ISOLAMENTO, CULTIVO E FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

MARINA YUKIE MURAYAMA

Engenheiro Agrônomo

orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1987

ISOLAMENTO, CULTIVO E FUSÃO DE PROPOPLASTOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

MARINA YUKIE MURAYAMA

Aprovada em: 11/12/1987

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Antonio Rochelle

ESALQ/USP

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

Murayama, Marina Yukie
M972i Isolamento, cultivo e fusão de protoplastos
de cana-de-açúcar (Saccharum spp.). Piracicaba,
1987.
102p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Citogenética 2. Cana-de-açúcar - Melhoramento 3. Cana-de-açúcar - Protoplasto 4. Protoplasto de cana-de-açúcar. I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 633.61

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação e incentivo recebidos.
- Dr. Andrew Maretzki, pelas valiosas sugestões e discussões, e também pelo fornecimento de materiais.
- Neftali Ochoa-Alejo e Prof. Dr. Darcy Martins da Silva, pelas sugestões e apoio recebidos.
- Técnicos Ênio T. de Oliveira e Carlos Dorelli, pelo auxílio técnico prestado.
- Romeu Rocha pela elaboração de gráficos e figuras.
- José Barbosa Cabral, Leonardo A. Carneiro, Maria Apareci Sklavuzo, Sandra Tabai e demais colegas de Seção da Bioquímica pelo estímulo e amizade.
- Helaine Carrer, Valderês Aparecida de Sousa e demais companheiras da República Xodô, pela amizade e apoio constante que tornaram possível a realização deste trabalho.
- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Piracicaba-SP), pelo uso dos laboratórios.
- Centro de Biotecnologia (CEBTEC) pelo uso de suas facilidades físicas.
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo auxílio financeiro para a realização do trabalho.

- Estação Experimental de Piracicaba (Piracicaba-SP) e Plano Nacional do Açúcar e do Alcool (PLANALSUCAR) pelo fornecimento de toletes de cana-de-açúcar.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos.
- Duratex Florestal S/A pelo apoio concedido.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Shiro e Kiyomi
e à Fábio, meu irmão,

DEDICO

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Protoplastos de Gramíneas	4
2.2. Protoplastos de Cana-de-Açúcar	12
2.3. Fusão de Protoplastos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Cultura de Calos, Suspensões Celulares e Regeneração de Plantas de Cana-de-Açúcar. Regeneração "in vitro".....	24
3.1.1. Obtenção e Cultivo de Calos.....	24
3.1.2. Obtenção de Plantas a Partir de Calos..	26
3.1.3. Obtenção e Cultivo de Suspensões Celulares.....	26
3.1.4. Determinação de Curvas de Crescimento de Suspensões Celulares.....	29
3.2. Material Vegetal Utilizado como Fonte de Protoplastos	32
3.2.1. Folhas	32
3.2.1.1. Folhas de plantas cultivadas "in vitro".....	32
3.2.1.2. Folhas de plantas cultivadas em sala de crescimento.....	33

	Página
3.2.1.3. Folhas de plantas de campo com pré-cultura "in vitro".....	35
3.2.2. Calos de Explantes Foliares.....	35
3.2.3. Suspensões Celulares.....	37
3.3. Digestão Enzimática	37
3.3.1. Preparo das Soluções Enzimáticas.....	37
3.3.2. Misturas Enzimáticas Testadas	38
3.3.2.1. Folhas	38
3.3.2.2. Calos e suspensões celulares.	38
3.4. Preparo do Material para a Digestão Enzimática	40
3.4.1. Folhas	40
3.4.1.1. Folhas de plantas cultivadas "in vitro".....	40
3.4.1.2. Folhas de plantas cultivadas em sala de crescimento.....	40
3.4.1.3. Folhas de plantas de campo com pré-cultura "in vitro".....	41
3.4.2. Calos	41
3.4.3. Suspensões	42
3.5. Condições de Incubação	42
3.6. Avaliação dos Testes de Isolamento	42
3.6.1. Rendimento	42
3.6.2. Observação de Fusões Espontâneas	43
3.7. Purificação dos Protoplastos	43
3.8. Cultivo dos Protoplastos	44
3.8.1. Protoplastos de Folhas	44
3.8.1.1. Obtenção dos protoplastos....	44
3.8.1.2. Meios e métodos de cultura...	45
3.8.2. Protoplastos de Suspensões	46
3.8.2.1. Cultivo de protoplastos da suspensão NA ₁	46
3.8.2.2. Cultivo de protoplastos da suspensão H.....	49

	Página
3.8.3. Avaliação	50
3.9. Fusão de Protoplastos com PEG	50
3.9.1. Obtenção dos Protoplastos	51
3.9.1.1. Protoplastos de mesófilo fo- liar	51
3.9.1.2. Protoplastos de células em sus- pensão	51
3.9.2. Procedimentos.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Isolamento de Protoplastos	55
4.1.1. Protoplastos de Folhas	55
4.1.1.1. Protoplastos de folhas "in vi- tro" x protoplastos de folhas "in vivo"	55
4.1.1.2. Efeito da pré-cultura de fo- lhas "in vitro".....	61
4.1.2. Protoplastos de Calos de Explantes fo- liares	65
4.1.3. Protoplastos de Suspensões Celulares...	67
4.1.3.1. Protoplastos das suspensões NA ₁ , NA ₂ , H.....	67
4.1.3.2. Efeito da fase de crescimento da suspensão	75
4.2. Cultura dos Protoplastos	79
4.2.1. Cultura de Protoplastos de Folhas	79
4.2.2. Cultura de Protoplastos de Suspensões..	81
4.2.2.1. Protoplastos da suspensão H ..	81
4.2.2.2. Protoplastos da suspensão NA ₁ .	84
4.3. Fusão de Protoplastos	87
4.3.1. Fusão Espontânea	87
4.3.2. Fusão com PEG	87

5. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DAS FIGURAS

Página

FIGURAS

1. Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA56-79) cultivadas "in vitro", utilizadas como fonte de protoplastos 33
2. Posição das folhas de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) cultivadas em sala de crescimento como fonte de protoplastos 34
3. Calo friável (esquerda) e calo não friável (direita) utilizados como fonte de protoplastos..... 36
4. Célula de Conway para cultivo de protoplastos de mesófilo foliar dentro de placa de Petri 46
5. Tecido foliar adulto de plantas cultivadas "in vitro" liberando protoplastos 59
6. Protoplastos isolados de folhas adultas de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) cultivadas "in vitro"..... 60
7. Protoplastos isolados de folhas jovens de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) cultivadas em sala de crescimento 60
8. Efeito de diferentes períodos de pré-cultura (4 e 8 dias) de segmentos de folhas jovens em meio MC 0,5 sobre a liberação de protoplastos..... 63

FIGURAS

9. Células da suspensão H, utilizadas como fonte de protoplastos	68
10. Protoplastos isolados de células da suspensão H (<i>Saccharum</i> spp. c.v. H 50-7209)	68
11. Protoplastos isolados de células da suspensão NA ₁ (<i>Saccharum</i> spp. c.v. 56-79)	69
12. Produção de protoplastos (número de protoplastos/ml de suspensão de protoplastos filtrada) obtida a partir das suspensões NA ₁ , NA ₂ e H	70
13. Curvas de crescimento das suspensões celulares NA ₁ , NA ₂ e H	72
14. Efeito de diferentes fases do crescimento da suspensão celular H (4, 10 e 20 dias) sobre a produção de protoplastos nas soluções enzimáticas SS ₁ , SS ₂ e SS ₃	76
15. Primeira divisão de protoplastos da suspensão H, cultivadas em meio líquido	82
16. Protoplastos da suspensão H em divisões posteriores, após 7-10 dias de cultivo em meio líquido	82
17. Formação de colônias celulares a partir do cultivo dos protoplastos da suspensão H	83
18. Obtenção de calos a partir dos protoplastos da suspensão H	83

19. Fusão incompleta entre protoplastos de mesófilo fo-
liar com protoplastos de células em suspensão..... 89
20. Produto da fusão de protoplastos de mesófilo fo-
liar com protoplastos de células em suspensão..... 89

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELAS	
1. Composição dos meios de cultura de regeneração de plantas em cana-de-açúcar	27
2. Composição dos meios de cultura de calos e suspensões celulares de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp c.v. NA 56-79)	28
3. Composição do meio de cultura da suspensão H (meio YE)	30
4. Procedência das enzimas empregadas	39
5. Composição dos meios testados para o cultivo de protoplastos de mesófilo foliar	47
6. Efeito de diferentes fontes de tecido foliar na liberação de protoplastos de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.c.v. NA 56-79)	56
7. Efeito de diferentes soluções enzimáticas sobre a liberação de protoplastos a partir de calos não friáveis	66
8. Efeito da fase de crescimento da suspensão H sobre a presença de aglomerados de protoplastos (após filtração em peneiras de malha de 35 μ m) nas soluções enzimáticas SS ₁ , SS ₂ e SS ₃	78

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	=	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AEC	=	S-2-amino-etil-L-cisteína
AIA	=	Ácido indolil- α -acético
ANA	=	Ácido naftaleneacético
BAP	=	6-benzilaminopurina
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
MES	=	Ácido (2-N-morfolinoetanosulfônico)
PEG	=	Polietilenoglicol
prtós	=	protoplastos

ISOLAMENTO, CULTIVO E FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

Autora: MARINA YUKIE MURAYAMA

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas diferentes fontes de protoplastos de cana-de-açúcar, entre as quais, folhas jovens e adultas, plantas cultivadas "in vitro" e em sala de crescimento, calos de explantes foliares e suspensões celulares.

