mesmo meio utilizado no experimento I. Após a inoculação dos explantes os frascos foram transferidos para sala de crescimento sob diferentes condições de luminosidade, ou seja, escuro, $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz fraca) e $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz forte), fotoperíodo de 16h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 45 dias. Para cada tratamento foi utilizado 6 repetições, com 8 explantes por repetição, totalizando 48 explantes por tratamento. As variáveis analisadas foram o número médio de explantes regenerantes, com calos friáveis e raiz, nas diferentes condições de luminosidade. Os dados foram submetidos à análise de variância considerando os diferentes tipos de corte como fator fixo e quantitativo, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System, 2002).

Experimento III

Neste experimento procurou-se estabelecer as condições para germinação das sementes e suas influências na regeneração de cotilédones de meloeiro, da cv. Gaúcho. Para tal finalidade as sementes, após desinfestação, foram cultivadas em três meios de cultura: T₁- MS sem regulador de crescimento; T₂- MS + 2 mg L^{-1} ANA (ácido naftalenoacético); T₃- MS + 2 mg L^{-1} BAP. Os meios foram preparados conforme especificado nos experimentos anteriores. Após a colocação das sementes nos meios de cultura, estes foram transferidos para câmara de crescimento, no escuro, por 1, 2, 3 e 4 dias. Após cada período, os cotilédones foram separados e divididos em cinco partes, totalizando 10 explantes por semente. Os cotilédones foram inoculados em meio MS + 30 g L^{-1} sacarose + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ABA + $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ CaCl₂ acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,5; 0,9; 1,5 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$). O experimento foi conduzido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 45 dias.

Empregou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições, com 20 explantes por repetição, totalizando 80 explantes por tratamento. Os dados referentes a este experimento foram analisados através do sistema estatístico SAS (Statistical Analysis

System, 2002). Os dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno raiz quadrada de $(x/100)$, onde x representa o valor percentual obtido para as variáveis analisadas.

As variáveis analisadas foram as percentagens de explantes regenerantes e com calos. Após avaliação os explantes que apresentaram brotações e gemas foram repassados para meio de alongamento MS acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,01 mg L⁻¹ BAP, 1 mg L⁻¹ GA₃, 0,001 mg L⁻¹ ANA visando o alongamento das mesmas..

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 45 dias de estabelecimento dos cultivos *in vitro*, no primeiro experimento, verificou-se que os explantes que foram seccionados em 5 partes obtiveram maior número médio de explantes regenerantes (8,66), porém os resultados não diferiram dos que foram seccionados em 3 e 4 partes (7,66 e 8,33 respectivamente). Já os explantes que foram seccionados em 2 partes apresentaram menor média (5,33) e não diferiram daqueles explantes seccionados em 3 partes, porém diferiu do restante, como mostra a tabela 1. Observou-se alta taxa de regeneração (5,33 a 8,66) em todos os tratamentos e que explantes oriundos de um corte cotiledonar, apresentavam brotações de maior tamanho (figura 1) que aqueles que sofreram maior número de cortes; tal fato pode ter ocorrido em função do tamanho do explante.

Tabela 1. Número médio de explantes regenerantes obtidos a partir de cotilédones de melão, cv. Gaúcho, seccionados em diferentes tamanhos.

Table 1. Average number of regenerated explants, from cotyledons sectioned into different fragments in melon, cv. 'Gaúcho'.

Número de Secções	Número Médio de Explantes Regenerantes
2	5,33 ^B
3	7,66 ^{AB}
4	8,33 ^A
5	8,66 ^A

Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncam.



Figura 1. Regeneração de cotilédones de melão, cv. Gaúcho, avaliados após 45 dias, seccionados em diferentes partes: A - duas partes; B - três partes; C - quatro partes; D - cinco partes.

Figure1. Regeneration from cotyledons in melon, cv. 'Gaúcho' after 45 days. The cotyledons were sectioned into five segments: A – two segments; B – Three segments; C – four segments; D – five segments.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva (2000), que utilizando cotilédones de melão, cv. Cantaloup, divididos em cinco partes obteve mais de 80% de regeneração, embora 75% destes fossem tetraplóides. O meio de cultura empregado neste trabalho, continha somente uma citocinina (BAP) e um inibidor de crescimento (ABA), diferentemente do meio utilizado por Tabei *et al.* (1991), que trabalhando com cotilédones de melão, cv. Earl's, divididos em duas partes, obtiveram 80% de regeneração utilizando 25 mg L^{-1} de AIA. Já, Pereira *et al.* (1997), utilizando a mesma cultivar empregada neste trabalho e cotilédones divididos em seis partes (5x5 mm), obtiveram 100% de explantes regenerantes.

No segundo experimento, os explantes que permaneceram na luz fraca, obtiveram maior número médio de explantes regenerantes (2,83), diferindo estatisticamente daqueles expostos a luz forte, porém não diferiu dos explantes que permaneceram no escuro. Com relação aos explantes com calos e raiz, que permaneceram no escuro, os resultados diferiram dos que permaneceram sob condições de luminosidade (luz fraca e luz forte), não havendo diferença entre esses dois. Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, Niedz *et al.* (1989) estudando o efeito da intensidade luminosa na indução de brotações em melão, não obtiveram regeneração na ausência de luz. Já Dong *et al.* (2006), trabalhando com folhas de guayule (*Parthenium argentatum*), obtiveram maior percentagem de brotação quando utilizaram $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Tabela 2. Número médio de explantes regenerantes, com calos e com raiz nas diferentes condições de luminosidade, escuro ($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), luz fraca ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e luz forte ($21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dentro da sala de crescimento.

