

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE MELOEIRO

Ester Ujiie Nogueira, Pablo Diego Silva Cabral, Frederico De Pina Matta, Andreia Barcelos Passos Lima

Centro de Ciências Agrárias UFES/ Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário, s/nº - Cx Postal 16, Guararema - 29500-000 Alegre-ES, ester.nog@gmail.com

Resumo: O Melão é uma cucurbitácea de grande importância econômica nas regiões tropicais. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES, no ano de 2008, tendo como objetivo a otimização de protocolos para a germinação *in vitro* de cinco cultivares de *Cucumis melo* com a finalidade de obter explantes cotiledonares para regeneração *in vitro*. Sementes maduras de melão foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2% e tween 20 e inoculadas nos meios de cultura MS e MS ½. Após 21 dias, foram avaliados os parâmetros: comprimento e peso dos cotilédones (CC e PC), da parte aérea (CPA e PPA), de raiz (CR e PR) e de planta regenerada (CP e PP). O melhor meio de cultura para germinação das cultivares Caipira e Pele de Sapo foi o meio MS e para as cultivares Orange, Gália e Charentais foi o meio MS ½.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L.; Germinação *in vitro*; Meios de cultura;
Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família Cucurbitaceae e tem importante papel econômico e social, principalmente nas regiões tropicais. É também uma hortaliça muito consumida e de grande popularidade no mundo. No Brasil, são cultivadas duas variedades botânicas *Cucumis melo* var. *inodorus* Naud e *Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud (CRISÓSTOMO et al., 2002). Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, em 2005 o Brasil produziu 190 mil toneladas de melão (FAO, 2006), apresentando fortes tendências de crescimento em função do consumo interno e das exportações. Entretanto, para que essa tendência seja contínua é preciso obter frutos de qualidade e com maior tempo de prateleira. Ayub e Pech (1997) relatam que os últimos avanços no campo da engenharia genética têm possibilitado a obtenção de plantas geneticamente modificadas, apresentando uma maturação retardada dos frutos após a colheita. Portanto, através da transformação genética, várias características desejáveis podem ser acrescentadas a genótipos já tradicionalmente cultivados e adaptados. Para o meloeiro estudos revelam uma grande variação nas respostas morfogênicas *in vitro*, devido à influência de fatores genéticos, fisiológicos e de condições do meio de cultura, embora a relativa importância de cada fator não seja, ainda, plenamente conhecida (MOLINA E NUEZ, 1995).

Assim, o estabelecimento de protocolos eficientes para regeneração *in vitro* é necessário para a aplicação das modernas técnicas biotecnológicas (VIEIRA, et al, 2007). Sabendo que um dos fatores que podem afetar a

regeneração *in vitro* de melão é o genótipo, o presente trabalho teve como objetivo otimizar um protocolo para a germinação *in vitro* de cinco cultivares de *Cucumis melo* com a finalidade de obter explantes cotiledonares para regeneração *in vitro*.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES.

Foram utilizadas sementes maduras de *Cucumis melo* var. *inodorus* Naud tipos comerciais Pele de sapo e Orange e *Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud tipos comerciais Gália, Charentais e Caipira.

Após serem separadas do seu tegumento, as sementes foram desinfestadas através da imersão por 10 minutos solução de hipoclorito de sódio 2% e tween 20, seguida de três lavagens em água destilada estéril e colocadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MS½ (metade da concentração dos sais e vitaminas) sob condições assépticas. Os meios foram autoclavados durante 20 minutos a 121°C.

Esse experimento foi instalado no delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 5) com dois meios de cultura e cinco cultivares, utilizando 3 repetições por tratamento, considerando como repetição um frasco contendo 3 sementes de mesmo tipo comercial. Os frascos foram mantidos em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2° C.

Após 21 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento e peso de cotilédone (CC e PC), de parte aérea (CPA e PPA), de raiz (CR e PR) e de planta regenerada (CP e PP) nos dois meios de cultura MS e MS/2.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software GENES (CRUZ, 2001).

Tabela 1: Valores médios de CC, PC, CPA, PPA, CR, PR, CP e PP das cinco cultivares de meloeiro nos meios de cultura MS e MS ½.

Fonte de variação	PC	CC	PPA	CPA	PR	CR	PP	CP
Cultivares	5,26*	7,07*	1,88 ^{NS}	11,91*	10,53*	12,08*	10,72*	28,84*
Meios	0,18 ^{NS}	0,06 ^{NS}	2,37 ^{NS}	1,19 ^{NS}	1,35 ^{NS}	4,01 ^{NS}	2,07 ^{NS}	1,71 ^{NS}
Interação	5,74*	1,80 ^{NS}	2,85*	1,73 ^{NS}	4,59*	0,87 ^{NS}	5,61*	0,53 ^{NS}
CV%	14,75	9,20	15,59	13,89	17,19	12,96	12,38	9,00

^{NS} Não significativo; * Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A Tabela 2 mostra que para as cultivares Caipira e Pele de Sapo, o valor de PC diferiu nos meios de cultura MS e MS ½, mostrando que o melhor resultado de PC foi obtido em meio de cultura MS.

