

Eficiência de soluções enzimáticas e do tempo de incubação na obtenção de protoplastos de bastão-do-imperador

Silva Júnior, Jessé Marques¹; Paiva, Renato²; ³Silva, Luciano Coutinho; Martinotto, Cristiano⁴; Castro, Evaristo Mauro².

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fisiologia Vegetal (UFLA) Bolsista CAPES, e-mail: jesseagronomo@yahoo.com.br; ² Professor Associado, Depto. de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal (UFLA), e-mail: renpaiva@ufla.br ³ Graduando em Agronomia (UFLA) bolsista de Iniciação Científica; ⁴Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fisiologia Vegetal (UFLA).

INTRODUÇÃO

A espécie *Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith, conhecida popularmente como bastão-do-imperador, foi descrita pela primeira vez em 1792 por Paul Dietrich Giseke. Havia contradição em relação, recebendo várias denominações: *Alpinia*, *Phaeomorpha*, *Nicolaia*, e *Elettaria*. Em 1980, Rosemary Margaret Smith engloba a espécie no gênero *Etiligera*. Poulsen (2006) identificou cerca de 70 espécies muitas ainda não descritas, que estão distribuídas desde a Índia até as Ilhas do Pacífico.

A produção de flores e plantas ornamentais no Nordeste concentra-se principalmente, nos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará e Alagoas, destacando o cultivo do bastão-do-imperador com destaque para a elevada geração de emprego por área cultivada, contribuindo para ocupação da mão-de-obra local e gerando renda.

Uma alternativa para a micropropagação de plantas elite é a utilização de sistemas celulares desprovidos de parede celular, ou protoplastos, que em condições bem estabelecidas de cultura de tecidos, mantém a totipotencialidade celular, reconstituindo suas paredes, dividindo-se, formando colônias, calos e regenerando plantas por embriogênese ou organogênese (Barros & Carneiro, 1998). A fusão de protoplastos é uma técnica eficiente que permite a obtenção de híbridos somáticos e cíbridos, auxiliando em programas de melhoramento genético de espécies ornamentais.

O objetivo deste trabalho foi a otimização de incubação e concentração de soluções enzimáticas na obtenção de protoplastos buscando auxiliar em hibridações futuras.

MATERIAL E MÉTODOS

Este 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 obtidas *in vitro*.

As folhas foram excisadas das plântulas e imediatamente submetidas a cortes paralelos a nervura central, desprezando-se a extremidade das folhas, com a finalidade de se obter apenas a região do mesófilo. Efetuados os cortes, as folhas cortadas foram incubadas em solução CPW 13M (Frearson et al., 1973) pH 5,8, durante uma hora, para plasmolisar as células. Para o isolamento de protoplastos, as folhas foram transferidas para 4 diferentes combinações enzimáticas diluídas em CPW 13M após o ajuste do pH 5,6: Solução "A" = 1% de celulase "onozuca" R-10 (Yakult Honsha), 0,2% de macerozyme R-10 (Yakult Honsha); Solução "B" = 3% celulase "onozuca" R-10, 1% de macerozyme R-10; Solução "C" = 2% celulase *Aspergillus niger* (Fluka) e 1% pectinase *Aspergillus niger* (Fluka); Solução "D" = 3% celulase *Aspergillus niger* e 1,5% pectinase *Aspergillus niger*. Em todas as soluções enzimáticas foram acrescentados 5mM de MES e apenas nas soluções "A" e "B" foram acrescentadas 0,1% e 1% da enzima driselase, respectivamente. Aproximadamente 1g de folha foi colocado por placa de isolamento (15 x 58 mm) juntamente com 15 mL das soluções enzimáticas na ausência de luz e em agitação de 40 rpm à temperatura de 25°C, e o isolamento de protoplastos foi monitorado a cada hora para verificar a eficiência de cada solução enzimática.

Após a fase de incubação, a suspensão obtida (protoplastos isolados e tecidos não digeridos) foi filtrada, utilizando peneira de nylon 64µm (Wilson Sieves, Nottingham, UK) e centrifugações a 700 rpm por 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em CPW 9M e

transferido para novo tubo de centrifuga, sendo o volume completado com CPW 21S e, então, centrifugado (700 rpm; 5 minutos). O rendimento foi determinado utilizando-se um hemacitômetro (Hausser Scientific, USA), sob microscópio ótico.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de isolamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seqüência utilizada no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador (Figura 1).