Table 2.. Average number of regenerated explants forming callus and roots, after cultured in different light conditions. The light conditions were: without light - dark ($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), low light ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and high light ($21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Diferentes condições de luminosidade	Explantes Regenerantes	Explantes com calos	Explantes com Raiz
$0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	2,00 ^{AB}	7,33 ^A	0,66 ^A
$2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	2,83 ^A	0 ^B	0 ^B
$21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1,66 ^B	1,16 ^B	0 ^B

Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncam.

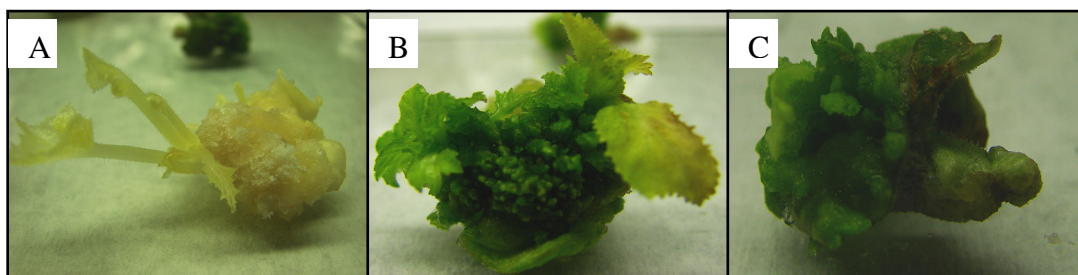


Figura 2. A- Explantes que permaneceram no escuro ($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); B- luz fraca ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); C- luz forte ($21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Figure 2. Explants cultivated in different light conditions: A – without light-dark ($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); B – low light ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); C- high light ($21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Como os melhores resultados nos experimentos 1 e 2, foram obtidos com explantes divididos em 5 partes e com densidade de fluxo de fótons entre 2 e $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, essas condições, foram utilizadas no último experimento, no qual foram alterados os tempos e meios de germinação das sementes e o meio de regeneração dos cotilédones.

No terceiro experimento, quanto a formação de calos, os explantes oriundos dos meios sem regulador de crescimento (figura 3) e do meio contendo BAP apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, observou-se um aumento dos calos com o acréscimo do período de germinação e com o aumento das concentrações de BAP no meio regenerativo, havendo interação entre esses dois fatores, já os explantes oriundos do meio contendo ANA, não houve interação entre os fatores mencionados, embora também tenha tido um aumento de calos, com o aumento destes.

Pereira *et al.* (1999), trabalhando com melão cv. Gaúcho e Imperial, utilizando os mesmos reguladores de crescimento deste trabalho, verificaram a formação de calos acima de 90% em todos os seus tratamentos. Segundo Roustan *et al.*, (1992) e Ficcadenti *et al.* (1995), a calogênese ocorria juntamente com a formação de gemas e brotos.

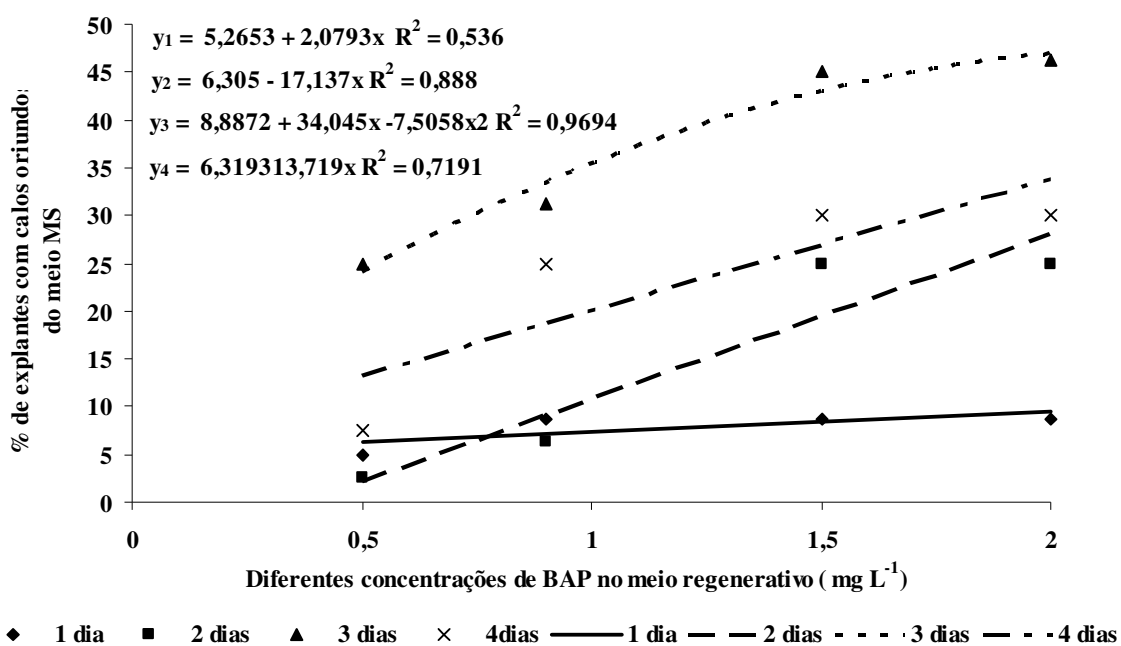


Figura 3. Percentagem de explantes com calos oriundos do meio germinativo sem regulador de crescimento e posteriormente inoculados em diferentes concentrações de BAP no meio regenerativo.

