

# ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS DE MESOFILO DE *Passiflora suberosa* L.: INFLUÊNCIA DA IDADE DAS PLANTAS MATRIZES <sup>1</sup>

Wagner Campos Otoni<sup>2</sup>  
Vicente Wagner Dias Casali<sup>3</sup>  
John Brian Power<sup>4</sup>  
Michael Raymond Davey<sup>4</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

Todas as células vegetais, teoricamente, são totipotentes, com capacidade intrínseca de regenerar uma planta completa. Na prática, a expressão da totipotência ou competência morfogênica varia com o estágio fisiológico das células. Nesse aspecto, os protoplastos, que são células vegetais em que se procedeu a remoção das paredes celulares, são teoricamente totipotentes, porém as dificuldades na regeneração de plantas são esperadas.

Segundo ROEST e GLISSEN (19, 20), o número total de espécies que foram regeneradas via protoplastos acha-se em torno de 320, representando 146 gêneros e 49 famílias. A família *Solanaceae* é formada pelo maior número de espécies desse total, 76, representando 13 gêneros diferentes.

Dentre as fruteiras de clima tropical ou subtropical, a regeneração de plantas a partir de protoplastos foi obtida apenas em *Carica papaya* x *C.*

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 03.07.1995.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 - Viçosa, MG.

<sup>3</sup> Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa.

<sup>4</sup> Plant Genetic Manipulation Group, Life Science Department, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD, UK.

*cauliflora* (1), *Passiflora cincinnata* e *P. amethystina* (2), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (2, 5), *Musa* spp. (13), *Diospyrus kaki* (23), *Actinidia chinensis* (24) e *Citrus* (6, 11, 25).

A obtenção de protoplastos viáveis a partir de mesofilo tem sido relatada como dependente da idade dos tecidos em várias espécies, dentre elas *Medicago* (8), *Pseudotsuga* (9), *Pinus* (14), *Eucalyptus* (15), *Pisum* (26) e *Malus* (27).

*Passiflora suberosa* é uma das espécies de maior variabilidade no gênero, apresentando variação intra-específica no conjunto cromossômico diplóide, a saber,  $2n=12$ , 24 e 36 cromossomos. O único relato envolvendo *P. suberosa* até o presente diz respeito à indução do florescimento *in vitro*, a partir do cultivo de discos foliares e segmentos internodais (22). Ademais, essa espécie tem sido apontada como fonte de resistência ao vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro.

Com base nos recentes relatos da regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de mesofilos de maracujazeiro (2, 5), o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da idade das plantas-fonte de explantes no isolamento de protoplastos de mesofilo de *Passiflora suberosa* L.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do Material Vegetal

Sementes de *P. suberosa* foram obtidas do Centro de Horticultura da Estação Experimental de Redlands (QDPI, Queensland, Australia). A germinação deu-se mediante a utilização de substrato contendo a mistura na proporção de 1:1 dos compostos Levington M3 (Fisons, Ipswich, UK) e John Innes nº 3 (John Bente, Barrow-on-Humber, UK), em bandejas plásticas de propagação "Vac-trays" (H. Smith Plastics Ltd., Essex, UK), de 25 compartimentos, sendo semeadas de duas a três sementes por compartimento. As bandejas foram colocadas no interior de propagadores plásticos, sendo esses mantidos sob intensidade luminosa de  $5,0 \text{ W m}^{-2}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 15 a 20 dias. Decorrido esse período, foram transferidas para casa de vegetação, sem suplementação artificial de luz, sendo as aberturas de ventilação dos propagadores gradativamente abertas até a retirada total da cobertura, ao fim da terceira semana, visando proporcionar adequada aclimação das plântulas à nova condição de ambiente.

A irrigação foi realizada diariamente, procurando-se molhar apenas o substrato, para diminuir o grau de contaminação da parte aérea. O controle de pragas, especialmente afídeos e mosca-branca, foi realizado pela

aplicação mensal de Lindane HCH (Murphy Chemicals Ltd., St. Albans, UK). A adubação constou da aplicação quinzenal de formulação comercial solúvel de macro e micronutrientes (Bentleys Liquid Growmore, Barrow-on-Humber, UK).