Nas condições testadas, folhas adultas de plantas cultivadas "in vitro" produziram preparações de protoplastos homogêneas. Entretanto, não foi possível obter protoplastos de folhas adultas de plantas cultivadas em vermiculita e somente as folhas bem jovens se mostraram capazes de liberá-los.

Não foram observadas divisões em protoplastos de mesofilo cultivados em diferentes meios de cultura.

Foi estudado o efeito da pré-cultura de segmentos de folhas jovens em meio de cultura sólido, observando-se uma diminuição na produção de protoplastos em períodos de pré-cultura mais prolongados.

Quando se utilizou calos jovens originados de

explantes foliares, somente foram obtidos protoplastos das porções não friáveis (nodulares).

A qualidade da suspensão celular afetou a produção e a qualidade dos protoplastos isolados. A suspensão H (*Saccharum* spp. c.v. H-50-7209), com crescimento mais rápido e constituída de aglomerados celulares menores em relação a 2 outras suspensões celulares testadas (NA₁ e NA₂, c.v. NA 56-79), apresentou maiores produções de protoplastos em todas as soluções enzimáticas testadas.

Quando cultivados, os protoplastos da suspensão H foram capazes de se dividir até a formação de calos, enquanto os da suspensão NA₁ e NA₂ se limitaram às primeiras divisões.

Verificou-se também que a produção de protoplastos é diminuída e que a vacuolização dos mesmos aumentou quando foram empregadas células da fase estacionária do seu ciclo de crescimento.

Utilizando-se uma solução de PEG 4000 (50%) foi possível induzir a fusão de protoplastos de células em suspensão com protoplastos de mesofilo.

ISOLATION, CULTURE AND FUSION OF PROTOPLASTS OF SUGARCANE (*Saccharum* spp.)

Author: MARINA YUKIE MURAYAMA

Adviser: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

In this work, different sources of protoplasts of sugar-cane were studied, among which young and mature leaves, plants cultivated "in vitro" and in vermiculite callus from foliar explants and suspension cultures.

Under the tested conditions, mature leaves of plants cultivated "in vitro" produced homogeneous preparations of protoplasts. It was impossible, however, to obtain protoplasts of mature leaves of plants cultivated in vermiculite and only very young leaves proved to be capable of liberating them.

No divisions were noted in protoplasts of foliar mesophyll cultivated in different culture media.

From a study carried out on the effect of the preculture of young leaves segments in a solid culture medium, it was noted that the production of protoplasts decreased during longer periods of preculture.

When young callus derived from foliar explants were used, only protoplasts from nonfriable parts were obtained.

The quality of the suspension culture affected both the production and the quality of the isolated protoplasts. The H suspension (*Saccharum* spp. c.v. H-50-7209), growing more quickly and consisting of smaller cellular agglomerates if compared with two other tested suspension cultures (NA₁ and NA₂, both from *Saccharum* spp. c.v. NA 56-79), showed a higher protoplast production in all tested enzymatic solutions.

When cultivated, the protoplasts of the H suspension were capable of dividing up to the formation of callus, whereas those of the NA₁ and NA₂ suspensions were unable to go beyond the first divisions.

It was also noted that production of protoplasts decreased and their vacuolation increased, when cells in the stationary stage of their growth cycle were used.

By using a solution of PEG 4000 (50%) it has been possible to induce the fusion of protoplasts from suspension culture with protoplasts from mesophyll.

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de isolamento e cultura de protoplas_utos são relativamente recentes, sendo estas "células nuas" obtidas através da remoção da parede celular por processos enzimáticos ou mecânicos.

Os protoplastos tornaram-se especialmente importantes por abrir novos caminhos para o melhoramento genético de plantas através da transformação celular (engenharia genética) e hibridação somática, uma vez demonstrado que são capazes de absorver macromoléculas ou organelas celulares e de serem induzidos à fusão, inclusive de regenerar plantas inteiras (VASIL, 1976; BAJAJ, 1977; VASIL et alii, 1979; UCHIMIYA, 1979; CROCOMO et alii, 1981; AHUJA, 1982).

Sua crescente importância já foi responsável por outros recentes artigos de revisão publicados (EVANS, 1983a; PELLETIER & CHUPEAU, 1984; HARMS, 1983).

A maioria destes artigos tem focalizado em primeiro lugar o potencial biotecnológico dos protoplastos, mas como ERIKSSON (1985) salientou, os protoplastos também podem ser explorados em pesquisas básicas da Biologia Vegetal.

Como exemplos, os protoplastos podem ser utilizados em estudos de organelas celulares (FOWKE et alii, 1985), formação da parede celular (WILLISON, 1985), citodiferenciação (KOHLENBACH, 1985), fisiologia vegetal (LEONARD & RAYDER, 1985), virologia (MOTOYOSHI, 1985) e isolamento de mutantes (NEGRUTIU et alii, 1984; BLONSTEIN & KING, 1985).

A fusão dos protoplastos pode fornecer combinações genéticas singulares, produzindo híbridos somáticos entre espécies sexualmente incompatíveis. Além disso, através da produção de "cíbridos" pode-se obter a transferência de características codificadas pelo citoplasma, tais como macho-esterilidade e resistência a herbicidas e doenças (EVANS, 1983a). Muitas vezes essas características são codificadas pelos cloroplastos ou mitocôndrias.

Agrobacterium tumefaciens tem sido utilizada como o vetor natural de genes para transformar plantas. Entretanto, como esta bactéria não infecta cereais e outras espécies da família das gramíneas, os protoplastos constituem um sistema alternativo para a transformação destas plantas (LÖRZ et alii, 1985; POTRYKUS et alii, 1985).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), pertencente à família das gramíneas, é uma fonte importante de sacarose e etanol, sendo o Brasil um dos maiores produtores desta cultura. Em programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar tem sido utilizada a indução de variabilidade genética através de calos e suspensão celulares, mas poucos progressos têm havido

em relação à fusão de protoplastos para se obter a hibridização somática e a transformação celular (LIU, 1984).

Uma das principais limitações para a obtenção de híbridos somáticos em gramíneas tem sido a falta de sistemas eficientes de regeneração de plantas a partir de protoplastos. Para superá-la ainda serão necessários estudos que possibilitem a definição dos requerimentos de crescimento "in vitro" e de diferenciação de culturas celulares e protoplastos de gramíneas (AHUJA, 1982).

Ao contrário da família das Solanáceas, os protoplastos de gramíneas são considerados difíceis de se cultivar e de regenerar plantas (VASIL & VASIL, 1980). No Brasil, não existem trabalhos de pesquisa com protoplastos de cana-de-açúcar, surgindo então a iniciativa de se estudar alguns aspectos do isolamento, cultura e fusão de protoplastos desta espécie.

O objetivo deste trabalho foi estudar a metodologia para o isolamento, cultivo e fusão de protoplastos de tecidos e células de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79 e H-50-7209).

2, REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROTOPLASTOS DE GRAMÍNEAS

A capacidade dos protoplastos se dividirem com posterior formação de calos ou regeneração de plantas, é um fenômeno que ainda está restrito à uma pequena lista de espécies vegetais, e que se restringe ainda mais se forem consideradas apenas aquelas que possuem valor econômico.

Ao contrário da família das Solanáceas, na qual são conhecidas pelo menos 38 espécies que regeneraram plantas a partir de protoplastos (EVANS & BRAVO, 1983), os protoplastos de gramíneas são considerados difíceis de se cultivar e de regenerar plantas (VASIL et alii, 1979; VASIL & VASIL, 1980). Entretanto, divisões celulares levando à formação de calos têm sido obtidas em *Hordeum vulgare* L. (LUHRS & IORZ, 1986), *Lolium multiflorum* Lam. (JONES & DALE, 1982), *Oryza sativa* L. (DEKA & SEN, 1976), *Pennisetum americanum* Auth. (VASIL & VASIL, 1979), *Zea mays* L. (POTRYKUS et alii, 1977; VU DYK KUANG et alii, 1983), *Sorghum bicolor* L. (KARUNARATNE & SCOTT, 1981), *Pennisetum purpureum* Schum. (VASIL et alii, 1983), *Panicum maximum* Jacq. (LU et alii, 1981),

Saccharum spp. (EVANS *et alii*, 1980) e *Triticum monoccum* L. (Nemet e Dudits, citados por VASIL, 1983).

A regeneração de plantas a partir de protoplastos de gramíneas é um fato bem recente, sendo apenas relatada para *Pennisetum americanum* (VASIL & VASIL, 1980), *Panicum maximum* Jacq. (LU *et alii*, 1981), *Pennisetum purpureum* Schum. (VASIL *et alii*, 1983), *Panicum miliaceum* L. (HEYSER, 1984), *Saccharum* spp. (SRINIVASAN & VASIL, 1985) e *Oryza sativa* L. (COULIBALY & DERMALY, 1986).

A maior parte dos trabalhos de isolamento e cultivo de protoplastos de gramíneas tem empregado protoplastos isolados de folhas, calos ou suspensão celulares. Poucos são os estudos que utilizam ápices radiculares como fonte de protoplastos, e neste caso podem ser citados aqueles conduzidos por POWER *et alii* (1970) com aveia e por SEN & PILET (1980), com milho.