Figure3. Percentage of explants forming callus. Those explants were first cultivated in a germination medium without any growth regulator and, later on they were transferred and cultivated in a regeneration medium containing different concentrations of BAP.

Quanto à taxa de regeneração, verificou-se que os explantes oriundos do meio T1, ou seja, sem regulador de crescimento, diminuíram com o aumento dos dias no meio de germinação e também com o aumento das concentrações de BAP no meio regenerativo (1 e 2 dias) e, os explantes que permaneceram no meio germinativo por 3 e 4 dias, a taxa de regeneração se manteve estável com o aumento das concentrações de BAP no meio regenerativo (figura 4).

Como pode ser observado nesta figura, as maiores percentagens de regeneração ocorreram com explantes obtidos de sementes germinadas por 1 e 2 dias e em menores concentrações de BAP. No meio T2, ou seja, contendo ANA, não ocorreu interação entre os fatores citados, porém, apresentou resultado semelhante ao anterior. Já no meio germinativo

contendo BAP, com o aumento do período neste meio, houve uma redução da taxa de explantes regenerantes e no meio regenerativo, não houve diferença estatística a medida que se aumentava as concentrações de BAP, de 0,5 à 2,0 mg L⁻¹.

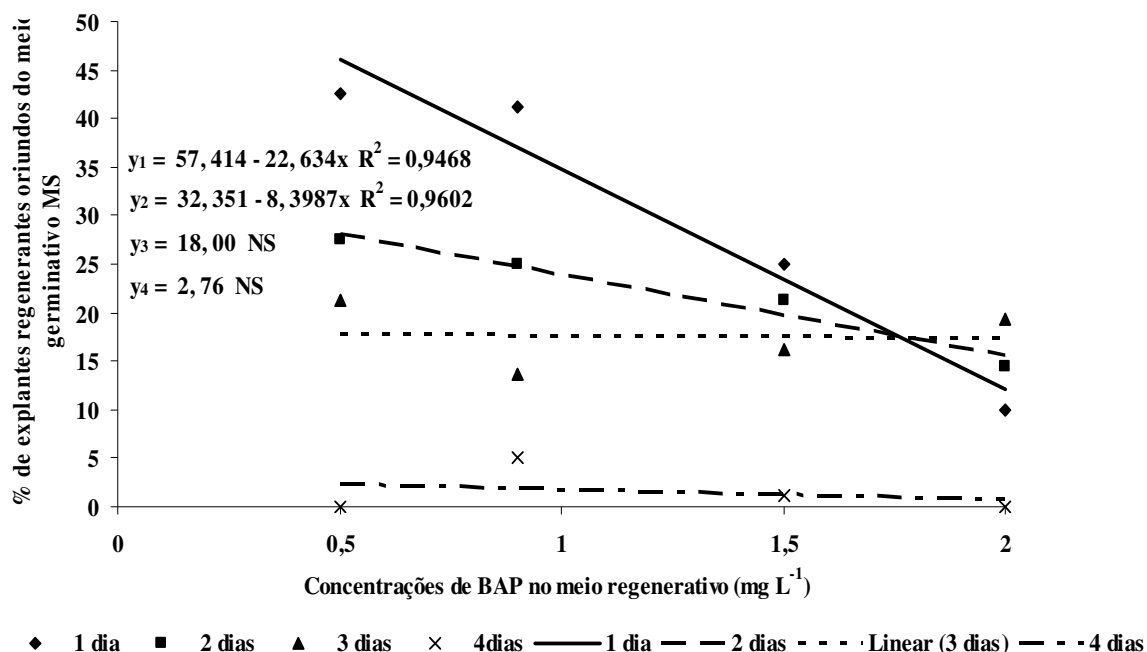


Figura 4. Percentagem de explantes regenerantes oriundos do meio germinativo MS e posteriormente inoculados em diferentes concentrações de BAP no meio regenerativo.

Figure 4. Percentage of regenerated explants. Those explants were first cultivated in a germination medium MS and, later on they were transferred and cultivated in a regeneration medium containing different concentrations of BAP.

Alguns autores (Niedz *et al.*, 1989; Leshem, 1989; Ficcardenti *et al.*, 1995) recomendam a utilização de cotilédones com 4 a 5 dias de germinação. Porém, neste trabalho observou-se que cotilédones com 4 dias de germinação tem uma significativa redução na taxa de regeneração em relação aqueles retirados de sementes após 1 e 2 dias do início da germinação. As divergências de resultados obtidos neste trabalho e por outros autores deve-se, provavelmente, ao fato de, na maioria desses trabalhos, terem sido testados cotilédones com mais de 4 dias de germinação.

Nora (2000), buscando um protocolo que fosse eficiente na regeneração para posterior transformação genética do melão cv. Gaúcho, observou que as maiores taxas de regeneração foram obtidas com cotilédones de um dia de germinação (48,34) nos meios de regeneração contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,9 mg L⁻¹ de BAP, 0,3 mg L⁻¹ de ABA e 2,2 g L⁻¹ de CaCl₂. Pereira *et al.*, (1999), apresentaram resultados semelhantes, pois obtiveram maior taxa de regeneração em meio contendo 2,2 g L⁻¹ de CaCl₂, 0,84 e 0,26 mg L⁻¹ de BAP e ABA,

respectivamente. Para alguns autores (Bobrowski *et al.*, 1997; Pereira e Pech, 1997), o aumento na concentração de cloreto de cálcio no meio de cultura é um importante fator para a obtenção de uma boa frequência de regeneração no meloeiro. Lucchesini e Vitagliano (1993), trabalhando com *Prunus cerucifera*, citam que o aumento nas concentrações de cálcio no meio de cultura promoveu um aumento do número e tamanho das brotações.