## 2.2. Isolamento de Protoplastos

Folhas novas, recém-expandidas, de *P. suberosa*, obtidas de plantas com 30 a 90 dias de idade, foram desinfestadas pela imersão, por 10 minutos, em solução de Domestos (Lever Bros, Kingston-upon-Thames, UK), a 5% (v/v), seguida de quatro lavagens com água esterilizada.

Após o tratamento de desinfestação, as margens, bem como as nervuras centrais das folhas, foram removidas de forma que as lâminas foliares remanescentes fossem seccionadas, transversalmente, em tiras de 1 a 2 mm, que, imediatamente, foram transferidas para placas de Petri (Sterilin, Hownslow, UK) de 90 mm de diâmetro, contendo 15 ml de meio CPW 13M, composto dos sais do meio CPW (16) e manitol a 13% (p/v).

Os tecidos foram mantidos em pré-plasmólise, durante 60 min, e, em seguida, descartado o meio CPW 13M, sendo então adicionados 15 ml de mistura enzimática. Foi utilizada a mistura enzimática com a seguinte composição: Cellulase R-10 (Yakult Honsha Co. R-10 Ltd., Japan) a 1,0% (p/v); Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co. Ltd., Japan) a 0,2% (p/v); Driselase (Kyowa Hakko Kogyo Co., Japan) a 0,1% (p/v); 5,0 mM de tampão MES (Sigma Chemical Co., USA); Cefotaxima (Roussel Lab., Uxbridge, UK) a 250 mg l<sup>-1</sup>; e PVP-10 (Sigma Chemical Co., USA) a 1% (p/v). A mistura enzimática foi preparada pela diluição com o meio CPW 13, sendo o pH corrigido para 5,6. A mistura enzimática foi, posteriormente, filtro-esterilizada e alíquotas de 15 ml foram armazenadas em "freezer" a -20°C.

A digestão enzimática deu-se pela incubação dos tecidos durante 12 a 14 horas, no escuro, sob agitação orbital de 40 r.p.m. e à temperatura de 26 ± 2°C. Após a fase de incubação, os tecidos em suspensão foram passados em peneira plástica e estéril, com malha de náilon de 64 µm, sendo o filtrado coletado, por pipetagem com pipetas Pasteur, e transferido para tubos de centrífuga de 16 ml de capacidade. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 100 x g, durante 5 min, por três vezes consecutivas, sendo o sobrenadante descartado após cada centrifugação e o precipitado ressuspenso em 15 ml de meio CPW 13M. Após a terceira etapa de centrifugação, avaliaram-se a viabilidade e o rendimento dos protoplastos isolados. A viabilidade dos protoplastos foi determinada, utilizando-se solução-estoque de FDA (Sigma Chemical Co., USA) de 5,0 mg ml<sup>-1</sup>, em acetona, segundo LARKIN (10). Uma alíquota de 50 µl da solução-

estoque foi adicionada a 10 ml de meio CPW 13M e, posteriormente, a solução diluída de FDA e uma alíquota da suspensão de protoplastos purificados foram misturadas na proporção de 1:1. Após 10 minutos de incubação, os protoplastos foram examinados sob iluminação ultravioleta em microscópio invertido Nikon-Diaphot TMD, tendo sido considerados para efeito de contagem, no mínimo, 200 protoplastos. Na determinação do rendimento dos protoplastos foi utilizado um hematocitômetro Fuchs-Rosenthal-B.S. 74B (Weber Scientific Int. Ltd., Sussex, UK).

### 2.3. Cultivo de Protoplastos

A densidade de plaqueamento de protoplastos utilizada foi de  $1,5 \times 10^5$  protoplastos  $\text{ml}^{-1}$ , em meio KM8p (8) suplementado de  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D,  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  de zeatina e  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA. O método de cultivo empregado foi gotas de agarose SeaPlaque (FMC, Rockland, USA) a 0,6% (p/v), sendo os protoplastos cultivados em placas de Petri (Sterilin, Howslow, UK) de 55 mm, em ausência de luz, e à temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 28 a 30 dias, até que as microcolônias atingissem a fase de calos de 1 a 2 mm de diâmetro. Foi adotada a redução da pressão osmótica do meio, mediante a substituição, a intervalos de cinco dias, do meio KM8p pelo meio KM8 (7), a razões de volumes KM8p:KM8 (ml) de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1, segundo recomendações de DORNELAS e VIEIRA (2), d'UTRA VAZ *et alii.* (5) e OTONI (18).