Com relação à protoplastos de milho, um dos primeiros trabalhos de isolamento e cultivo realizado por MOTOYOSHI (1972) não apresentou resultados positivos quanto à divisão dos protoplastos cultivados. O autor isolou protoplastos de calos derivados de endosperma de milho utilizando uma mistura enzimática de Cellulase e Macerozyme e cultivou-os poste-

* NEMET, G. & DUDITS, D. Potencial of protoplast, cell and tissue culture in cereal research. In: NOVAK, F.J. ed. Use of Tissue Cultures in Plant Breeding. Praga, Czechoslovak Academic of Sciences, 1977. p.145-63.

riormente em meio líquido com composição semelhante ao meio de cultura de calos. Foi observada apenas a divisão nuclear nestes protoplastos em cultura, sem divisões mitóticas.

Os primeiros relatos sobre a divisão de protoplastos de milho surgiram somente com a utilização de suspensões celulares. Assim é que, POTRYKUS et alii (1979) realizaram vários estudos dos fatores que pudessem aumentar a frequência de divisões mitóticas e formação de colônias celulares em cultura de protoplastos de suspensões de milho. Foram desenvolvidos protocolos para o isolamento de grandes quantidades de protoplastos a partir de uma suspensão celular estabelecida, assim como a formação de suspensões secundárias oriundas da divisão destes protoplastos em cultura. Os fatores críticos pareciam estar mais associados com a "qualidade" da cultura utilizada para o isolamento dos protoplastos, do que com as condições de isolamento ou de cultura testados.

Do mesmo modo, CHOUREY & ZURAWSKI (1981) obtiveram divisões celulares e formação de calos em protoplastos de suspensões celulares de milho (linhagem "Black Mexican Sweet"). Estas suspensões, obtidas de calos friáveis, apresentaram rápido crescimento e eram constituídos de pequenos agregados celulares, características muito importantes para a produção de protoplastos. A densidade mínima de 5×10^4 protoplastos por mililitro de meio de cultura pareceu ser muito importante para a divisão continuada dos protoplastos. VU DYK KUANG et alii (1984), trabalhando com protoplastos de milho híbrido, não en-

contraram nenhum meio de cultura adequado, e somente com a utilização de sistemas de "nursery" foi possível a obtenção de colônias celulares.

No caso do arroz (*Oryza sativa* L.) LIU & LAI (1982) observaram que a fase de crescimento da suspensão celular e o tamanho de seus agregados celulares produziram um efeito mais pronunciado sobre a liberação de protoplastos do que a concentração enzimática, o tempo de incubação ou o pré-tratamento dos agregados celulares. Quando cultivados foram obtidas divisões mitóticas iniciais, dando origem a várias células na forma de filamentos lineares, mas estas degeneraram após uma semana.

Encontramos ainda na literatura, outros exemplos de isolamentos e cultivos de protoplastos de calos friáveis de *Oryza sativa* L. (DEKA & SEN, 1976) e suspensões de *Pennisetum americanum* (VASIL & VASIL, 1979) com longo período de cultura, e que deram origem a calos sem capacidade de regeneração de plantas.

Com os avanços obtidos no cultivo de calos e suspensões embriogênicas em várias espécies de gramíneas (VASIL, 1983) a partir dos anos 80 passou a se dar maior ênfase à utilização de calos e suspensões com características embriogênicas como fonte de protoplastos. Tanto que um dos primeiros trabalhos de regeneração de plantas, relatados por VASIL & VASIL (1980), utilizou protoplastos originados de suspensões

celulares embriogênicas de *Pennisetum americanum*. Estas suspensões celulares embriogênicas foram obtidas de calos de embriões imaturos e produziram dois tipos de protoplastos: os não vacuolados, com citoplasma denso, que se dividiram formando aglomerados celulares, embriões e plantas intactas; e os vacuolados, que não se dividiam.

Protoplastos de outras gramíneas forrageiras, *Panicum maximum* Jacq., também regeneraram plantas quando isolados de suspensões embriogênicas de calos de embriões imaturos ou inflorescências jovens (LU et alii, 1981). Os protoplastos cultivados em meio modificado de KAO & MICHAYLUK (1974) líquido, formaram agregados celulares embriogênicos e a transferência destes agregados para meio de MURASHIGE-SKOOG (1962) sólido contendo 2,4-D propiciou a formação de novos embriões. Estes embriões imaturos quando transferidos para meio de MURASHIGE-SKOOG sem reguladores de crescimento, deram origem a plantas verdes, porém sem desenvolvimento posterior após a formação das primeiras folhas e raízes.

Em trabalhos similares, VASIL et alii (1983), obtiveram embriões e plantas enraizadas "in vitro" a partir do cultivo de protoplastos de suspensões embriogênicas da espécie forrageira *Pennisetum purpureum* Schum. Estes embriões apresentaram maiores dificuldades de desenvolvimento do que os derivados de calos que não passaram pela fase de protoplastos. Segundo o autor, a dissociação crescente das células de calos para suspensões celulares e depois para protoplastos parece dificultar progressivamente a organização e a maturação de em-

briões somáticos e seu posterior desenvolvimento em plantas intactas.

HEYSER (1984) também encontrou dificuldades com protoplastos isolados de suspensões embriogênicas obtidas de calos de sementes maduras, conseguindo somente a regeneração de plantas albinas, algumas delas apresentando sistema radicular.

IMBRIE-MILLIGAN & HODGES (1986) conduziram vários testes para estudar as variáveis que poderiam otimizar a produção de protoplastos viáveis de calos embriogênicos de milho. As condições de cultivo dos calos, as soluções enzimáticas e os procedimentos de purificação afetaram tanto a produção como a viabilidade dos protoplastos. Os protoplastos plaqueados em meio sólido, regeneraram a parede celular e sofreram várias divisões, mas somente em meio solidificado com agarose houve a formação de microcalos (0,1 - 0,5 mm de diâmetro). Estes microcalos cessaram seu crescimento e não regeneraram plantas.

Recentes trabalhos relataram a regeneração de plantas em calos provenientes de cultura de protoplastos de arroz, onde não foi especificado a utilização de suspensões embriogênicas, no entanto, escolheram calos recém-formados sobre os explantes de coleóptilos de arroz (COULIBALY & DEMARLY, 1986) ou suspensões de células com citoplasma denso (YAMADA *et alii*, 1986).

COULIBALY & DEMARLY (1986) encontraram que, o isolamento de protoplastos de calos totipotentes de *Oryza sativa* L. (cultivar Monoverekan) está correlacionado com a ida de dos calos. No primeiro experimento, obtiveram 10 plantas a partir de 105 calos provenientes da cultura dos protoplastos, mas não esclareceram se elas foram transferidas para condições ambientais externas.

Por sua vez, YAMADA et alii (1986) conseguiram a regeneração de plantas de arroz de protoplastos de suspensões celulares selecionadas (células com citoplasma denso) da linhagem A-58 macho estéril e de suspensões celulares da variedade Fujiminori. As plantas obtidas (1 de linhagem A-58 e 3 da variedade Fujiminori) foram transferidas para vasos e mantidas em casa de vegetação. Neste estudo observou-se a importância do genótipo sobre a produção, divisão e regeneração dos protoplastos, pois de 25 variedades de arroz testadas, utilizando-se a mesma metodologia, somente protoplastos de 2 variedades (Toyotama e Fujiminori) apresentaram altas frequências de divi são e formação de colônias celulares e apenas 1 delas regenerou plantas (Fujiminori). As células em suspensão da linhagem A-58, assim como destas duas variedades dividiram-se rapidamente e apresentavam citoplasma denso, verificando-se então que a se leção de uma linhagem celular com uma boa taxa de crescimento é uma condição necessária, porém, não suficiente para se obter a regeneração de plantas.

Além desses trabalhos, os novos relatos de rege

neração de plantas a partir de protoplastos isolados de suspensões celulares de calos de antera (TORIYANA & HINATA, 1986) e de suspensões de calos de embriões (SHIMAMOTO *et alii*, 1986; FUJIMURA *et alii*, 1986) somados aos anteriores confirmam as possibilidades reais da produção de híbridos ou plantas transformadas nesta espécie.

Até o presente, os estudos de isolamento e cultivo de protoplastos de mesofilo foliar e outros tecidos (com exceção de calos e suspensões celulares) de gramíneas não foram bem sucedidos. Tentativas de cultivo de protoplastos isolados de folhas adultas de *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa* e *Secale cereale* (EVANS *et alii*, 1972), folhas jovens de *Sorghum bicolor* (KARUNARATNE & SCOTT, 1981) e epicótilo de *Secale cereale* e *Triticum aestivum* (de la ROCHE *et alii* 1976), falharam quanto a obtenção de divisões mitóticas continuadas.

POTRIKUS *et alii* (1977) conseguiram obter a divisão de protoplastos de milho, quando isolados do caule de plântulas com 8 semanas de idade. Porém, mais tarde foi relatado que este trabalho não era reproduzível (POTRYKUS *et alii*, 1979).

Em pesquisa conduzida por DEKA & SEN (1976) com arroz foi possível obter a formação de calos a partir de protoplastos isolados de bainha foliar jovem, cultivadas em meio sólido.

A transferência dos calos para meio de cultura adequado provocou a formação de raízes.

Segundo VASIL (1983) os insucessos no cultivo de protoplastos de mesófilo de gramíneas não podem ser explicados pelo fato de serem incapazes de dividir-se ou serem morfogenicamente incompetentes, mas pela falta de determinadas condições corretas para seu cultivo.

KAUR-SAWHNEY et alii (1980) sugerem que a falta de divisões continuadas em protoplastos de gramíneas pode ser devido a um bloqueio mitótico.