Vários estudos demonstram que a combinação de determinados reguladores de crescimento estimulam a organogênese “*in vitro*”. Citocininas são normalmente utilizadas por induzirem a formação de um grande número de brotos, estimulando a produção de parte aérea e altas taxas de multiplicação. Ficcamenti e Rotino (1995) observaram que somente a presença de BAP em meio de cultura foi capaz de regenerar gemas e brotos, entretanto, esses mesmos autores observaram um aumento significativo no número de explantes produzindo brotações quando utilizaram a combinação de BAP e ABA nos meios de cultura para os diferentes genótipos testados. Pereira e Pech (1997) também obtiveram os melhores resultados com a adição de ABA no meio de cultura.

Em algumas cultivares de meloeiro, com maior potencial regenerativo, como é o caso do Cantaloup, estes percentuais atingem 70 e 80% (Guis *et al.*, 1997), diferentemente do cv. Gaúcho, cujos valores obtidos são normalmente menores, corroborando a afirmativa de Ficcamenti *et al.*, (1995), que ao estudar o efeito do meio de cultivo e genótipo na regeneração de cotilédones de melão, demonstraram que a resposta morfogênética é significativamente afetada pelo genótipo.

Os resultados encontrados nesse trabalho divergem de alguns autores em relação ao número de cortes cotiledonares, intensidade luminosa, dias de germinação e meios de regeneração, mas este fato é devido aos diferentes genótipos de melão estudados por cada um.

CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido o presente trabalho, pode-se concluir que:

- Cotilédones seccionados em 5 partes apresentaram maior médias de explantes regenerantes;
- Explantes que permaneceram sob intensidade luminosa de $2 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ apresentaram maior média de explantes regenerantes e cotilédones que ficaram no escuro, apresentaram maior média de explantes com calos e com raiz;
- Quanto menor o período de germinação e menor concentração de BAP no meio de regeneração, maior é a taxa de explantes regenerante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYUB, R. A.; PECH, J. C. Uso da estratégia do RNA antisense no desenvolvimento de uma variedade de melão transgênico e maturação retardada. **In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal**, Anais, Gramado, v.2, p.28, 1997.
- BOBROWSKI, V. L.; RADMANN, E. B. ROOS, F. C.; SILVEIRA, C. V.; PEREIRA, J. E. S. PETERS, J. A. Efeito da luz e da idade do explante sobre a taxa de regeneração em melão (*Cucumis melo* L.) **In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal**, Gramado, Anais, v.2, p.174, 1997.
- CADE, R. M.; WEHNER, T. C.; BLAZICH, F. A. Embryogenesis from cotyledon- derived callus of *Cucumis sativus* L. Cucurbit. Genetic. **Coop. Rep.** v.11, p.3-4, 1988.
- DIRKS, R.; VAN BUGGENUM, M. *In vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, New York, v.7, p.626-627, 1989.
- DONG, J.Z.; YANG, M.Z.; JIA, S. R.; CHUA, N. H. Transformation of melon and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. **Nature Biotechnology**, n.9, p.858-863, 2006.
- FICCADENTI, N. & ROTINO, G. L. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. **Plant Cell and Organ Culture**, v.40, p.293-295, 1995.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. **Part 1 the technology, 2nd edn.** Edington, UK: Exegetics Ltda. 1993.
- GRAY, D. J.; MCCOLLEY, D. W. COMPTON, M. E. High- Frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cotyledons. **Journal American Society for Horticultural Science**, v. 118, p.425-432 1993.
- GUIS, M.; LATCHÉ, A.; PECH, J. P. & ROUSTAN, J. P. An efficient method for the production of diploids Cantaloup Charentais Melon (*Cucumis melo* L. var. cantalupensis) by somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v.69, p.199-206, 1997.
- KATHAL, R; BHATNAGAR, S. P.; BHOJWANI, S. S. Regeneration of shoots from hypocotyl callus of *Cucumis melo* cv. Pusa sharbati. **Journal Plant Physiology**. v. 126, p.59-62, 1995.
- KLERK, G. J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 38, n.2, p.129-144, 1990.
- LESHEM, B. Polarity and responsive regions for regeneration in the culture melon cotyledons. **Journal Plant of Physiology**, v.135, p.237-239, 1989.

