

Eficiência de solução enzimática no isolamento de protoplastos de folhas de Pequizeiro cultivadas “*in vitro*”

¹Martinotto, Cristiano; ²Paiva, Renato; ³Marques Jr., Jessé; ⁴Castro, Evaristo Mauro de; ⁵Rodrigues, Marcelo; ⁶França, André Cabral;

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal (UFLA), Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, fone (35) 3829-1619, e-mail: cmartinotto@yahoo.com.br; ² Prof. Dr. DBI-UFLA e-mail: renpaiva@ufla.br; ³ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal (UFLA), e-mail: jesseagronomo@yahoo.com.br. ⁴ Professor Doutor DB_-UFLA, e-mail: emcastro@ufla; ⁵Bolsista de iniciação científica, e-mail: marcelo@cbiologicas.ufla.br; ⁶Doutorando em Fitotecnia, DAG(UFLA), e-mail: cabralfranca@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

O pequizeiro é uma espécie arbórea nativa dos Cerrados brasileiros pertencente à família Caryocaraceae (Araújo, 1995). É também conhecido, de acordo com a região de ocorrência, por pequi, piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerim, suari e piquiá. O nome pequi se origina da palavra tupi “pyqui”, em que Py significa casca e qui, espinho (Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, citado por Almeida & Silva, 1994).

O pequizeiro é considerado uma espécie de interesse econômico, principalmente devido ao uso de seus frutos na culinária, como fonte de vitaminas e na extração de óleos para a fabricação de cosméticos (Almeida & Silva, 1994). Na medicina popular, é utilizado para tratamento de problemas respiratórios, como afrodisíaco e suas folhas são adstringentes, além de estimular a produção da bÍlis (Almeida & Silva, 1994; Brandão et al., 2002). Apresenta ótica madeira, sendo sua casca utilizada em curtume e como corante natural (Brandão et al., 2002; Almeida & Silva, 1994; Almeida et al. 1998).

Sob condições adequadas de temperatura e umidade, a semente de pequi inicia a germinação a partir de um mês de plantio, podendo levar de 6 a 11 meses para concretizar o processo (Miranda, 1987). Dombroski (1997), comparando níveis de escarificação e efeito de GA₃, observou que a germinação ocorreu até 56 dias após a semeadura, indicando que a utilização de reguladores de crescimento pode ter efeito benéfico na germinação do pequizeiro.

O cultivo *in vitro* desta espécie apresenta-se como uma alternativa a sua propagação. Entre as técnicas de cultivo *in vitro* temos o cultivo de protoplastos, que consiste no cultivo de células desprovidas de parede celular. Esta técnica pode ser utilizada na transformação genética através de eletroporação ou micro-injeção, auxiliando programas de melhoramento. Os protoplastos ao serem cultivados em suspensão mantém a totipotencialidade, dividindo-se, formando colônias, calos e regenerando plantas por embriogênese ou organogênese (Barros & Carneiro, 1998).

O objetivo do trabalho foi a determinação da eficiência de isolamento de protoplastos de folhas de pequizeiro seguindo a metodologia desenvolvida por Ochatt *et al.* (1987).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se como explantes folhas de plântulas de pequizeiro cultivadas *in vitro*.

Aproximadamente 1 g de folhas (Fig. 1A) foram excisadas das plântulas e submetidas a cortes, com a finalidade de aumentar a área de contato do mesofilo com a solução enzimática. Efetuado os cortes, as folhas foram incubadas em 15 mL de solução CPW 13M (Frearson et al., 1973) pH 5,8, durante uma hora em placa de petri (15 x 58 mm) para plasmolisar as células (Fig. 1B). Para o isolamento de protoplastos, as folhas foram transferidas para 15 mL de

solução enzimática diluída em CPW 13M após o ajuste do pH 5,6. A composição utilizada nesta solução foi 1% de cellulase “onozuca” R-10 (Yakult Honsha), 0,2% de macerozyme R-10 (Yakult Honsha) e 0,1% da enzima driselase, sendo acrescentado 5mM de MES (Ochatt et al., 1987). Durante esta fase a placa foi coberta com papel alumínio para evitar a incidência de luz e possível degradação das enzimas e em agitação de 40 rpm à temperatura de 25°C. A eficiência do isolamento foi avaliada ao final de 7 horas através de purificação e contagem dos protoplastos.