2.2. PROTOPLASTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

As dificuldades encontradas nos trabalhos de isolamento e cultivo de protoplastos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) são semelhantes às aquelas já apresentadas no item anterior, a respeito dos protoplastos de gramíneas. A maior parte dos trabalhos que relata divisões continuadas foi realizada com protoplastos de suspensões celulares (MARETZKI & NICKELL, 1973; LARKIN, 1982; QUIUSHENG & XIANGHUI, 1984; GUIDERDONI, 1985) e são recentes os primeiros sucessos na regeneração de plantas a partir de cultivo de protoplastos (QUIUSHENG & XUEQIN, 1984; SRINIVASAN & VASIL, 1985).

Um dos primeiros trabalhos de reestabelecimento de suspensões celulares a partir do cultivo de protoplastos de

cana-de-açúcar foi relatado por MARETZKI & NICKELL (1973). Os protoplastos foram isolados de suspensões celulares através da digestão enzimática com Cellulase Onozuka (5%) e Glusulase (1,5%).

O estágio de crescimento da suspensão utilizada foi crítico para a obtenção de uma alta porcentagem de células convertidas em protoplastos. Aproximadamente 46% da suspensão celular original foi convertida em protoplastos após a filtração, mas muitos deles foram danificados pela ação da enzima Glusulase. Os protoplastos plaqueados em meio sólido "pré-condicionado", regeneraram a parede celular, dividiram-se, e após 1 mês observou-se pequenos aglomerados de células semelhantes aos das suspensões celulares que lhe deram origem. Como estas suspensões não eram competentes morfogenicamente, não foi obtida a regeneração de plantas.

LARKIN (1982) isolou protoplastos de suspensões celulares derivadas de calos de explantes foliares de cana-de-açúcar, utilizando uma solução enzimática contendo Driselase (2%), Cellulysin (2%), Hemicellulase (1%), Pectolyase (0,1%), 0,27 M de sacarose, 0,12 M de manitol e 0,024 M de CaCl_2 .

Das várias suspensões testadas, apenas 2 variedades de cana-de-açúcar produziram preparações de protoplastos mais uniformes, sem a presença de células não digeridas. Quando cultivados em meio líquido ou sólido (agar) alguns deles se dividiram e formaram pequenos agregados celulares, sen-

do que a maior frequência de divisões iniciais observadas foi de 19% dos protoplastos plaqueados, e destes um máximo de 5% formaram colônias maiores. No meio de cultura de protoplastos o 2,4-D mostrou-se essencial e o BAP benéfico, sendo o AIA e o AIA-fenilalanina desnecessários.

Suspensões celulares de crescimento rápido foram utilizadas por QUIUSHENG & XIANGHUI (1984) para isolar e cultivar protoplastos de cana-de-açúcar em solução enzimática contendo 1,5% de Cellulase "Panda", 2% de Cellulase Onozuka R-10, 0,05% de Pectolyase Y-23, 10 mM de CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$, 0,5% de MES e 0,5 M de manitol. As suspensões de protoplastos foram cultivadas à uma densidade de $2-5 \times 10^4$ protoplastos/ml em meio líquido, onde formaram pequenos aglomerados após 3 meses de cultura. As condições de cultura, especialmente a temperatura, pareceram ser essenciais à divisão continuada dos protoplastos. Utilizando os calos obtidos destas culturas de protoplastos, QUIUSHENG & XUEQIN (1984) realizaram experimentos de diferenciação de plantas. Foi observado que a morfologia estrutural dos calos afeta de maneira significativa a capacidade de regeneração de plantas. Calos translúcidos, do tipo friável não mostraram sinais de organogênese, enquanto calos compactos constituídos de massas celulares embriogênicas, apresentaram formação de coleóptilos e raízes após transferência para vários tipos de meio de cultura. Para a cultura destes calos foi necessária uma concentração relativamente alta de 2,4-D durante os estágios iniciais da organogênese ou da embriogênese somáti

ca. O trabalho não esclarece se houve desenvolvimento posterior das plantas de cana-de-açúcar.

GUIDERDONI (1985) utilizou calos friáveis ou suspensões celulares para isolar e cultivar protoplastos de 2 variedades comerciais de cana-de-açúcar (Q 75 e HJ 5741). As enzimas mais utilizadas foram a Cellulase Onozuka R-10 (2%) Pectolyase Y-23 (0,1%) e Driselase Fluka (0,5%). Foram observadas fusões espontâneas durante o isolamento, detectadas pela presença de protoplastos bi, tri ou tetranucleados. O comportamento dos protoplastos foi melhor quando cultivados a uma densidade de 10^5 protoplastos/ml em microgotas (50 μ l) quando comparado a seu cultivo em meio líquido dentro de placas de Petri. Observou-se divisões celulares na frequência de 1% e após 8 dias de cultura, a formação de estruturas pluricelulares que, no entanto, não evoluíram para calos nem regeneraram plantas.

Praticamente, nestes trabalhos já comentados, não houve a seleção de suspensões celulares com capacidade de regeneração de plantas, sendo o critério de escolha somente o rápido crescimento e a constituição por pequenos agregados celulares.

No entanto, com a detecção de suspensões celulares embriogênicas em cana-de-açúcar (clone B 43-62), de rápido crescimento e constituídas de células embriogênicas com citoplasma denso (HO & VASIL, 1983) foi possível obter a neo-for

mação de plantas a partir de protoplastos isolados destas suspensões (SRINIVASAN & VASIL, 1985). Estes últimos autores cultivaram os protoplastos em meio solidificado com agarose, contendo 2,4-D e BAP como reguladores de crescimento. A regeneração da parede celular ocorreu após 3-4 dias de cultura e após 10 dias formaram-se microcalos que desenvolveram-se posteriormente em calos brancos compactos e embriogênicos. Estes calos, transferidos para outro meio de cultura produziram embriões somáticos, os quais germinaram dando origem a brotos. Este trabalho não relata se as plantas obtidas continuaram seu desenvolvimento, chegando a ser transferidas para condições ambientais externas. Mais tarde, no entanto, estes autores relataram a transferência bem sucedida para o solo de várias plantas regeneradas de protoplastos (SRINIVASAN & VASIL, 1986).

Protoplastos de folhas de cana-de-açúcar têm apresentado maiores dificuldades em relação aos protoplastos de suspensões ou calos. Normalmente são utilizadas folhas bem jovens de cana-de-açúcar.

FERENCZY & MARETZKI (1970) utilizaram o tecido foliar próximo à região meristemática apical de plantas de cana-de-açúcar e conseguiram isolar protoplastos com uma mistura enzimática de Cellulase Onozuka e Macerozyme. Do mesmo modo, KANAI & EDWARDS (1973) também conseguiram isolar protoplastos de folhas bem jovens com solução enzimática de celulase (2%) e pectinase (0,1%).

Em pesquisas conduzidas por CHEN & LIU (1974) foram isolados protoplastos de folhas bem jovens de várias espécies de cana-de-açúcar tais como *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinensis* *S. robustum* e a variedade comercial F-160, utilizando-se a combinação de enzimas Cellulase Onozuka e Macerozyme. Houve diferenças significativas no número de protoplastos liberados pelas diferentes espécies, sendo que houve tendências de maiores produções com *S. robustum*. A liberação de protoplastos foi afetada significativamente pela idade das folhas testadas, tanto que folhas maduras não liberaram protoplastos. Durante o isolamento foram observadas fusões espontâneas ocasionais.

CHEN & LIU (1976) cultivaram protoplastos isolados de folhas jovens de cana-de-açúcar da variedade F-160 e observaram a regeneração da parede celular após 24 horas de cultura. Também observaram um efeito apreciável da concentração de auxina e sacarose sobre a regeneração da parede celular. As primeiras divisões observadas ocorreram após 5 dias de cultura, havendo uma baixa frequência de divisões continuadas posteriormente.

Divisões continuadas conduzindo à formação de pequenos aglomerados celulares foram obtidas por KRISHINAMURTHI (1976), em protoplastos isolados de folhas bem jovens de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, e fusionados com solução de PEG 6000.

EVANS et alii (1980) também relataram a formação de pequenas colônias celulares em protoplastos isolados de

folhas jovens de cana-de-açúcar, variedade NA 56-79, com mistura enzimática de Cellulase Onozuka R-10 (3%), pectinase (4%) e Rhozyme 150 (1,5%). Quando cultivados à densidade de $10^3 - 10^4$ protoplastos/ml em gotas, observou-se a regeneração da parede celular após 7 - 10 dias de cultivo e divisão após 14 dias de cultivo.

2.3. FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Durante vários anos a hibridização sexual tem sido utilizada no melhoramento de espécies cultivadas (BATES & DEVOE, 1973). Infelizmente, a hibridização sexual é dificultada por barreiras que impedem a sua utilização.

A aplicação da hibridização somática ou assexual já tinha sido sugerida por KÜSTER (1909), mas as experimentações ficavam prejudicadas pelo pequeno número de protoplastos cirurgicamente obtidos pela remoção da parede celular de tecidos plasmolisados e pelas condições de cultura e fusão inadequadas.

Somente com o desenvolvimento de técnicas que permitiram o isolamento de grandes quantidades de protoplastos (COCKING, 1960), é que foi possível iniciar novas tentativas de fusão dos protoplastos.

Embora tivessem sido observadas fusões espontâneas sob certas condições, a hibridização somática tornou-se

realmente praticável somente com o desenvolvimento de técnicas eficientes de fusão celular, notavelmente com a introdução do PEG (Polietileno Glicol) em 1974 (KAO & MICHAYLUK, 1974; WALLIN et alii, 1974). Após esta descoberta, procurou-se dar mais ênfase à fusões de protoplastos entre espécies distantes no sentido de produzir combinações que não fossem possíveis através dos métodos convencionais de melhoramento, ou então, que pudessem ser facilmente distinguíveis das espécies parentais.