- LOWE, K. C.; DAWEY, M. R.; POWER, J. B. Plant tissue culture: past, present and future. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 2, p.175-186, 1996.
- LUCCHESINI, M.; VITAGLIANO, C. Effects of NaCl and CaCl₂ in *Prunus cerasifera* tissue culture. **Acta Horticulturae**, v.336, p.109-113, 1993.
- MALEPSZY, S. Cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: Bajaj Y. P. S. (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Springer, Berlin, v.6, p.277-293, 1988.
- MOLINA, R. V. & NUEZ, F. Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.129-132, 1995a.
- MOLINA, R. V., and NUEZ, F. Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.43, p.249-257, 1995b.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiological Plant**, v.15, p.473-497, 1962.
- NIEDZ, R. P.; SMITH, S. S.; DUNBAR, K. V.; STEPHENS, C. T.; MURAKISHI, H. H. Factors affecting shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.18, p. 313-319. 1989.
- NORA, F. R. Transformação genética do meloeiro (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho. Pelotas, 2000. 63-85p. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial** – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.
- ORIDATE, T.; OSAWA, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). **Japan Journal Breed**, v.36, p.424-428, 1992.
- PEREIRA, J. E. S.; CITADIN, I; PETERS, J. A. Efeito de diferentes meios de cultura na regeneração in vitro do meloeiro (*Cucumis melo* L.) ‘Gaúcho’ e ‘Hales Best Imperial’. **Revista Ciência Agrotécnica de Lavras**. v.23. n.3, p.540-546, 1999.
- PEREIRA, J. E. S.; PECH, J. C. Regeneração in vitro do meloeiro (*Cucumis melo* L.) var. ‘Vedrantais’ através de explantes cotiledonares. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Belém. Resumos. Belém: **Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal**, p.194, 1997.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started With the SAS Learning Edition**. Cary, NC:SAS Institute, p.86, 2002.
- ROUSTAN, J. P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Enhancement of shoot regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, n.140, p.485-488, 1992.

SILVA, J. A. Caracterização bioquímico-molecular e inibição da síntese da ACC oxidase em frutos climatérios. Pelotas, 2000. 65-89p. **Tese de Doutorado em Biotecnologia** – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

TABEL, Y.; KANNO, T.; NISHIO, T. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, v.10, p.225-229, 1991.

YADAV, R. S.; SALAH, M. T.; GRUMET, R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.45, p.207-214, 1996.

ARTIGO 2

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MELÃO, CV. GAÚCHO, UM
DESAFIO PARA A TÉCNICA**

NOTA CIENTÍFICA

REVISTA BRASILEIRA DE AGROCIÊNCIA

RESUMO

Estudou-se a eficiência da transformação do melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho utilizando a cepa LBA4404 contendo um plasmídeo com o gene da *ACC oxidase* em orientação antisense, denominada pAP4. Primeiramente, foi realizado teste de sensibilidade dos explantes ao antibiótico de seleção, determinando-se a concentração de 75 mg L⁻¹ de canamicina como ideal para selecionar as células transformadas. Para a regeneração de brotações os explantes foram cultivados em meio MS contendo 0,9 mg L⁻¹ BAP, 0,3 mg L⁻¹ ABA, 2,2 g L⁻¹ CaCl₂, 75 mg L⁻¹ canamicina e 250 mg L⁻¹ cefotaxima. Observou-se baixa taxa de regeneração dos explantes infectados e análises moleculares das brotações obtidas *in vitro* não confirmaram a integração do gene no genoma das mesmas. Os resultados demonstram que é necessário o desenvolvimento de um protocolo mais eficiente para a regeneração e alongamento das brotações para a cv. Gaúcho, bem como a utilização de outras cepas de *Agrobacterium*.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L., *Acc oxidase*, *Agrobacterium tumefaciens*, regeneração.

ABSTRACT:

Studies about the efficiency of melon transformation of the genetic transformation of melon (*Cucumis melo* L.), cv. 'Gaúcho' using *Agrobacterium*

tumefaciens LBA 4404, harbouring a plasmid transformed with an *ACC oxidase* gene clone in antisense orientation, named pAP4. Firstly, we performed a test to measure the explants sensibility to the antibiotic marker. Kanamycin concentration of 75 mg L^{-1} was effective to select transformed cells. For shoot regeneration, the explants were cultivated in MS medium containing $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ BAP, $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ABA, $2,2 \text{ g L}^{-1}$ CaCl_2 , 75 mg L^{-1} kanamycin and 250 mg L^{-1} cefotaxime. In our results, the frequency of regeneration was low and the molecular analyses did not confirm the insertion of the mentioned gene into plant genome. Therefore, we concluded that the transformation procedure we used was not suitable for the target plant in the present study moreover it is necessary to develop a more efficient protocol for regeneration and elongation of shoots suitable for cv. 'Gaúcho'.

Keywords: *Cucumis melo L.*, *ACC oxidase*, *Agrobacterium tumefaciens*, regeneration.

Os melões enquadram-se entre os frutos ditos de comportamento climatérico, cujo metabolismo de maturação/senescência é altamente dependente do etileno, apresentando baixo potencial de conservação, variando, dependendo da cultivar, de 4 a 10 dias sob condições ambientais (PETERS et al., 1999). Técnicas de biologia molecular oferecem hoje novas alternativas para o melhoramento das espécies, buscando atingir novos índices de produção e produtividade, bem como a alteração de características metabólicas de efeitos pouco desejáveis. No âmbito da fisiologia

pós-colheita estas técnicas têm sido utilizadas para diminuir a produção de etileno e retardar a maturação (LATCHÉ et al., 1995). Genótipos praticamente desprovidos de atividade da *ACC oxidase* (enzima formadora de etileno), têm servido de modelo vegetal para estudos dos efeitos específicos do etileno sobre as principais alterações detectadas durante o amadurecimento de frutos (ROMBALDI et al., 1996).

Em consequência do exposto acima, o objetivo neste trabalho foi o de estabelecer um protocolo de transformação genética para cultivar Gaúcho, com ênfase para a manipulação dos explantes utilizados antes do processo de infecção, no processo de infecção propriamente dito e no aumento do número de eventos de transformação.