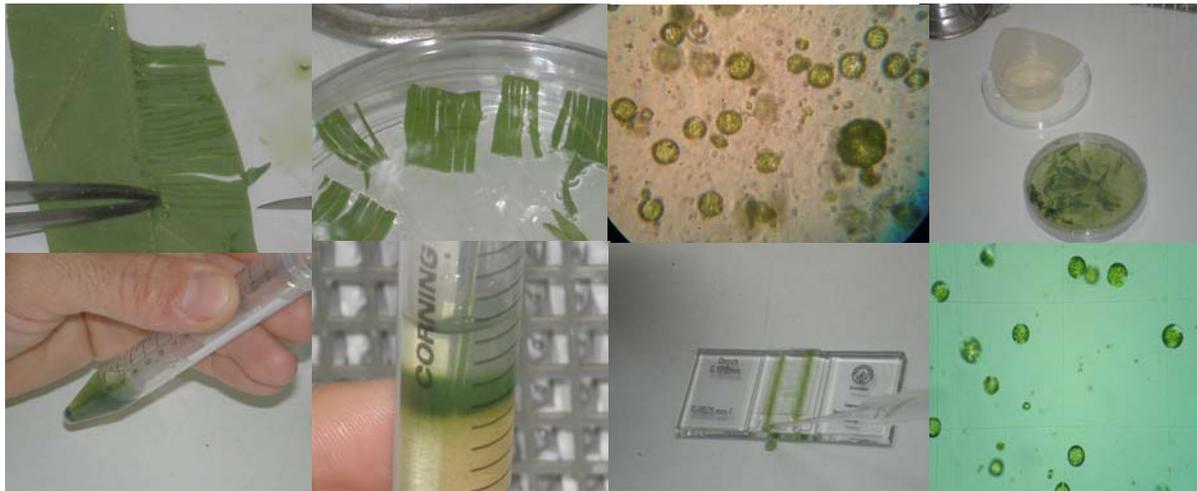


Figura 1. Seqüência para isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador: A) corte transversal da folha paralela à nervura central; B) pré-plasmólise das células em CPW 13M; C) visualização de protoplasto com restos celulares não digeridos; D) placa de isolamento pronta para filtragem em peneira 64µm; E) pellet filtrado e ressuspendido em CPW 9 M; F) gradiente de sacarose e detalhe da banda de protoplastos; G) câmara de Neubauer com a alíquota de protoplastos e H) protoplastos filtrados e em processo de contagem.

A composição enzimática e o tempo de incubação influenciaram no rendimento de protoplastos/ g de matéria fresca de bastão-do-imperador, como observado na Figura 2. A solução "B" é uma variação mais concentrada da solução "A" por isso obteve um maior rendimento de protoplastos durante as sete horas de incubação. Na primeira hora observada, houve intensa presença de células individualizadas em processo de protoplastização observados na solução "A" (Figura 3).

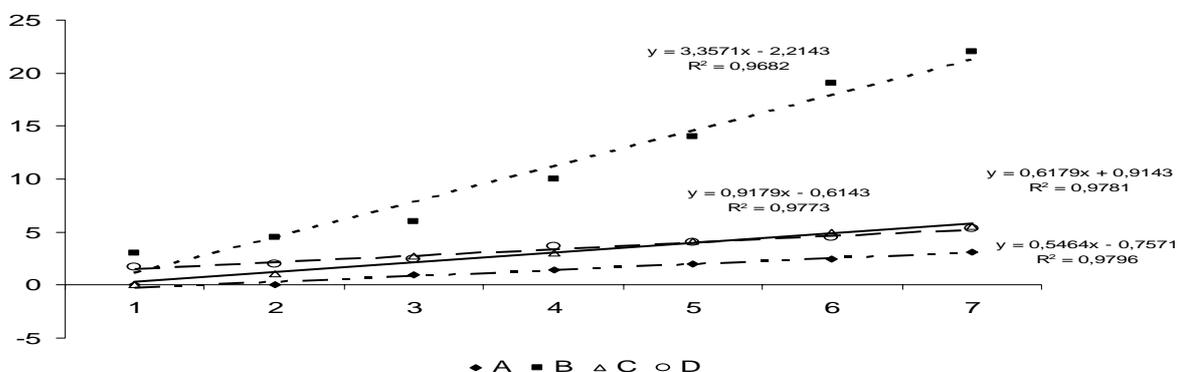


Figura 2. Eficiência das soluções enzimáticas em relação ao tempo de incubação do tecido no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador (*Etiligera elatior* Jach R. M. Smith).