Para a purificação, a suspensão obtida (protoplastos isolados, tecidos não digeridos e protoplastos danificados) foi filtrada, utilizando peneira de nylon 64µm e centrifugado a 700 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 15 mL de CPW 13 e repetida a operação por mais duas vezes. Após a última centrifugação o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de CPW 9M e transferido para novo tubo de centrífuga com 13 mL de CPW 13M 21S e, então, centrifugado (700 rpm; 10 minutos) para isolar os protoplastos através da formação de banda, por gradiente de densidade. O rendimento foi determinado utilizando-se câmara de Neubauer (Hausser Scientific, USA), sob microscópio ótico (Figura 1, E e F).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 2 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de isolamento.

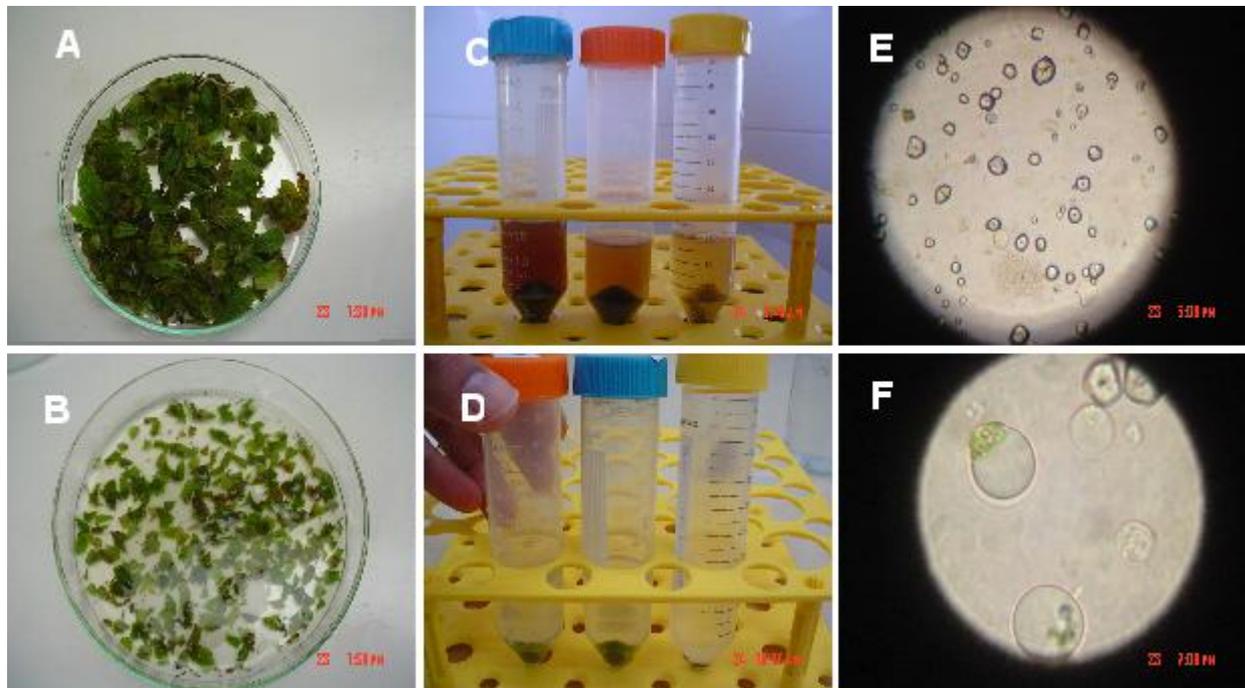


Figura 1. Detalhes do protocolo de isolamento: A)folhas de pequizeiro cultivado *in vitro*; B)pré-plasmólise das células em CPW 13M; C e D)processo de purificação de protoplastos (centrifugação, ressuspensão em CPW 13); E e F) Detalhe dos protoplastos isolados (100x e 400x respectivamente).