Para a obtenção dos explantes, sementes previamente descascadas, foram desinfestadas com álcool 70%, durante 3min, solução de hipoclorito de sódio 2% por 15min, sob agitação, seguido de 3 lavagens em água destilada esterilizada. Posteriormente, as sementes foram pré-cultivadas por 24h, no escuro, em meio MS básico (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Após este período os cotilédones foram separados, divididos em 5 partes iguais e pré-cultivados por 1 dia, antes da infecção, em meio MS básico acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,9 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 2,2 g L⁻¹ de cloreto de cálcio (CaCl₂) e 0,3 mg L⁻¹ de ácido abscísico (ABA). O pH dos meios citados acima foram ajustados para 5,8, antes da adição do ágar (7 g L⁻¹), e autoclavados durante 20min a 121 °C e 1,5 atm. O ABA, esterilizado através de filtro millipore (0,22 µm) foi adicionado ao meio depois da autoclavagem do mesmo. Todo o processo foi realizado em câmara de crescimento com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16h e densidade de

fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 45 dias. Para testar a suscetibilidade à canamicina, os explantes foram cultivados no meio de cultura citado acima, ao qual foram adicionadas diferentes concentrações do antibiótico (0, 25, 50, 75 e 100 mg L^{-1}). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, totalizando 80 explantes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância para testar as fontes de variação e suas possíveis interações, posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa Statistix.

No processo de infecção, uma colônia de *A. tumefaciens* LBA4404 contendo o plasmídeo pGA643 com o gene *ACC oxidase* em orientação antisense (denominado pAP4_{as}), foi cultivada em meio líquido LB (Luria Broth) contendo 50 mg L^{-1} de rifampicina, 50 mg L^{-1} de canamicina, 5 mg L^{-1} de tetraciclina e 100 mg L^{-1} de acetoceringona. As culturas permaneceram sob agitação a 150 rpm, no escuro, por 16 horas, à 28°C , até obter-se uma $\text{DO}_{600} = 0,7$. Após a solução bacteriana ter alcançado a DO desejada, os explantes foram imersos nesta solução por 30min, secos em papel-filtro 3M, e co-cultivados por 72h, no escuro, em meio MS básico contendo 150 mg L^{-1} de acetoceringona. Após o co-cultivo, os explantes foram lavados em solução contendo 250 mg L^{-1} de cefotaxima por 20min e cultivados em meio seletivo de regeneração (MS com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de ABA e $2,2 \text{ g L}^{-1}$ CaCl_2 , 75 mg L^{-1} de canamicina e 250 mg L^{-1} de cefotaxima), permanecendo neste meio por 45 dias. Como controle negativo foram utilizados explantes que não passaram pelo processo de infecção (explantes não imersos em solução bacteriana), ou seja, foram transferidos para o meio de regeneração contendo 75 mg L^{-1} de canamicina. No controle positivo, explantes não infectados foram transferidos para o meio de regeneração sem adição de

antibióticos. Os explantes foram transferidos para meio fresco a cada 15 dias sendo que no quadragésimo quinto dia aqueles que se mantiveram vivos e regeneraram gemas e brotos foram transferidos para meio seletivo de alongamento (MS básico contendo 2% de sacarose, 0,01 mg L⁻¹ BAP, 5 mg L⁻¹ GA₃ e 50 mg L⁻¹ de canamicina), possibilitando assim o enraizamento das brotações. A análise dos transformantes foi realizada através da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando-se DNA total extraído de folhas das brotações desenvolvidas *in vitro*, conforme descrito por Doyle & Doyle (1987). Para verificar a presença do gene da *ACC oxidase* nas células foram utilizados dois pares de *primers*: (5'GGGCAAACACAAACAAGCC3' e 5'CGTGCCCCCAATGCGCCACG3), que delimita uma região de 1100pb da seqüência codificante do gene da *ACC oxidase*, e os *primers* 5' TAGCTAGCTTAGCTCATCGCA3' e 5'GGATGAAAGTGAATTAAAATTA3', seqüência específica para o gene *35S* encontrado no plasmídeo pGA643. Foram preparadas reações de 25µL, para cada amostra de DNA, contendo 2,5 µL de tampão de reação; 0,75 de MgCl₂ (50mM); 1,25 µL de *primer* (10mM); 1,0 µL de dNTP (10mM); 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹) e 5 µL de DNA extraído. O ciclo do PCR consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 40s a 50 °C e 50s a 72 °C. No ciclo final, a reação foi mantida por 7 min a 72 °C. O produto da reação de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% e o tamanho dos fragmentos comparados com o marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder) da Invitrogen.

Os plasmídeos contendo o gene de interesse foram preparados com DYEnamic ET terminators sequencing kit (GE Healthcare) e sequenciados em um seqüenciador automático MegaBACE 500 (GE Healthcare). A qualidade da seqüência de DNA foi verificada pela sobreposição das seqüências reunidas usando os programas BioEdit,

Vector NTI 10.0, AlignX and ContigExpress (Invitrogen). As seqüências de elevada qualidade foram reunidas com o programa CLUSTALX (THOMPSON et al., 1997).