Figura 3. Células individualizadas e em intenso processo de protoplastização, apresentado na primeira hora de incubação na solução “A”.

Os resultados do experimento mostram quatro contrastantes soluções enzimáticas representadas na Tabela 1. Observa-se que a solução “B” com 22×10^5 protoplastos/g de matéria fresca foi a que obteve maior rendimento, seguida pela solução “A” com 15×10^5 protoplastos/g de matéria fresca. Resultados semelhantes encontrados por Benedito et al. (2000), trabalhando com isolamento de protoplastos de citros utilizando a mesma solução “A” obteve 12×10^5 e 25×10^5 protoplastos /500 g de matéria fresca de calos das variedades de cítrus “Bahia cabula” e “orvalho de mel”, respectivamente, confirmando a eficiência da solução testada neste trabalho.

Trabalhos realizados por Ochatt et al. (1987) utilizando a solução “A” no isolamento de protoplastos de cerejeira (*Prunus avium* x *Pseudocerasus*) que é uma espécie lenhosa, obtiveram uma eficiência de 0.6×10^7 a 1.5×10^8 protoplastos/g de peso fresco, eficiência essa que a mesma solução não obteve no presente trabalho. Costa et al. (2002), utilizando a solução enzimática “A” obteve um rendimento de até $23,68 \times 10^6$ protoplastos/500g de calos em “ruby blood”, variedade de cítrus.

Tabela 1. Efeito das composições enzimáticas no isolamento de protoplastos de *Etiligera elatior* ao final de sete horas de incubação.

Tratamento	Fórmula enzimática		Rendimento de células de protoplastos por g/MF (Matéria Fresca)
	Cellulase	Pectinase	
Sol. “A”	Onozuca R-10 ^A 1%	Macerozyme R-10 ^A 0,2%	$15,0 \times 10^5$
Sol. “B”	Onozuca R-10 ^A 3%	Macerozyme R-10 ^A 1%	$22,0 \times 10^5$
Sol. “C”	<i>Aspergillus niger</i> ^B 2%	<i>Aspergillus niger</i> ^B 1%	$9,2 \times 10^5$
Sol. “D”	<i>Aspergillus niger</i> ^B 3%	<i>Aspergillus niger</i> ^B 1,5%	$10,5 \times 10^5$

A: Yakult Honsha Co., Ltd., Japan

B: Fluka

*Foram acrescentadas as soluções “A” e “B” 0,1% e 1% da enzima driselase, respectivamente.

A utilização de combinações enzimáticas compostas por cellulase e pectinase de *Aspergillus niger* representadas nas soluções “C” e “D”, ainda não foram bem estudadas no

isolamento de protoplastos vegetais, não há nenhuma literatura sobre o uso deste fungo em formulações de enzimas. Por se tratar de resultados difíceis de comparação, as quantidades de protoplastos/g de tecido está dentro de médias de isolamento comparadas a enzimas comumente utilizadas em processos de degradação de parede celular.

Vale ressaltar que se trata de um trabalho inédito já que existe pouca ou nenhuma literatura a respeito de cultivo *in vitro* de protoplastos de *Etilingera* e. Jack R. M. Smith, sendo necessárias mais pesquisas sobre a respectiva espécie com relação a outros tipos de soluções enzimáticas, no sentido de aumentar a eficiência de protoplastos isolados e assim, aumentando as potencialidades para programas de melhoramento genético desta planta, nos aspectos relacionados com a sua resistência a patógenos bem como a variação da coloração de suas brácteas.

CONCLUSÃO

A solução enzimática composta de 3% de cellulase onozuca R-10, 1% de macerozyme R-10 e 1% de driselase com 7 horas de incubação é a mais adequada para isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador

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.24 n.2 Jaboticabal ago. 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

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.

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

PALAVRAS-CHAVES

Etilingera elatior, Zingiberaceae; cultivo *in vitro*; enzimas.