A eficiência inicial de plaqueamento de protoplastos (EIP) foi determinada pela contagem, aos sete dias de cultivo, do número de protoplastos que mostraram pelo menos uma primeira divisão mitótica, em relação aos protoplastos totais observados no campo considerado. A eficiência final de plaqueamento (EFP), por sua vez, foi determinada pela contagem do número de calos (1 a 2 mm de diâmetro) recuperados ao final de 28 a 30 dias de cultivo, em relação à população de protoplastos originalmente plaqueada.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Protoplastos de *P. suberosa* foram isolados em períodos diferentes, a partir de plantas germinadas na mesma época e mantidas em casa de vegetação. Observou-se que, em plantas com 90 dias de idade, o rendimento e a viabilidade dos protoplastos foram drasticamente reduzidos (Quadro 1). Foi observado que o estágio de desenvolvimento das plantas-fonte de tecidos foi decisivo no sucesso dos isolamentos realizados, uma vez que, emitidas as gavinhas, o rendimento e a qualidade dos protoplastos decresceram drasticamente, resultando na obtenção de baixas eficiências de

QUADRO 1 - Rendimento e viabilidade de protoplastos de mesofilo de *P. suberosa* isolados em diferentes épocas

	Idade das plantas-fonte de mesofilo (dias)		
	30	60	90
Rendimento <sup>1</sup>	12,3 ± 0,34	8,1 ± 0,15	3,7 ± 0,84
Viabilidade(%)	91,3 ± 4,15	79,8 ± 5,45	59,1 ± 8,65

<sup>1</sup>. x 10<sup>6</sup> protoplastos por grama de matéria fresca.

plaqueamento. As eficiências inicial (EIP) e final (EFP) de plaqueamento para os protoplastos obtidos de plantas de 30 e 60 dias foram de 45,6 e 32,5% e 0,345 e 0,235%, respectivamente. No entanto, os protoplastos obtidos de folhas de plantas com 90 dias de idade foram incapazes de se dividir em cultivo.

O estágio fisiológico dos tecidos utilizados como fonte de protoplastos foi considerado fator crítico no sucesso do isolamento e cultivo de protoplastos de várias espécies (15, 17, 19, 21). Nesse particular, na transição de fases, da juvenil para a adulta, as plantas lenhosas passam por mudanças anatômicas, morfológicas e fisiológicas que influenciam seus hábitos de crescimento, vigor, filotaxia, forma e estrutura das folhas, anatomia do caule, capacidade de enraizar e eficiência assimilatória (28).

Nos maracujazeiros roxo (*Passiflora edulis* Sims) e amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener), a transição de fases é caracterizada pela modificação na morfologia das folhas, de monolobada para trilobada. Em espécies como *P. suberosa* não se observa modificação na morfologia foliar. A emissão das gavinhas nessas espécies é o primeiro indicativo do término da fase juvenil. Nas circunstâncias em que o experimento foi conduzido, foi observado que, em condições de casa de vegetação, a emissão de gavinhas em *P. suberosa* deu-se entre os 75 e 85 dias.

A reduzida eficiência da mistura enzimática no isolamento de protoplastos de *P. suberosa* pode ser atribuída à transição de fases, em particular pelo aumento na complexidade da estrutura da parede celular pela ocorrência de maior espessamento das paredes celulósicas em decorrência da deposição secundária de substâncias, diminuindo a eficiência de atuação da mistura enzimática utilizada.