No experimento com diferentes concentrações de canamicina, objetivando determinar a sensibilidade dos explantes a este antibiótico e determinar a menor concentração capaz de selecionar possíveis clones transformados dos não transformados, observou-se respostas diferentes em função da concentração utilizada. A concentração de 75 mg L⁻¹ de canamicina se mostrou a mais adequada para a seleção de explantes, determinando morte em 100% dos mesmos. Esta concentração é inferior a utilizada por VALLES & LASA (1994), para a seleção de clones de melão, cv. Amarillo Oro, com o mesmo antibiótico (100 mg L⁻¹). Os autores verificaram ainda que o uso do antibiótico cefotaxima (utilizado para eliminar o crescimento da *Agrobacterium*) empregado juntamente com a canamicina, no meio de seleção, aumentava a percentagem de explantes mortos, dependendo da concentração utilizada. AKASAKA-KENNEDY et al., (2004), mesmo utilizando baixas concentrações de canamicina (25 mg L⁻¹) para transformar embriões somáticos de melão cv. Vindrentais, obtiveram 83% de explantes transformantes. Para vários autores, os escapes são particularmente comuns em melão (DONG et al., 1991; GUI et al., 2000; GALPERIN et al., 2003).

Tecidos foliares de brotações regeneradas e em desenvolvimento foram utilizados para a extração e análise de DNA genômico através de PCR (Figura 1a). De um total de 4.070 explantes infectados, apenas 245 formaram gemas e/ou brotos. Apenas dois destes brotos regenerados se desenvolveram (Figura 1b) e enraizaram. Embora o meio utilizado no processo de transformação tenha sido estabelecido anteriormente em experimentos de regeneração, o mesmo não foi

eficiente para a obtenção de uma planta adulta, devido principalmente a problemas relacionados com o alongamento dos brotos.

A análise molecular através da técnica de PCR não confirmou a integração do gene em brotações regeneradas e selecionadas, (figura 1 do apêndice).

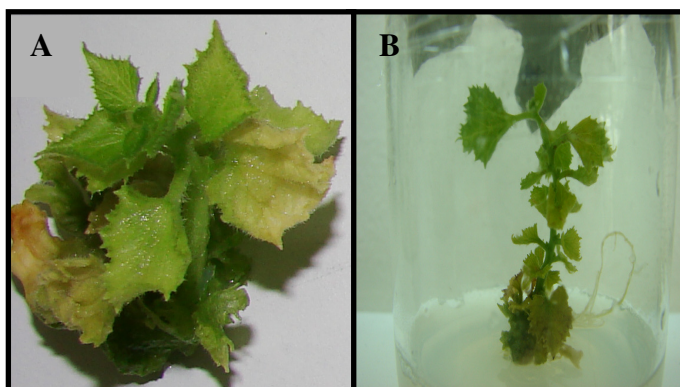


Figura 1. **A** – Brotações regeneradas a partir de explante cotiledonar de melão cv. Gaúcho; **B** - Brotação regenerada e alongada a partir de explante cotiledonar de melão cv. Gaúcho.

A sequência do gene presente no plasmídeo utilizado neste trabalho foi comparada com outras depositadas no GenBank, com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), o resultado obtido foi uma similaridade de 99% com *ACC oxidase* de melão (D31727).

A cepa de *Agrobacterium* utilizada para transformação neste trabalho foi a LBA4404 que tem sido a mais empregada na transformação genética do meloeiro de diversas cultivares, embora bons resultados também têm sido obtidos com a cepa C58 (GUIS et al., 1997). AKASAKA-KENNEDY et al. (2004), procurando estabelecer um protocolo eficiente de transformação em melão (cv. Vedrantaís), utilizando a cepa C58C1Rif^R, contendo o vetor binário pIG121Hm, obtiveram três plantas transgênicas de 130 explantes. Já GALPERIN et al. (2003), obtiveram melhores resultados utilizando a cepa EHA105, em relação a cepa LBA4404, resultando em 1,5 e 0,3 brotos transformados por explante (respectivamente). A utilização de genes repórteres, como o GFP (green fluorescent protein) e o GUS (B-glucuronidase), têm

sido bastante utilizados para a transformação do meloeiro, pois permite um certo controle da etapa de transformação (seja ela quanto as viabilidades da genética da cultivar ao processo físico da transformação, a viabilidade da cepa utilizada ou do plasmídeo que esta sendo utilizado) mesmo antes da realização da PCR. NORA (2000) utilizando o mesmo protocolo de regeneração utilizado nesse trabalho, não obteve explantes transformados via *A. tumefaciens*, embora tenha observado elevada expressão transiente em folhas utilizando o vetor pGUS_{Kan}, pelo método de bombardeamento de partículas, já a expressão transiente em calos e cotilédones foi bastante baixa, com o mesmo genótipo empregado neste trabalho. Já, SILVA (2000), utilizando a cepa LBA4404 e o vetor pGAP4_{as} na cv. Cantaloup de melão, obteve 3,0% de plantas transformadas, oriundas de explantes foliares e nenhuma planta transformada, quando utilizou explantes cotiledonares. Assim, embora seja o explante mais utilizado para a transformação de melão, o uso de cotilédones é ainda bastante crítico quando comparado com a utilização de folhas.

Além da variável tipo de explante, o genótipo a ser transformado pode determinar diferenças na percentagem de transformação, ou seja, ocorre uma grande variabilidade genética das diferentes cultivares em resposta ao processo físico de transformação e os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que a cv. Gaúcho apresenta um grau elevado de recalcitrância ao processo de transformação utilizado. Assim, para a utilização de cotilédones como explantes, especialmente para a cv. Gaúcho, ainda é preciso estabelecer melhores condições para ultrapassar estas dificuldades.

Desta maneira, embora os resultados obtidos até agora possam ser considerados uma etapa significativa para o aperfeiçoamento da transformação

genética da cv. Gaúcho através do sistema *Agrobacterium*, novas estratégias devem ser adotadas, como aumentar a concentração de canamicina no meio de seleção, testar outros antibióticos como agentes seletivos e utilizar vetores contendo genes marcadores que permitam uma melhor análise do sistema de infecção das células.