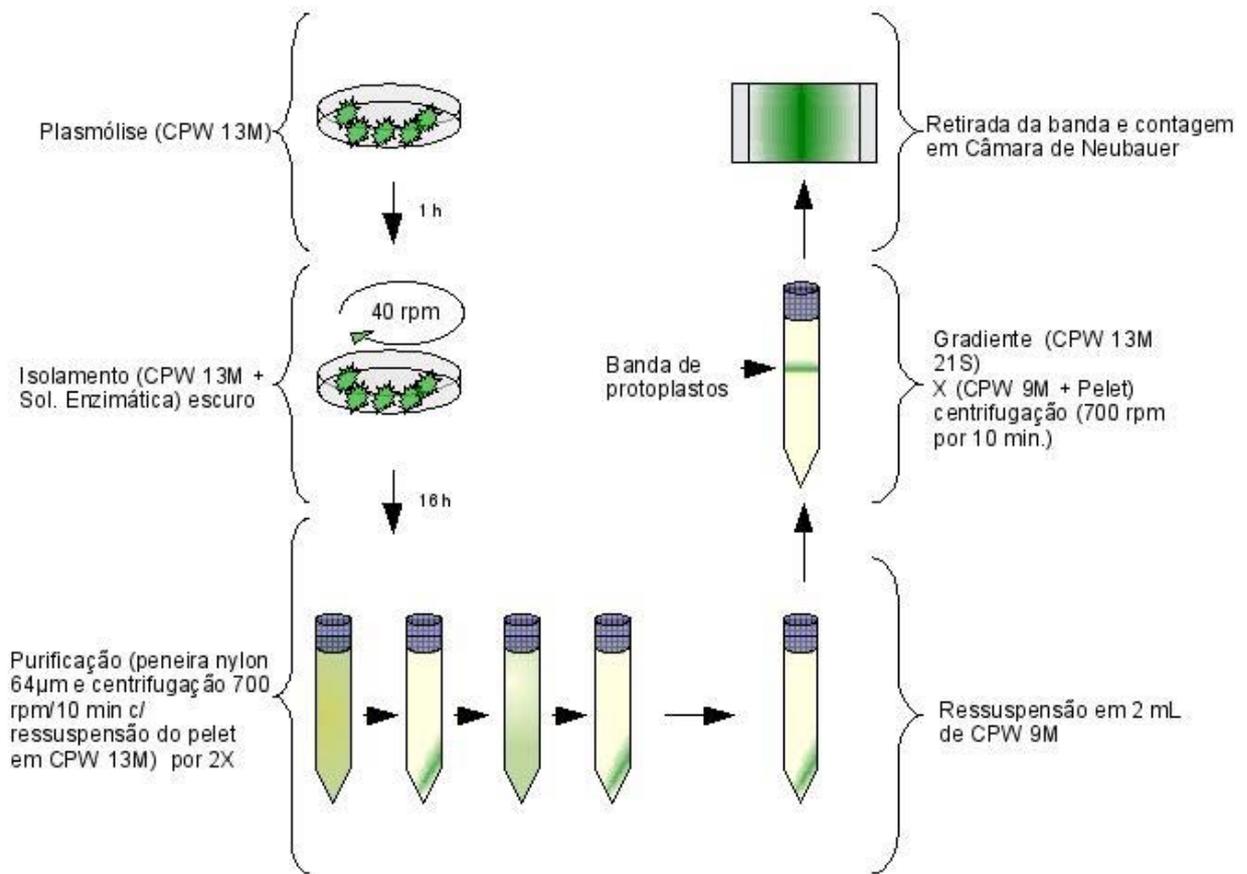


Figura 2 – Esquema do processo de isolamento segundo Ochat *et. al.* (1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A protocolo de isolamento foi eficiente no isolamento de protoplastos de folhas de pequizeiro cultivado *in vitro*. Nas primeiras horas observadas, houve intensa presença de células individualizadas observados na solução (Fig. 3A).

Na contagem em câmara de Neubauer foram obtidos por este protocolo $6,0 \times 10^5$ protoplastos/g de matéria fresca.

Ochat *et. al.* (1987) trabalhando com cerejeira (*Prunus avium x Pseudocerasus*), obteve um isolamento de $0,6 \times 10^7$ a $1,5 \times 10^8$ protoplastos/g de matéria fresca, bem maior do que o observado no presente trabalho.

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira *et. al.* (1995) trabalhando com os porta-enxertos de citrus limoeiro Cravo e tangerina Cleópatra, onde obteve $0,5 \times 10^6$ e $0,7 \times 10^6$ protoplastos por mL de suspensão. Neste trabalho os autores utilizaram 3 cm^3 de células cultivadas em suspensão celular.