Os primeiros híbridos somáticos foram obtidos entre *Nicotiana glauca* + *Nicotiana langsdorffii* por CARLSON et alii (1972). Mais tarde plantas foram regeneradas de combinações intergenéricas tais como batata + tomate e cenoura + salsa (EVANS, 1983a), no entanto, a maior parte dos híbridos de espécies mais distantes eram estéreis, impedindo sua utilização em programas de melhoramento.

Além de possibilitar a obtenção de híbridos entre espécies sexualmente incompatíveis, a fusão de protoplastos possui o mérito da criação de combinações genéticas singulares, nucleares ou citoplasmáticas, que não poderiam ser obtidas por outros meios (HARMS, 1985). Novas técnicas têm sido desenvolvidas para a transformação das células vegetais, e os protoplastos, por seus atributos, constituem uma valiosa ferramenta para a incorporação de informação genética "estranha". Assim, os protoplastos podem ser utilizados para a produção dos "cíbridos" (GALUN & AVIV, 1983), incorporação de organelas

celulares (WHITAKER & EVANS, 1986), microrganismos (GILES & WHITEHEAD, 1977), ou fragmentos de DNA (WULLENS *et alii*, 1986).

Finalmente, a fusão de protoplastos pode contribuir em estudos biológicos e genéticos. Como exemplos podem ser citados os estudos básicos da regulação da expressão gênica, particularmente com respeito ao controle da diferenciação e à compreensão dos processos morfogênicos (HARMS, 1985). Também poderá ajudar a elucidação da estrutura das membranas celulares (CONSTABEL & CUTLER, 1985).

Os progressos da fusão celular com estes objetivos complementam a proposta quase exclusiva da fusão para fins de hibridização somática e transformação celular (CONSTABEL & CUTLER, 1985).

Recentemente novas técnicas tem sido estudadas e otimizadas para induzir protoplastos à fusão, como é o caso da eletrofusão (ZIMMERMANN, 1982; SILVA *et alii*, 1987).

Considerando os progressos na área de fusão de protoplastos e hibridização somática, esta última década já permitiu vários resultados, documentados nas revisões de AHUJA (1982), HARMS (1983), EVANS (1983b), PELLETIER & CHUPEAU (1984) e HARMS (1985).

Com relação a estudos de fusão de protoplastos de gramíneas e em particular, de espécies do gênero *Saccharum*, são raras as informações disponíveis. Desconhece-se até o mo-

mento algum trabalho de fusão e cultura de protoplastos de gramineas que tenha regenerado plantas.

Utilizando-se PEG como agente fusogênico, BRAR *et alii* (1980) realizaram a fusão de protoplastos de suspensões celulares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench cv. GPR - 168) e de protoplastos de mesófilo foliar de milho (*Zea mays* L. cv. Punjab Local). A frequência de fusões variou de 3,6 - 12,1% em diferentes testes, sendo identificados os produtos de fusão pela ocorrência simultânea de cloroplastos dos protoplastos de mesófilo, leucoplastos e citoplasma denso dos protoplastos das suspensões celulares. Cultivados em fina camada de meio líquido, os produtos de fusão dividiram-se formando pequenas colônias de 8 - 10 células. Após 3 semanas de cultivo, não foi possível identificar os produtos de fusão devido à despigmentação dos cloroplastos.

Alguns pesquisadores têm estudado a utilização da eletrofusão como outro método de indução de fusão, e neste sentido ZIMMERMANN & SCHEURICH (1981) e VERHOEK-KÖHLER *et alii*, (1983) têm trabalhado com protoplastos de mesófilo de *Avena sativa*.

Trabalhos mais recentes têm pesquisado a transferência de genes para protoplastos de milho através da eletroporação (FROMM *et alii*, 1986).

Em cana-de-açúcar, CHEN & LIU (1974) utilizaram nitrato de sódio para induzir a fusão de protoplastos de fo-

lhas jovens, mas observaram que a frequência de produtos de fusão foi baixa. No entanto, ocasionalmente encontraram protoplastos binucleados ou multinucleados durante o isolamento enzimático, provavelmente oriundos da fusão espontânea dos protoplastos.

KRISHNAMURTHI (1976), isolou protoplastos de folhas jovens de *S. officinarum* e *S. spontaneum* e os induziu à fusão adicionando uma solução de PEG 6000. Os dois tipos de protoplastos diferiram-se quanto à intensidade da coloração, sendo os protoplastos de *S. officinarum* mais escuros e os de *S. spontaneum* mais claros. O autor observou divisões celulares até a formação de pequenos aglomerados de células, no entanto, não foi esclarecido em que tipo de protoplasto ocorreram estas divisões (produtos de fusão ou protoplastos não fusionados).

Somente em trabalhos mais recentes, foi estudada a caracterização bioquímica e molecular, e não apenas morfológica dos híbridos somáticos de gramíneas (TABAEAZADEH et alii, 1986). Neste estudo, protoplastos isolados de uma linhagem celular de *Pennisetum americanum* resistente ao AEC (S-2 amino-etil-L cisteína) e inativados com iodoacetato, sendo então fusionados com protoplastos de linhagens celulares embriogênicas de *Panicum maximum* e *Saccharum officinarum*, respectivamente. Os híbridos somáticos de *P. americanum* + *P. maximum* e de *P. americanum* + *S. officinarum* foram selecionados em meios enriquecidos com AEC e confirmados através de padrões eletro-

foréticos. Os híbridos possuíam as bandas dos progenitores assim como mostravam outras bandas novas.

Os calos híbridos formaram embriões somáticos sendo que o padrão de desidrogenase fosfogluconato dos embriões foi similar ao dos calos híbridos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Seção de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Campus da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

3.1. CULTURAS DE CALOS, SUSPENSÕES CELULARES E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR "IN VITRO"

3.1.1. Obtenção e cultivo de calos

Toletes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., var. NA 56-79), com 4 - 6 cm de comprimento, contendo gemas individuais, foram mergulhadas em solução de Benlate (300 mg/l) durante 10 minutos. Após este tratamento, os toletes foram germinados em bandejas contendo vermiculita previamente esterilizada (120°C, 1 atm, durante 20 minutos) e regada com solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950) em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas (lâmpadas fluorescentes Philips luz do dia TL 20W/54RS e Sylvania Gro-Lux F20/GRO/U).

Após 15 - 20 dias, as plantas foram colhidas e as folhas retiradas e descartadas. A parte aérea foi cortada em segmentos (explantes) de 5 cm de comprimento, permanecendo em água corrente durante 3 a 4 horas antes de serem esterilizados e inoculados.

A esterilização dos segmentos foi realizada com solução comercial de hipoclorito de sódio ("Q.Boa" diluída a 25%) com a adição de 5 - 6 gotas/l de detergente (Extran MAO 2 neutro), preparado com água destilada estéril. O material foi colocado em frascos cônicos e estes foram mantidos em agitação durante 20 minutos, em seguida os explantes foram enxaguados 3 vezes com água destilada e deionizada estéril. Cada um deles foi dividido em segmentos de 1 - 2 cm de comprimento (explantes) e inoculados individualmente, em vidros tipo "French square" contendo 10 ml de meio condicionador (meio MC) para formação de calos.

O meio condicionador é formado pelos sais do meio básico de MHURASHIGE & SKOOG (1962), acrescido de 20 g de sacarose, 100 mg de inositol, 60 mg de arginina, 3 mg de 2,4-D, 0,1 mg de tiamina, 0,5 mg de piridoxina, 0,5 mg de ácido nicotínico, 2 mg de glicina, e 8 g de bacto-agar (DIFCO) por litro de meio de cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com solução de KOH 1N.

Os explantes foram incubados no escuro a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e após 3 - 4 semanas os calos produzidos nas extremidades

dos explantes foram separados e reinoculados em meio MC fresco. As culturas de calos foram mantidas sob fotoperíodo de 12 h/12 h (claro/escuro) em sala de crescimento a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

3.1.2. Regeneração de plantas a partir de calos

Porções de calos foram transferidos para frascos contendo 10 ml de meio de cultura para regeneração de plantas. Foram utilizados 2 tipos de meio para regeneração de plantas, os meios MP e MS, com composição apresentada na Tabela 1.

Os frascos permaneceram em sala de crescimento, sob luz fotoperíodo de 12 h/12 h (claro/escuro) em sala de crescimento a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

3.1.3. Obtenção e cultivo de suspensões celulares

Culturas novas de calos cultivados em meio MC (após 2 - 3 meses da data de inoculação do explante) foram utilizadas para iniciar suspensões celulares. Porções de calos de aspecto friável e translúcido foram separadas daquelas de aspecto não friável, e mais opaco.

Inoculou-se cerca de 1 g de massa fresca de calos, macerados com a ajuda de estiletes, em 25 ml de meio de cultura líquido MC (Tabela 2).

Tabela 1. Composição dos meios de cultura de regeneração de plantas em cana-de-açúcar.

Componente	Meio MP	Meio MS
*Macronutrientes (mg/l)		
NH ₄ NO ₃	1650	1650
KNO ₃	1900	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	370
KH ₂ . PO ₄	170	170
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
FeSO ₄ . 4H ₂ O	27,8	27,8
*Micronutrientes (mg/l)		
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	22,3
ZnSO ₄ . 4H ₂ O	8,6	8,6
KI	0,83	0,83
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025	0,025
.Vitaminas (mg/l)		
Inositol	100	100
Ácido nicotínico	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5
Tiamina - HCl	0,1	0,1
Glicina	2,0	2,0
.Reguladores (mg/l)		
ANA	1	-
Cinetina	1	-
.Aditivos		
água de côco (ml/l)	100	-
caseína hidrolisada (mg/l)	400	-
sacarose (g/l)	20	20
bacto-agar (Difco) (g/l)	8	8
pH	5,8	5,8

* Segundo MURASHIGE & SKOOG (1962).