Os resultados obtidos acham-se em concordância com os descritos por d'UTRA VAZ (4), d'UTRA VAZ *et alii* (5) e MANDERS (12). Os autores observaram que a queda no rendimento foi também verificada em protoplastos isolados de mesofilos de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, após a emissão de gavinhas. DORNELAS e VIEIRA (2) obtiveram

elevados rendimentos de protoplastos a partir de cotilédones de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina* e *P. cincinnata*, após 15 a 20 dias da germinação *in vitro*. Na cultura *in vitro* de segmentos nodais adultos do híbrido F1 (*P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. edulis*), clone E-23, observou-se que, para o crescimento do material adulto, foi requerida uma modificação nas condições de meio, em especial no tipo e na concentração dos reguladores de crescimento utilizados. Todavia, a propagação *in vitro* de material juvenil do clone E-23 e de outras espécies de *Passiflora* foi obtida com sucesso. Os ramos obtidos enraizaram com relativa facilidade, ao passo que aqueles provenientes de material adulto apresentaram baixa frequência de enraizamento (3).

A superioridade de tecidos juvenis como fonte de protoplastos para outras espécies foi confirmada por outros pesquisadores (15, 21). Burger e Banks (1979), citados por SAKURAI (21), isolaram protoplastos de folhas de plantas juvenis de *Citrus*; todavia, não obtiveram sucesso a partir de folhas de plantas adultas. Em *Eucalyptus grandis* (15), tecidos juvenis foram considerados bastante superiores como fonte de explantes no isolamento de protoplastos em comparação a tecidos adultos. Aumentos no rendimento da ordem de 71% foram verificados quando se utilizaram plântulas germinadas *in vitro*, de uma semana de idade, em comparação com aquelas de cinco semanas de idade.

Considerando-se a necessidade de estudos envolvendo o isolamento e a regeneração de plantas a partir de protoplastos de plantas adultas, sugere-se como investigações futuras, à semelhança dos experimentos realizados por PENCHEL (15), a propagação *in vitro* de material adulto de maracujazeiro, de forma a promover o rejuvenescimento do mesmo, visando ao estudo de fatores relacionados com o isolamento e cultivo de protoplastos.

#### 4. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da idade da planta no isolamento de protoplastos de mesofilo de *Passiflora suberosa* L. Os protoplastos foram obtidos de plantas crescidas em condições de casa de vegetação mediante a utilização de uma mistura enzimática constituída dos sais do meio CPW, manitol a 13% (p/v), Cellulase R-10 a 1,0% (p/v), Macerozyme R-10 a 0,2% (p/v), Driselase a 0,1% (p/v), 5,0 mM de tampão MES, Cefotaxima a 250 mg l<sup>-1</sup> e PVP-10 a 1% (p/v). A idade da planta teve influência marcante sobre o rendimento e a viabilidade dos protoplastos obtidos. Foi observado decréscimo significativo entre o rendimento e a viabilidade dos protoplastos com o aumento da idade das plantas doadoras de explantes.

## 5. SUMMARY

### (PROTOPLAST ISOLATION FROM LEAF MESOPHYLL OF *Passiflora suberosa* L. : INFLUENCE OF AGE OF DONOR PLANTS).

The aim of this work was to evaluate the influence of age of donor plants on the protoplast isolation of *Passiflora suberosa* L. Protoplasts were obtained from glasshouse-grown seedlings leaves using a pectocellulolytic enzyme mixture containing CPW salts, 13% (w/v) mannitol, 1% (w/v) Cellulase R-10, 0,2% (w/v) Macerozyme R-10, Driselase 0.1% (w/v), 5.0 mM MES, 250 mg l<sup>-1</sup> Cefotaxime and 1% (w/v) PVP-10. Age (30, 60 and 90 days after germination) of the plants, from which mesophyll protoplasts were isolated had a marked effect on protoplast yield and viability. A significant decrease in both was observed, with the increase of age.