Tabela 2: Valores médios de PC e CC das cinco cultivares de melão nos meios de cultura MS e MS ½.

Cultivares	PC		CC
	MS	MS/2	Média
Caipira	0.66 ¹ A a	0.46 B ab	2.75 a
Orange	0.25 A c	0.32 A bc	1.99 b
Pele de Sapo	0.59 A ab	0.48 B ab	2.28 ab
Gália	0.24 A c	0.29 A c	2.04 b
Charentais	0.49 A b	0.57 A a	2.19 b

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada variável, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade.

Para as demais cultivares o valor de PC não diferiu significativamente nos dois meios de cultura (Tabela 2), optando-se pela utilização de meio MS ½ que proporciona economia de sais utilizados no preparo do meio de cultura. Comparando as cultivares no meio MS, Caipira e Pele de Sapo forneceram o maior PC e Orange e Gália obtiveram os menores valores de PC. No meio MS ½, os melhores resultados foram obtidos para as cultivares Charentais, Pele de Sapo e Caipira, sendo que a cultivar Gália apresentou o menor valor de PC quando comparada com as demais cultivares nos dois meios de cultura.

Para o parâmetro CC, o estudo isolado dos fatores mostrou diferença significativa para o fator cultivares (Tabela 1), tornando-se necessário o estudo das suas médias. Como observado na Tabela 2, a cultivar Caipira apresentou a maior

Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os valores dos Quadrados Médios dos parâmetros CC, PC, CPA, PPA, CR, PR, CP e PP das cinco cultivares de meloeiro nos dois meios de cultura.

A interação entre as cultivares e os meios de cultura foi significativa apenas para PC, PPA, PR e PP.

média de CC, enquanto as demais cultivares não diferiram estatisticamente entre si.

Analisando a variável PPA, houve diferença significativa entre os meios de cultura para as cultivares Caipira e Charentais (Tabela 3). Os maiores valores de PPA foram obtidos no meio MS. Já para as outras cultivares, o valor de PPA não diferiu significativamente nos dois meios de cultura, optando-se pela utilização de meio MS ½. Comparando as cultivares germinadas em meio MS, Gália obteve o menor valor de PPA. Em meio MS ½ não houve diferença significativa entre as cinco cultivares analisadas.

Tabela 3: Valores médios de PPA e CPA das cinco cultivares de melão nos meios de cultura MS e MS ½.

Cultivares	PPA		CPA
	MS	MS/2	Média
Caipira	1.36 ¹ A a	1.01 B a	11.23 b
Orange	1.12 A a	1.05 A a	11.20 b
Pele de Sapo	1.07 A ab	1.02 A a	11.37 b
Gália	0.72 A b	0.83 A a	12.70 b
Charentais	1.28 A a	0.86 B a	19.04 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada variável, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade.

Considerando o parâmetro CPA, o fator cultivares apresentou diferença significativa (Tabela 1), fazendo-se necessário o estudo de suas médias. Dentre as cinco cultivares a Charentais apresentou a maior média de CPA (Tabela 3), enquanto as outras não diferiram estatisticamente entre si.

Podemos observar na Tabela 4 que para a variável PR houve diferença significativa na interação entre os meios MS e MS ½ e as cultivares Caipira e Pele de Sapo, mostrando que o maior valor de PR foi alcançado no meio MS. Para as outras variedades não houve diferença significativa, optando-se pela utilização do meio MS ½. Comparando as cinco cultivares no meio MS, os maiores valores de PR foram observados para as cultivares Pele de Sapo, Caipira e Orange, e em meio MS ½ para as cultivares Orange, Charentais e Pele de Sapo. A variedade Gália mostrou um menor valor de PR nos dois meios de cultura.

Tabela 4: Valores médios de PR e CR das cinco cultivares de melão nos meios de cultura MS e MS ½.

Cultivares	PR		CR
	MS	MS/2	Média
Caipira	3.75 ¹ A ab	2.42 B b	21.85 b
Orange	3.35 A ab	3.70 A a	30.36 a
Pele de Sapo	4.53 A a	3.13 Bab	22.73 b
Gália	0.33 A c	0.47 A c	19.52 b
Charentais	3.24 A b	3.28 Aab	24.65 ab

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada variável, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade.

Considerando a variável CR, para o fator cultivares, observamos diferença significativa (Tabela 1), portanto, faz-se necessário o estudo da média das mesmas. A cultivar Orange apresentou a maior média de CR, não diferindo estatisticamente da cultivar Charentais (Tabela 4).

Avaliando os valores de PP, houve diferença significativa entre os meios de cultura apenas para as cultivares Caipira e Pele de Sapo (Tabela 5), indicando que o melhor meio para a obtenção de maior valor de PP seria o MS. Gália foi a cultivar que apresentou menor valor de PP em ambos os meios de cultura, sendo que as demais cultivares não diferiram estatisticamente entre si. Em meio MS ½ os maiores valores de PP foram observados nas cultivares Orange, seguidas por Pele de Sapo e Charentais (Tabela 5). O menor valor de PP foi observado na cultivar Gália.