Os frascos cônicos contendo estes meios foram colocados em agitador rotatório à 120 rpm, em sala de crescimento, à $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h/12 h (claro/escuro), sob luz difusa.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura de calos e suspensões celulares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79).

Componente	Meios		
	MC	MC 0,5	M Cas
1) Macronutrientes	MS*	MS	MS
2) Micronutrientes	MS	MS	MS
3) Vitaminas (mg/l)			
Inositol	100	100	100
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5	0,5
Tiamina - HCl	0,1	0,1	0,1
Glicina	2,0	2,0	2,0
4) Reguladores (mg/l)			
2,4-D	3	0,5	3
5) Aditivos			
água de côco (ml/l)	100	100	50
Caseína hidrolisada (mg/l)	-	-	500
Arginina (mg/l)	60	60	60
Sacarose (g/l)	20	20	20
pH	5,8	5,8	5,8

Obs: adicionou-se 8 g de Bacto-agar (Difco)/litro aos meios sólidos

* Segundo MURASHIGE & SKOOG (1962)

Após 5 dias acrescentou-se 25 ml de meio líquido fresco, e depois de uma semana, volumes de 25 ml contendo pequenos agregados celulares e células dispersas foram transfe

ridos para frascos contendo 25 ml de meio líquido fresco a cada 6 - 7 dias. Decorridas 4 - 6 transferências (1 - 1,5 meses), as suspensões foram filtradas através de peneiras de metal de malhas com tamanho de poro de 1 mm e 0,5 mm, sucessivamente. Cinquenta mililitros de suspensão filtrada foram adicionados a frascos cônicos de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura fresco. A manutenção das suspensões que continuavam crescendo foi realizada através de transferências a cada 8 - 10 dias.

3.1.4. Determinação de curvas de crescimento de suspensões celulares

Para a determinação de curvas de crescimento foram selecionadas duas suspensões celulares (*Saccharum* spp. var. NA 56-79) que apresentavam rápido crescimento em meio MC e constituídas de pequenos aglomerados celulares. Estas suspensões, denominadas de NA₁ e NA₂, tinham sido iniciadas há 8 meses e mantidas com transferências a intervalos de 8 - 10 dias, na proporção de 50 ml de inóculo para 50 ml de meio MC líquido, em frascos cônicos de 250 ml.

Além das suspensões da variedade NA 56-79, utilizou-se uma terceira, da variedade H-50-7209, cedida pelo Dr. A. Maretzki (Hawaiian Sugar Planters' Association). Esta suspensão, denominada H, foi cultivada em meio YE (Tabela 3) e

transferida a cada 7 dias, na proporção de 10 ml de inóculo para 100 ml de meio YE fresco em frascos cônicos de 250 ml.

Tabela 3. Composição do meio de cultura da suspensão H (meio YE)

Componente	Concentração (mg/l)
Macro e Micronutrientes	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	176
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	200
Na ₂ SO ₄	200
KNO ₃	80
KCl	65
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	16,5
KI	0,8
MnSO ₄ . H ₂ O	4,5
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,5
FeSO ₄ . 4H ₂ O	2,7
Na ₂ EDTA	3,7
Vitaminas	
Piridoxina - HCl	0,02
Biotina	0,001
Tiamina - HCl	0,003
Ácido nicotínico	0,014
Riboflavina	0,020
Reguladores	
2,4-D	2
Aditivos	
Extrato de levedura (Difco)	1000
Arginina	60
Sacarose	20000
pH	5,5

A avaliação do crescimento destas suspensões celulares foi realizada através de curvas de crescimento com base em dados de massa de matéria seca.

Para a determinação da massa de matéria celular seca, 2 amostras de 5 ml de suspensão foram coletadas em filtros "miracloth", previamente tarados, e então, colocados para secar em estufa à 115°C durante 2 horas. As amostras foram pesadas após permanecerem durante 1 hora em dessecador, em presença de sílica-gel. A massa de matéria celular seca foi determinada por subtração do peso do filtro "miracloth".

Para a determinação das curvas de crescimento, as suspensões celulares foram preparadas da seguinte maneira:

- Os três tipos de suspensões celulares, com 9 dias após a data da última transferência, foram filtradas através de peneiras metálicas de malhas com tamanho de poro 1 mm e 0,5 mm, sucessivamente. Determinou-se a massa de matéria seca (método já descrito) e padronizou-se as suspensões de modo que todas elas possuíssem 0,5 mg de massa celular seca/ml de suspensão. O ajuste da densidade celular inicial, com base em massa de matéria seca, foi realizado de tal forma que fossem mantidas as proporções de volume de meio condicionado de inóculo para volume de meio fresco, de 1:3 para a suspensão H e de 1:1 para as suspensões NA_1 e NA_2 .

As suspensões celulares padronizadas foram distribuídas em alíquotas de 5 ml em vidros de 10 ml, incubadas à 120 rpm em agitador rotatório na sala de crescimento com frequência de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Foram coletadas 2 amostras de frascos com 5 ml de suspensão aos 0, 2, 6, 9, 12, 15, 19 e 23 dias após a inoculação das suspensões preparadas, e realizadas as determinações de massa de matéria seca.

3.2. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO COMO FONTE DE PROTOPLASTOS

3.2.1. Folhas

3.2.1.1. Folhas de plantas cultivadas "in vitro"

Folhas "adultas" de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) cultivadas seja "in vitro", seja em vermiculita (sala de crescimento) foram testadas quanto a sua capacidade de liberação de protoplastos em diferentes tratamentos enzimáticos.

Plantas de cana-de-açúcar foram regeneradas a partir de calos de explantes foliares e cultivadas "in vitro" em meios MP ou MS (como já foi descrito no item 3.1.2) até atingirem uma altura de 6 - 8 cm de comprimento (Figura 1).

Os frascos com as plantas foram mantidos no escuro (24 - 36 horas) antes do isolamento dos protoplastos.

Figura 1. Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 52-79).

3.2.1.2. Folhas de plantas cultivadas em sala de crescimento

Toletes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 52-79) foram colocados para germinar de acordo com a metodologia descrita no item 3.1.1. Plantas com 20 - 30 cm de altura forneceram o material para a digestão em diferentes soluções enzimáticas. A Figura 2 mostra a posição dos 2 tipos de

material testados: a) folhas bem jovens, enroladas, e próximas ao meristema apical (tecido foliar "jovem") e b) lâminas foliares expandidas (tecido foliar "adulto").

Figura 2. Posição das folhas de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) cultivadas em sala de crescimento, utilizadas como fonte de protoplastos.

Antes do isolamento, as plantas permaneceram no escuro durante 24 - 36 horas.

3.2.1.3. Folhas de plantas de campo com pré-cultura "in vitro"

Folhas jovens, enroladas, foram cortadas à altura do último nó abaixo do ápice de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA 56-79), com 4 meses de idade mantidas a campo, para serem inoculadas em meio de cultura sólido. Neste caso, o objetivo foi estudar o efeito do tempo de pré-cultura das folhas "in vitro" sobre a liberação de protoplastos e sobre a oxidação de fenóis.

Os segmentos de folhas enroladas (25 - 30 cm de comprimento) permaneceram em solução de "Q.Boa" (diluída a 25%) durante 20 minutos e em seguida, em capela de fluxo laminar, foram retiradas as bainhas das folhas mais externas. O segmento de 4 cm de comprimento (acima do meristema apical) contendo 4 - 5 folhas enroladas foi dividido em 2 segmentos e inoculadas individualmente em frascos contendo 10 ml do meio MC 0,5 sólido (Tabela 2).

Os frascos foram incubados no escuro à temperatura de 28°C.

3.2.2. Calos de explantes foliares

Em cana-de-açúcar, os calos originados de ex-

plantas foliares, após 1 - 2 meses de cultivo em meio MC sólido, apresentaram setores com aspecto mais translúcido e de consistência mais friável, e setores com coloração mais opaca e consistência menos friável. Estes 2 tipos de calos foram separados e utilizados nos testes de isolamento de protoplastos (Figura 3).

Figura 3. Calo friável (esquerda) e calo não friável (direita) utilizados como fonte de protoplastos.

3.2.3. Suspensões celulares

Foram testadas as mesmas suspensões celulares de cana-de-açúcar (NA_1 , NA_2 e H) utilizadas para determinação das curvas de crescimento descritas no item 3.1.3. No caso da suspensão H o isolamento de protoplastos foi efetuado 3 - 4 dias após sua última transferência para meio de cultura fresco. Por sua vez, as suspensões NA_1 e NA_2 foram utilizadas 4 - 6 dias após sua última transferência.

Em relação à suspensão H, além de diferentes misturas enzimáticas testadas, também foi avaliado o efeito da fase de crescimento das células sobre a produção de protoplastos através do isolamento 4 dias e 10 dias após a data da última transferência.

3.3. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

3.3.1. Preparo das soluções enzimáticas

Todas as misturas de enzimas testadas foram dissolvidas em solução denominada SP, que continha 1,3 mM de MES, 10 mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e manitol (0,4 ou 0,6 M). Esta solução, contendo as enzimas dissolvidas, foi centrifugada durante 10 minutos para sedimentação de resíduos não dissolvidos. Ajustou-se, então, o pH do sobrendante para 5,4.

A esterilização das soluções enzimáticas foi realizada em filtro milipore (tamanho de poro = 0,22 μm) na câmara de fluxo laminar.