REFERÊNCIAS

- AKASAKA-KENNEDY, Y.; TOMITA, K.O.; EZURA, H. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Science**, Ireland, v.166, p.763-769, 2004.
- ALTSCHUL, S., T.; MADDEN, A.; SCHAFFER, J.; ZHANG, Z. et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p.3389-3402, 1997.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v.19, p.11-15. 1987.
- DONG, J. Z.; YANG, M. Z.; JIA, S. R. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. **Biotechnology**, v.9, p.858–863, 1991.
- GALPERIN, M.; PATLIS, L.; OVADIA, A., et al. A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation. **Plant Breeding**, v.122, p.66-69, 2003.
- GUIS, M.; BODONDI, R.; BOUZAYEN, M.; et al. Ripening associated biochemical traits of Cantaloup Charantais melons. **Journal of American Society of Horticultural Sciences**, v.122, p.748-751, 1997.
- GUIS, M.; BEN AMOR, A.; LATCHÉ, J. C.; et al. A reliable system for the transformation of Cantaloupe Charentais melon (*Cucumis melo* L. var.

cantaloupensis) leading to a majority of diploid regenerated. **Science Horticulture**, v. 84, p.91-99, 2000.

LATCHÉ, A.; AYUB, R.; MARTINEZ, G. et al. Biosynthèse et mode d'action de l'hormone végétale ethylene. **Fruits**, v.50, p.379-396, 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiological Plant**, v.15, p.473-497, 1962.

NORA, F. R. Transformacao genética do meloeiro (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho. Pelotas, 2000. 63-85p. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial** – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

PETERS, J.A.; ROMBALDI, C.; SILVA, J.A. et al. Transformacao genética do meloeiro e da macieira. **Biotecnologia- Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p.10-13, 1999.

ROMBALDI, C.V.; CHAVES, A.L.S.; SILVA, J.A., et al. Expressão da enzima ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cultivar Kadá. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, p.5-10, 1996.

SILVA, J.A. Caracterização bioquímico-molecular e inibição da síntese de ACC oxidase em frutos climatérios. Pelotas, 2000. 83p. **Tese de Doutorado em Biotecnologia** – Centro de Biotecnologia, Universidade federal de Pelotas.

THOMPSON, J. D. T. J.; GIBSON, F.; PLEWNIAK, F.; et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.

VALLÉS, M. P., LASA, J. M. Agrobacterium-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo oro). **Plant cell Reports**, v.13, p.145-148, 1994.

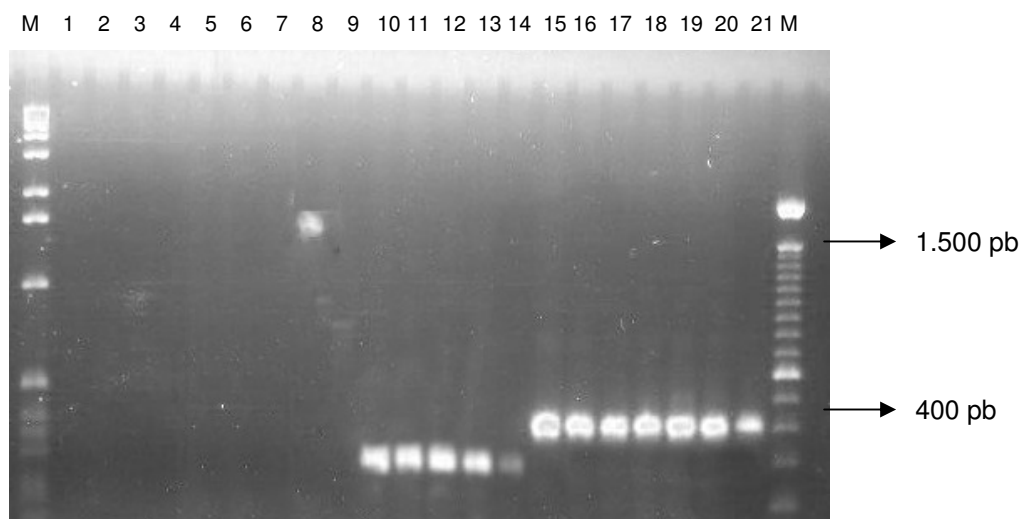
5- Conclusões Gerais

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que, para o meloeiro, cv. Gaúcho:

- O tamanho do explante afeta a taxa de regeneração;
- A presença e/ou ausência de luz, nas condições estudadas, afeta o processo regenerativo;
- Quanto menor o período de germinação e menor concentração de BAP no meio de regeneração, maior é a taxa de explantes regenerantes de melão;
- O antibiótico canamicina na concentração de 75 mg L⁻¹ se mostrou eficiente para resistência dos cotilédones;
- O uso de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, não foi eficiente para a transformação genética do meloeiro nas condições utilizadas.

6 - APÊNDICE

Figura1- Análise molecular por PCR, do DNA de plantas transgênicas de melão (*Cucumis melo* L.), cv. Gaúcho.



Legenda

M - Marcador 1 Kb ladder

1- Controle(Mix)

2- Planta não transformada (primer PGA)

3-7 Plantas transformadas (primer PGA)

8 – Plasmídeo (primer PGA)

9 – Planta não transformada –controle (primer actina)

10-14 Plantas transformadas -controle (primer Actina)

15- Plasmídeo (primer ACC)

16-21 Plantas transformadas -controle (primer ACC oxidase)

M- Marcador 100 Pb