

# Protoplastos de células vegetais

Células vegetais desprovidas da parede celular

## Isolamento de protoplastos

---

### Fonte do explante

- Podem ser obtidos de uma série de órgãos (folha, fruto, caules e etc)
- Vegetais recalcitrantes (cereais e leguminosas): o utilização de suspensões celulares embriogênicas

### Desinfestação

### Degradação da parede vegetal

- Sistema específico para degradação da parede celular
- Principais fatores que interferem no processo de degradação da parede vegetal
  - Estado fisiológico das células
  - Pressão osmótica
  - Composição do meio de maceração
- Enzimas pectocelulolíticas
  - Celulase Onozuka R10
  - Pectinase Macerozima R10
  - Hemicelulase rhozyma
- A ação combinada de pectinase e celulase produz o melhor resultado

### Pressão osmótica

- O balanço entre soluções manitol, sorbitol, ou sacarose (0,3 à 0,8 M) possibilita a manutenção da pressão hidrostática da célula
- A pressão osmótica ótima varia com o tipo de tecido utilizado
- Alguns tecidos são ricos em metabólicos secundários e necessitam de um tempo de incubação em meio líquido antes da maceração

### **Purificação dos protoplastos**

Permite a obtenção de protoplastos livres de enzimas celulolíticas residuais ou liberadas pelas células e eventuais grupos de células não digeridas

- Filtragem (30 e 60 micrômetros)
- Centrifugação a baixa rotação (50 a 100g)

### **Teste de viabilidade**

Utilização de corantes

- Evans Blue e fenolftaleína coram protoplastos mortos
- Azul de metileno é reduzido por células vivas que se coram em amarelo

Eficiência de plaqueamento (número de células divididas/número de células em cultura)

### **Faixa do pH da solução enzimática**

### **Período de digestão**

Pode variar de 2 horas para protoplastos de placenta de *Lycopersicon esculentum* a 20 horas para pólen de *Ulmus americana*

### **Cultura de protoplastos**

- Após uma etapa *lag*, as células começam a se multiplicar formando colônias e parede
- As células podem regenerar em plantas pela via organogênica ou embriogênica
- Os protoplastos são cultivados em meio nutritivo contendo auxina e citocinina

## **Constituintes do meio de cultivo**

---

### **Nutrientes**

- Meio de cultivo contendo macro e microelementos, vitaminas do grupo B, mio-inositol e sacarose (MS, B5 e etc.)
- Nitrogênio possui importância na diferenciação e crescimento celular
- O cálcio é crítico devido a seu papel na estabilização da membrana
- Entre os açúcares testados, a melhor alternativa é a mistura sacarose/glicose

### **Reguladores de crescimento**

- Auxina estimula a divisão
- A citocinina é ~~essencial~~ necessária em alguns casos

### **Pressão osmótica**

#### **pH**

- O pH deve estar entre 5 e 5,5
- Em alguns caso é necessário a utilização de tampões para evitar a acidificação do meio

## **Condição de cultura**

---

### **Assepsia**

Caso seja observada contaminação do meio de cultura pode-se colocar antibióticos no meio

### **Luz**

- Até as primeiras divisões são cultivados no escuro
- Nas etapas posteriores é dependente da espécie

### **Temperatura**

As temperaturas variam de 20 a 30°C

### **Densidade celular**

Existe uma densidade ótima para cada espécie

- Altas densidades podem levar ao aumento de concentração de toxinas
- Baixas densidade resultam na não adaptação das células

### **Freqüência de subculturas**

- Evita o acúmulo de gomas e fenóis
- A primeira subcultura é feita após as primeiras divisões e as seguintes em intervalos de três semanas

### **Técnicas de cultura**

- Cultura em meio líquido
- Cultura em gotas
- Cultura em meio sólido

### **Tipos de mutantes obtidos**

**Mutantes bioquímicos** – resistentes a estreptomicina e auxotróficos para vários aminoácidos

**Tolerância a herbicida** – resistência a herbicidas

**Tolerância a metais** - alumínio

**Tolerância a sal** – Nível de  $K^+$  celular alto

**Melhoramento da qualidade nutritiva** – Aumento da síntese de metionina

### **Hibridação somática**

---

Fusão a nível de citoplasma ou núcleo de protoplasmas de espécies diferentes

Permite contornar as barreiras pré e pós – zigóticas de cruzamentos sexuais interespecíficos

Limitações:

- Incapacidade de regeneração
- Instabilidade genética
- Infertilidade do genótipo

### **Técnicas para obtenção de protoplastos**

#### **Tratamento com PEG**

Utilização do PEG (pontes moleculares) com altas concentrações salinas (neutralização da carga negativa da membrana)

#### **Eletrofusão**

Aplicação de uma corrente alternada de alta frequência transforma protoplastos em dipolos. Estes se comportam formando linhas.

Aplicação de pulsos curtos de corrente contínua leva a formação de poros na membrana e conseqüentemente fusão das células.

- Combinação de meio líquido e sólido

## Aplicações

### Obtenção de mutantes

---

A cultura de protoplastos apresenta uma série de vantagens para o melhoramento genético de plantas:

- Pouca variação somaclonal, quando isolados de células do mesófilo
- Grande número de células isoladas e homogêneas
- Possibilidade de seleção *in vitro*

Muitas características expressas *in vitro* podem não ser expressas nas plantas em campo e vice-versa

Pode-se diferenciar três esquemas de seleção *in vitro*:

- 1 – **Seleção progressiva**: Presença contínua e em baixa concentração do agente seletivo permite um acúmulo gradual de mutantes
- 2 – **Seleção direta ou positiva**: Presença do agente seletivo em concentrações que inibem o crescimento dos protoplastos
- 3 – **Seleção indireta ou negativa**: Ausência de um determinada substância necessária ao metabolismo (mutante auxotrófico). Utilização conjunta de agentes tóxicos à células que se replicam.

Regras gerais para seleção *in vitro*:

- Utilização de células haplóides aumenta a chance de isolar células mutantes
- O agente seletivo deve ser aplicado após as primeiras divisões porém antes da formação de colônias grandes.
- A densidade da cultura deve ser controlada

### **Híbridos de fusão e comportamento dos genomas**

- Método geralmente não funciona para espécies não relacionadas
- Plantas são inviáveis, apresentam anormalidades ou são estéreis
- **Cíbridos** – Núcleo de um planta, citoplasma proveniente de outra.
- Método mais utilizado na fusão de protoplastos