3.3.2. Misturas enzimáticas testadas

3.3.2.1. Folhas

Foram testadas as seguintes misturas enzimáticas para a digestão do tecido foliar:

SF₁: mistura purificada de Driselase,
 Cellulysin e Rhozyme HP 150*..... 0,25%
 Pectolyase..... 0,05%

SF₂: Cellulase Onozuka R-10..... 4%
 Macerozyme 3%

* Mistura purificada através do seguinte processo: 9 g de Cellulysin, 9 g de Driselase e 2,25 g de Rhozyme HP 150 foram dissolvidas em 50 ml de água destilada. Após centrifugação à 10.000 rpm, o sobrenadante foi filtrado em coluna Sephadex G 50 (6 x 40 cm).

3.3.2.2. Calos e suspensões celulares

As seguintes misturas enzimáticas foram testadas para o isolamento de protoplastos de suspensões celulares e calos:

SS₁: Driselase..... 2%
 Cellulysin..... 2%
 Rhozyme HP 150 0,5%

SS ₂ : Driselase	2%
Cellulysin	2%
Rhozyme HP 150	0,5%
Pectolyase Y 23	0,05%
SS ₃ : Cellulase Onozuka R-10	4%
Macerozyme	3%
SS ₄ : Driselase	2%
Macerozyme	2%
Hemicellulase	1%
Pectolyase Y 23	0,05%
SS ₅ : Cellulase tm macerace (Calcobiochem).....	5%
Pectinase purificada (Sigma)	1%

Estas misturas foram dissolvidas em solução SP (item 3.3.1) contendo 0,4 M de manitol.

A Tabela 4 apresenta a procedência das enzimas utilizadas.

Tabela 4. Procedência das enzimas empregadas.

Enzima	Fornecedor
1) Celulases e hemicelulases	
. Cellulase R 10	Kinki Yakult, Nishinomiya, Japão
. Cellulysin	Calbiochem, La Jolla, Calif. USA
. Driselase	Kyowa Hakko Kogyo Co, Tokio, Japão
. Hemicellulase	Sigma Chemical Co, St. Louis, USA
. Rhozyme HP 150	Rohm and Haas Co, Canadá Ltd.
. Macerace tm Cellulase	Calbiochem, La Jolla, Calif. USA
2) Pectinases	
. Macerozyme	Kinki Yakult, Nishinomiya, Japão
. Pectinase purificada	Sigma Chemical Co, St. Louis, USA
. Pectolyase Y 23	Seishin Pharmaceutical Co., Ltd Japão

3.4. PREPARO DO MATERIAL PARA A DIGESTÃO ENZIMÁTICA

3.4.1. Folhas

3.4.1.1. Folhas de plantas cultivadas "in vitro"

Em câmara de fluxo laminar, as lâminas foliares foram cortadas transversalmente em segmentos de 1 - 2 mm e adicionadas às soluções enzimáticas SF₁ e SF₂ (ver item 3.3.2.1). Foram inoculados aproximadamente 250 mg de massa fresca do material em 5 ml de solução enzimática contida em frascos de 10 ml.

3.4.1.2. Folhas de plantas cultivadas em sala de crescimento

As lâminas foliares e segmentos de folhas enroladas (Figura 2) de plantas cultivadas em sala de crescimento foram coletadas e lavadas com água destilada. As lâminas foliares foram divididas em segmentos de 3 - 4 cm de comprimento.

As operações seguintes foram realizadas em câmara de fluxo laminar. O material foi esterilizado com solução de "Q Boa" diluída a 20% em água destilada esterilizada, contendo algumas gotas/l de detergente neutro (Extran MAO 2 neutro), durante 15 minutos. Em seguida, foi lavado 5 vezes com água destilada esterilizada.

Sobre papel de filtro as lâminas foliares e os segmentos de folhas enroladas foram cortados transversalmente,

em tiras de 1 - 2 mm de espessura. Os segmentos tiveram suas bainhas externas descartadas.

O material cortado foi inoculado imediatamente nas soluções enzimáticas SF_1 e SF_2 (item 3.3.2.1) na proporção de 250 mg de massa de matéria fresca/5 ml de solução enzimática.

3.4.1.3. Folhas de plantas de campo com pré-cultura "in vitro"

Os segmentos cultivados em meio MC 0,5 (item 3.2.1.3) com 4 e 8 dias após a data de inoculação foram divididos em pequenos pedaços de 1 - 2 mm de espessura e incubados nas soluções enzimáticas SF_1 e SF_2 (250 mg de massa de matéria fresca/5 ml de solução enzimática).

3.4.2. Calos

Calos de explantes foliares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79), cultivados durante 2 meses (após a data de inoculação do explante) em meio MC, foram separados em porções friáveis e não friáveis. As porções de calos friáveis foram reinoculados em meio MC e as de calos não friáveis, em meio MC 0,5. Após 2 semanas em cultura, estes 2 tipos de calos foram cortados em pequenas fatias e inoculadas em 5 ml de cada uma das soluções enzimáticas SS_1 , SS_2 , SS_3 , SS_4 , SS_5 , SF_1 e SF_2 . Inoculou-se 200 - 250 mg de massa de matéria fresca/5 ml de solução enzimática.

3.4.3. Suspensões

As suspensões NA_1 , NA_2 e H, antes de serem coletadas em peneiras de malha de 35 μm , foram filtradas através de peneira de malha de 500 μm para separar os agregados celulares muito grandes. Inoculou-se aproximadamente 60 mg de massa de matéria fresca para cada 5 ml de solução enzimática.

3.5. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

Todos os tipos de tecidos e células inoculados nas diversas soluções enzimáticas foram incubadas no escuro, à temperatura de 28°C, sem agitação.

3.6. AVALIAÇÃO DOS TESTES DE ISOLAMENTO

3.6.1. Rendimento

A eficiência da digestão dos diferentes tecidos e células de cana-de-açúcar pelas combinações enzimáticas testadas foi avaliada através de contagens do número de protoplastos obtidos. Essa contagem foi realizada com 2 amostras de suspensões de protoplastos (5 ml) filtradas através de peneira de nylon (malha com tamanho de poro de 35 μm). Para cada amostra fez-se uma contagem de 8 campos/câmara de Neubauer, sendo obtida uma média do número de protoplastos para as 2 amostras.

Além do número de protoplastos, também foram feitas observações sobre o estado e a aparência dos protoplastos, a presença de cloroplastos, fragmentos de feixes vasculares e células, contaminação microbiana e células não digeridas.

A coleta e contagem dos protoplastos liberados foram realizadas a intervalos de tempo que variaram de 1 a 24 horas após a inoculação do material na solução enzimática.

3.6.2. Observação de fusões espontâneas

Utilizando-se a metodologia descrita por OHYAMA (1982), protoplastos de mesofilo de plantas cultivadas "in vitro" e de suspensão celulares foram corados para visualização dos núcleos.

O propósito deste procedimento foi verificar a ocorrência de fusões espontâneas durante o isolamento.

3.7. PURIFICAÇÃO DOS PROTOPLASTOS

Suspensões de protoplastos isolados de folhas ou de células em suspensão foram filtradas por peneiras de malha de 35 μ m para reter os debris celulares maiores.

Volumes de 6 - 8 ml da suspensão filtrada foram centrifugados em tubos cônicos de centrífuga (15 ml) em centrífuga da DAMON/IEC Division (Modelo HS-N). Utilizou-se a velo-

cidade de 250 rpm para protoplastos de folhas e de 500 rpm para protoplastos de células em suspensão durante um período de 5 minutos para ambos.

Os protoplastos concentrados no terço inferior do tubo de centrífuga foram coletados para testar 2 métodos de purificação:

- a) centrifugação com solução de sacarose (21%)
- b) centrifugação com solução de Percoll (20%) e manitol (0,25 M)

Volumes de 3 ml de suspensão concentrada de protoplastos foram centrifugados com 6 ml de solução de sacarose ou de Percoll à 250 rpm durante 5 e 10 minutos.

3.8. CULTIVO DOS PROTOPLASTOS

3.8.1. Protoplastos de folhas

3.8.1.1. Obtenção de protoplastos

Os protoplastos foram isolados de lâminas foliares de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) cultivadas em meio MP (item 3.1.2), após 15 dias da última transferência para meio fresco. Inoculou-se cerca de 500 mg de massa de matéria fresca em 20 ml de solução enzimática SF₁.

Realizou-se a coleta dos protoplastos após 3 horas de incubação do material no escuro à 28°C, filtrando-os

através de peneiras de malha de 35 μm . Volumes de 5 ml de suspensão de protoplasto filtrada foram centrifugados em tubos cônicos (15 ml), à 250 rpm durante 5 - 6 minutos (Centrífuga da DAMON/IEC Division, modelo HS-N). O sobrenadante foi descartado e os protoplastos sedimentados foram lavados 2 vezes com 5 ml de meio de cultura líquido, repetindo-se o mesmo procedimento de centrifugação.

Após a última lavagem, a suspensão de protoplastos apresentava pequena contaminação com cloroplastos, protoplastos rompidos e fragmentos de vasos condutores.

3.8.1.2. Meios e métodos de cultura

Foram testados 4 meios de cultura líquidos: MCP₁, MCP₂, MCP₃ e MCP₄ (Tabela 5).

Volumes de 1 ml de suspensão de protoplastos em meio de cultura líquido (após a última centrifugação), contendo $1 - 5 \times 10^4$ protoplastos, foram colocados em células de Conway, como mostra a Figura 4. Também foi adicionada água esterilizada para manutenção da umidade, evitando a evaporação do meio de cultura. As placas de Petri contendo as células de Conway foram seladas com "parafilme" e incubadas no escuro à temperatura de 28°C.