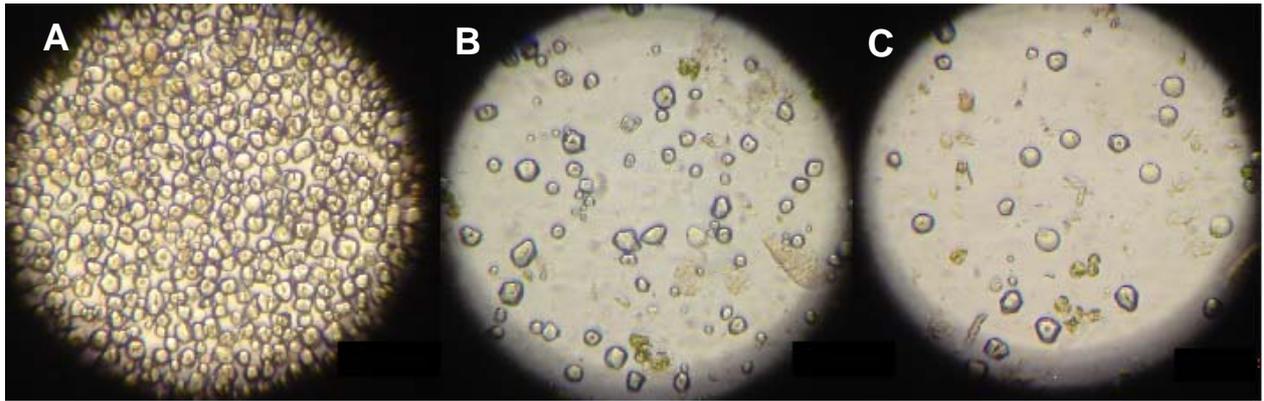


Figura 3. Marcha do isolamento. A) primeiras horas; B) antes da purificação; C) Contagem.

Costa et al. (2002), utilizando a mesma solução enzimática obteve um rendimento de $4,8 \times 10^6$ protoplastos/g de calos em laranja Pera cv. 158.

O presente trabalho é pioneiro, visto que, não se tem notícia de outros trabalhos de isolamento de protoplastos para o pequizeiro. Mais estudos estão sendo realizados para que seja consolidado um protocolo otimizado para a espécie, facilitando o melhoramento da espécie, bem como sua transformação.

CONCLUSÃO

A solução enzimática composta de 1% de cellulase “onozuka” R-10 (Yakult Honsha), 0,2% de macerozyme R-10 (Yakult Honsha), 0,1% da enzima driselase e 5mM de MES (Ochatt et al., 1987) com 7 horas de incubação foi eficiente no isolamento de protoplastos de folhas de pequizeiro cultivado *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, L. M. G. & CARNEIRO, V. T. C. Eletroporação de protoplastos. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, p.37-47, 1998.

BENEDITO, V.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos de laranja-doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.1, p.33-38, 2000.

COSTA M^a. A. P. C.; FILHO, F. A. A. M. & MENDES, B. M. J. Isolamento e eficiência de plaqueamento de protoplastos de citros. **Rev. Bras. Frutic.** v.24n.2Jaboticabalago.2002

DA SILVA, A. L. C. Cultura de tecidos de plantas. Disponível em: <http://br.geocities.com/alccoelho/calogenese.html>. Acesso em: 02 abr. 2007.

FREARSON, E. M.; POWER, J. B & COCKING, E. C. The isolament, culture, and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, San Diego, v.33, p.130-137, 1973

LINS, S. R. O. & COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v 29, n. 3, Brasília, May/June, p. 332-335, 2004.

OCHATT, S.J.; COCKING, E.C.; POWER, J.B. Isolation, culture and plant regeneration of colt cherry (*Prunus avium x pseudocerasus*) protoplasts. **Plant Science**, Amsterdam, v.50,p.139-143, 1987.

OLIVEIRA, R.P. de et al . Isolation and growth of citrus rootstock protoplasts. **Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)**, Piracicaba, v. 52, n. 2, 1995. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161995000200007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 May 2007. Pré-publicação.

POULSEN, ONE. D.. *Etilingera* of Borneo. Natural history publications (Borneo) 263 p.. 2006.

ARAUJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, Bronx, v. 49, n. 1, p. 40-48, Jan./Mar. 1995.

ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. **Piqui e Buriti**: Importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38 p. (EMBRAPA-CPAC. Documentos, 54).

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528 p.

ALMEIDA, S. P. de. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico – química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de (Ed.). **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 248-285.

DOMBROSKI, J. L. D. **Estudos sobre a propagação do pequi (Caryocar brasiliense Camb.)**. 1997. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MIRANDA, J. de S.; SILVA, H.; MATOS, M. A. de O. Emergência e vigor de sementes de pequi submetidas a pré-tratamentos mecânicos e térmicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. p. 647-651.

PALAVRAS-CHAVES: *Caryocar brasiliense*; *Cariocaraceae*; cultivo *in vitro*; celulase; pectinase.

Apoio: CNPq