Considerando a variável CP, o fator cultivares foi significativo (Tabela 1). Na Tabela 5 observamos que a cultivar Charentais apresentou a maior média de CP, não diferindo estatisticamente da cultivar Orange. As cultivares Caipira e Gália apresentaram as menores médias de CP.

Tabela 5: Valores médios de PP e CP das cinco cultivares de melão nos meios de cultura MS e MS ½.

Cultivares	PP		CP
	MS	MS/2	Média
Caipira	5.11 ¹ A a	3.43 B b	33.08 c
Orange	4.48 A a	4.75 A a	41.56 ab
Pele de Sapo	5.61 A a	4.16 Bab	34.11 bc
Gália	1.06 A b	1.31 A c	32.22 c
Charentais	4.53 A a	4.15 Aab	43.70 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada variável, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade.

Discussão

Diversos autores (PEREIRA et al., 1999; VIEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2007; DODE et al., 2001) têm utilizado o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) como meio de germinação para obtenção de explantes cotiledonares de cultivares de *Cucumis melo*. Neste trabalho, sugere-se que as sementes das cultivares Orange, Gália e Charentais sejam germinadas em meio MS ½ para obtenção de explantes cotiledonares, pois as médias de peso e comprimento de cotilédones obtidas são estatisticamente iguais nos meios MS e MS ½. A utilização do meio MS ½ proporciona, também, economia de sais e vitaminas utilizados no seu preparo, porém para as cultivares Caipira e Pele de Sapo sugere-se que as sementes sejam germinadas em meio MS, já que as médias de peso e comprimento de cotilédones foram maiores neste meio quando comparadas ao meio MS ½, fornecendo melhores resultados para os cotilédones obtidos.

Conclusão

Com base nos resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que:

- O melhor meio de cultura para a germinação *in vitro* das cultivares *Cucumis melo* L. Caipira e Pele de Sapo é o meio MS.
- O meio de cultura mais indicado para a germinação *in vitro* das cultivares *Cucumis melo* L. Orange, Gália e Charentais é o meio MS ½.

Referências

- AYUB, R. A.; PECH, J. C. Uso da estratégia do ARN antisense no desenvolvimento de uma variedade de melão transgênica a maturação retardada. In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal, 2. 1997. Gramado. **Anais...** Gramado: REDBIO, 1997. p.28.

- CRISÓSTOMO, L. A.; SANTOS, A. A. dos; VAN RAIJ B.; FARIA C. M. B. de; SILVA, D. J. da; FERNANDES, F. A. M.; SANTOS, F. J. de S.; CRISÓSTOMO, J. R. ; FREITAS, J. de A. D. de; HOLANDA, J. S. de; CARDOSO, J. W.; COSTA, N. D. Adubação, Irrigação, Híbridos e Práticas Culturais para o Meloeiro no Nordeste. Circular técnica 14. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA. Fortaleza, CE. Dezembro, 2002. ISSN 1676-6601.

- CRUZ, C.D. GENES – versão Windows. 2001. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p

- DODE, L. B. ; NORA, F. R. ; COUTINHO, C. ; SEIXAS, F. K. ; Costa, T. S. ; SCHUCH, M. W. ; SILVA, J. A. ; ROMBALDI, C. V. ; PETERS, J. A. Transformação de cotilédones de melão cv. Gaúcho através de aceleração de partículas. In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal. 2001, Goiânia. **Anais...Goiânia: REDBIO, 2001.** p. 02-045-02-046.

- FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. Statistical: database. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org>>. Acesso em: 3 nov. 2006.

- JEFFREY, C. A review of curcubitaceae. Bot. J. Linn. Soc., 81, p. 233-247, 1980.

- JEFFREY, C. Notes on curcubitaceae, including a proposed new classification of the family. Ken Bulletin, 15, n.3, p. 337-371, 1962.

- MOLINA, R.V.; NUEZ, F. Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. Plant Cell Reports, New York, v.15, p.129-132, 1995.

- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, v. 15, p. 473-497, 1962.

- 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' **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.23, n.3, p.540-546., jul./set., 1999.

- SILVA, F. S. P.; PINHO, D. S.; REY, M.; VIEIRA, A.; PETERS, J. A.. Regeneração de cotilédones de melão (*Cucumis melo*), cv. Gaúcho, sob diferentes condições de luminosidade. **IX Encontro de Pós Graduação.** Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; UFPel, nov de 2007.

- SOUZA, F. V. D.; GARCIA-SOGO, B., SOUZA, A. da S., SAN-JUÁN, A. P.; MORENO, V. Morphogenetic Response of Cotyledon and Leaf Explants of Melon (*Cucumis melo* L.) cv. Amarillo Oro. Brazilian archives of Biology and Technology an International Journal. Vol. 49, n. 1 : pp. 21-27, January 2006. ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.

- VIEIRA, A.; PINHO, D. S.; REY, M.; SILVA, F. S. P.; PETERS, J. A. Relação entre tamanho e regeneração de melão (*Cucumis melo*), cv. Gaúcho, sob diferentes cores cotiledonares. **IX Encontro de Pós Graduação.** Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; UFPel, nov de 2007.