## 6. LITERATURA CITADA

1. CHEN, M.H. & CHEN, C.C. Plant regeneration from *Carica* protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 11: 404-407, 1992.
2. DORNELAS, M. & VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. *Plant Cell Rep.*, 13: 103-106, 1993.
3. DREW, R.A. *In vitro* culture of adult and juvenile buds of *Passiflora* species. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 26: 23-27, 1991.
4. d'UTRA VAZ, F.B. *Somatic and sexual hybridization in tropical fruit crop species: passionfruit and tomato*. Nottingham, University of Nottingham, 1992. 175p. (Tese Ph.D.).
5. d'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. & POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Rep.*, 12: 220-225, 1993.
6. GMITTER JR., F.G.; GROSSER, J.W. & MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A. & LITZ, R.E. (eds.). *Biotechnology of perennial fruit crops*. Cambridge, University Press, 1992. p. 335-369.
7. KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126:105-110, 1975.
8. KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfafa. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96: 135-141, 1980.
9. KIRBY, E.G. & CHENG, T-Y. Colony formation from protoplasts derived from Douglas fir cotyledons. *Plant Sci. Lett.*, 14: 145-154, 1979.
10. LARKIN, P.J. Purification and viability determination of plant protoplasts. *Planta*, 128: 213-216, 1976.
11. LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASA, M. & KUNITAKE, H. Plant regeneration from protoplasts from embryogenic callus of satsuma. *HortScience*, 25: 970-972, 1990.
12. MANDERS, G. *Genetic manipulation of temperate and tropical woody species*.

- Nottingham, University of Nottingham, 1991. 189p. (Tese Ph.D.).
13. PANIS, B.; WAUWE, A.V. & SWENNEN, R. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep.*, 12:403-407, 1993.
  14. PATEL, K.R.; SHEKHAWAT, N.S.; BERLYN, G.P. & THORPE, T.A. Isolation and culture of protoplasts from cotyledons of *Pinus coulteri*. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 3: 85-90, 1984.
  15. PENCHEL, R. *Development of cell culture and protoplast systems of Eucalyptus grandis Hill ex-Maiden*. Rutgers, The State University of New Jersey, 1990. 395 p. (Tese Ph.D.).
  16. POWER, J.B.; DAVEY, M.R.; McLELLAN, M. & WILSON, D. *Laboratory manual: Plant tissue culture*. Nottingham, University of Nottingham, 1989. 138p.
  17. OCHATT, S.J. & POWER, J.B. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: FOWLER, M.W.; WARREN, G.S. & MOO-YOUNG, M. (eds.). *Plant biotechnology: comprehensive biotechnology*. Oxford, Pergamon Press, 1992. p. 100-127.
  18. OTONI, W.C. *Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de Passiflora*. Viçosa, UFV, 1995. 198p. (Tese D.S.).
  19. ROEST, S. & GILISSEN, L.J.W. Plant regeneration from protoplasts: a literature review. *Acta Bot. Neerl.*, 38: 1-23, 1989.
  20. ROEST, S. & GILISSEN, L.J.W. Regeneration from protoplasts - A supplementary literature review. *Acta Bot. Neerl.*, 42: 1-23, 1993.
  21. SAKURAI, M. *Enzyme and osmotic requirements for release of protoplasts from Citrus reticulata Blanco 'Cleopatra' mandarin and Severinia buxifolia Tenore cells of liquid suspension culture*. Riverside, University of California, 1983. 156p. (Tese Ph.D.).
  22. SCORZA, R. & JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105: 892-897, 1980.
  23. TAO, R.; TAMURA, M.; YONEMORI, K. & SUGIURA, A. Plant regeneration from callus protoplasts of adult Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Plant Sci.*, 79: 119-125, 1991.
  24. TSAI, C.K. Plant regeneration from leaf protoplast callus of *Actinidia chinensis* var. *chinensis*. *Plant Sci.*, 54:231-235, 1988.
  25. VARDI, A. & GALUN, E. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. *Sci. Hort.*, 37: 217-230, 1988.
  26. VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. Factors influencing the growth and division of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.*, 36:193-196, 1976.
  27. WALLIN, A. & WELANDER, M. Improved yield of apple leaf protoplasts from *in vitro* cultured shoots by using young leaves and adding L-methionine to the shoot medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 5:69-72, 1985.
  28. ZIMMERMAN, R. H. Juvenility and flowering of fruit trees. *Acta Hort.*, 34: 139-142, 1973.