Figura 4. Célula de Conway para cultivo de protoplastos de mesófilo foliar dentro de placa de Petri.

3.8.2. Protoplastos de suspensões

No caso de cultivo de protoplastos de células em suspensão, utilizou-se as suspensões NA_1 e H como fonte de protoplastos por apresentaram melhores resultados.

3.8.2.1. Cultivo de protoplastos da suspensão NA_1

Os protoplastos foram isolados a partir da suspensão celular NA_1 (descrita no item 3.1.4), transferida a cada 7 - 8 dias e com 6 dias após a data da última transferência. A suspensão foi filtrada em peneira de malha de 500 μm

e coletada em peneira de malha de 35 μ m. Inoculou-se cerca de 1,5 g de massa de matéria fresca de células em 30 ml de solução enzimática SS₃ (item 3.3.2.2).

Tabela 5. Composição dos meios testados para o cultivo de protoplastos de mesófilo foliar.

Constituinte	MCP ₁	MCP ₂	MCP ₃	MCP ₄
1) Macro e Micronutrientes	MS*	MS	MS	MS
2) Vitaminas (mg/l)				
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5	0,5	0,5
Tiamina - HCl	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicina	2,0	2,0	2,0	2,0
Inositol	100,0	100,0	100,0	100,0
3) Aditivos				
Caseína hidrolisada (mg/l)	-	500,0	500,0	500,0
Água de côco (%)	10	-	-	10
Sacarose (g/l)	20	20	20	20
Manitol (M)	0,6	0,6	0,6	0,6
4) Reguladores				
2,4-D	3	1	0,2	-
BAP	-	1	0,5	-
ANA	-	-	1,0	-

* Segundo Murashige & Skoog (1962).

Após 24 horas de incubação no escuro, à 28°C, a solução enzimática foi filtrada através de peneira de malha de 35 μ m. A suspensão filtrada, contendo protoplastos isolados e alguns grupos de 2 - 4 protoplastos agregados foi centrifugada em tubos cônicos de 15 ml (Centrífuga DAMON/IEC Division, modelo H5-N) durante 3 - 5 minutos à 500 rpm. O

sobrenadante foi retirado, e aos protoplastos sedimentados adicionou-se 3 ml do meio de cultura de protoplastos contendo 0,4 M de manitol, centrifugando novamente. Da mesma maneira, realizou-se mais uma lavagem e centrifugação.

Meios de cultura: Foram testados 2 meios de cultura líquidos para os protoplastos da suspensão NA_1 :

- . Meio PP_1 , com a mesma composição do meio de cultura da suspensão NA_1 (meio MC) acrescido de 0,4 M de manitol.
- . Meio PP_2 , constituído de 50% de meio de cultura da suspensão NA_1 (meio MC) com 0,8 M de manitol e 50% de meio MC condicionado.

O meio MC "condicionado" foi obtido através de filtração do meio de cultura de uma suspensão NA_1 (6 dias após a última transferência) em filtro milipore (0,45 μ m).

Método de cultivo: A suspensão concentrada de protoplastos foi diluída com meio de cultura líquido, distribuindo-se então, 2 ml de suspensão de protoplastos contendo $1 - 5 \times 10^4$ protoplastos/ml em placas de Petri (4,5cm de diâmetro). Para cada meio, PP_1 e PP_2 , foram inoculadas 2 placas, as quais foram vedadas com parafilm incubadas no escuro, à 28°C.

Após 1 mês de cultura, adicionou-se 1 ml de meio de cultura para protoplasto, sem manitol.

3.8.2.2. Cultivo de protoplastos da suspensão H

Células em suspensão da variedade H 50-7209 (descrita no item 3.1.4), com 4 dias após a data da última transferência, foram filtradas através de peneiras de malha de 500 μm e coletadas em peneiras de malha de 35 μm . As células foram incubadas nas soluções enzimáticas SS_1 , SS_2 e SS_3 (item 3.3.2.2) na proporção de 250 mg de massa de matéria fresca de células para 20 ml de solução enzimática. O material foi incubado no escuro à 28°C durante 5 horas (solução SS_1 e SS_2), ou 8 horas (solução SS_3).

Após a digestão enzimática, os protoplastos foram coletados através de filtração em peneira de malha de 35 μm e em seguida a suspensão filtrada foi centrifugada à 500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e aos protoplastos sedimentados adicionou-se 5 ml de meio de cultura, centrifugando-se novamente (500 rpm, 5 minutos). Esta operação foi repetida mais uma vez.

Meio de cultura: Para o cultivo destes protoplastos utilizou-se o meio de cultura da suspensão H (meio YE, Tabela 3), porém acrescido de 0,4 M de manitol (meio YEP).

Métodos de cultura: Os protoplastos da suspensão H foram cultivados em meio de cultura líquido formando uma camada delgada em placa de Petri ou em discos de agarose.

No primeiro método de cultura, 2 ml de cada

suspensão de protoplastos, oriunda das soluções enzimáticas SS_1 , SS_2 e SS_3 , foram inoculados em placas de Petri com 5 cm de diâmetro. A suspensão de protoplastos em meio de cultura líquido continha cerca de $4 - 5 \times 10^4$ protoplastos/ml.

No método de cultura em discos de agarose, 1 volume de suspensão de protoplastos concentrada foi homogeneizada com 1 volume de meio de cultura contendo 0,8% de agarose à temperatura de 40°C . A mistura continha cerca de $4 - 5 \times 10^4$ protoplastos/ml. Gotas de 30 - 50 μl da mistura foram distribuídas nas placas de Petri (5 cm de diâmetro) e após seu resfriamento, acondicionou-se 1,5 ml de meio de cultura líquido. Todas as placas foram seladas com "parafilm" e incubadas no escuro à 28°C .

Preparou-se 2 placas com meio líquido e com discos de agarose para os protoplastos de cada uma das soluções enzimáticas testadas.

3.8.3. Avaliação

Os protoplastos em cultura foram observados através de microscópio invertido, acompanhando-se desta forma, o seu comportamento e evitando possibilidades de contaminação.

3.9. FUSÃO DE PROTOPLASTOS COM PEG

Foi testada uma metodologia de fusão de proto-

plastos utilizando PEG (Polietileno Glicol) com agente fusogênico, baseada em EVANS (1983b).

Protoplastos de células de mesófilo foliar e protoplastos de suspensão foram utilizados nos testes de fusão.

3.9.1. Obtenção dos protoplastos

3.9.1.1. Protoplastos de células de mesófilo foliar

Os protoplastos de mesófilo foliar foram obtidos através de digestão enzimática de lâminas foliares de plantas de cana-de-açúcar (var. NA 56-79) cultivadas em meio MP (Tabela 1). Após um período de 3 horas de digestão em solução enzimática SF₁ (item 3.3.2.1), os protoplastos foram coletados e lavados em meio MCP₁ (0,6 M) segundo a metodologia descrita no item 3.8.1.1.

Os protoplastos de mesófilo foliar foram armazenados na geladeira, no máximo, durante 3 horas.

3.9.1.2. Protoplastos de células em suspensão

Protoplastos isolados das células das suspensões NA₁ e H foram utilizados nos testes de fusão com protoplastos de mesófilo.

Suspensões H e NA₁ com 3 dias após a data da última transferência foram incubadas em solução enzimática SS₁ e SS₃

respectivamente. Os protoplastos da suspensão H foram filtrados após 3 horas de digestão e os da suspensão NA₁, após 8 horas, em peneiras de malha de 35 μ m. Os protoplastos foram sedimentados em tubos cônicos com centrifugação à 500 rpm durante 5 minutos e lavados 2 vezes com meio MCP₁ (500 rpm, 5 minutos).

A suspensão de protoplastos concentrada, quando não utilizada imediatamente nos testes de fusão, foi armazenada na geladeira durante 3 horas, no máximo.

3.9.2. Procedimentos

As seguintes soluções foram utilizadas para a fusão dos protoplastos:

1) Solução de fusão: (para 50 ml de solução)

Glucose.....	1,8 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	73,5 mg
KH ₂ PO ₄	5 mg
PEG 4000	25 g
pH	5,8 (com KOH)

2) Solução de diluição 1: (para 100 ml de solução)

Glicina	750 mg
Glucose	5,4 g
pH.....	10,5 (ajuste com pastilhas de NaOH)

3) Solução de diluição 2: (para 100 ml de solução)

CaCl₂ . 2H₂O 1,47 g

Glucose 5,4 g

pH (não há necessidade de correção)

Protoplastos de mesófilo e suspensão foram homogenizados de maneira a se obter uma mistura com proporções iguais de cada tipo de protoplasto e com concentração de 10^5 protoplastos/ml.

Os procedimentos para a fusão de protoplastos foi a seguinte:

- Duas gotas da mistura de protoplastos foram colocadas sobre uma lâmina de microscópio.
- Repouso durante 5 minutos para sedimentação dos protoplastos.
- Adição de 3 gotas da solução de PEG.
- Repouso durante 15 minutos.
- Enquanto os protoplastos estiverem na solução de PEG, as soluções de diluição 1 e 2 (7 ml de cada) foram misturadas, tomando-se o cuidado para evitar a precipitação dos íons Ca⁺⁺.
- Adição de 6 gotas da mistura diluente aos protoplastos, cuidadosamente.
- Repouso durante 10 minutos.

- Adição de 6 gotas de meio de cultura de protoplastos para suspensão (PP₁ ou YEP).
- Repouso durante 5 minutos e remoção do excesso de líquido.

Observou-se ao microscópio as várias etapas da fusão.

Foi realizada a fusão de protoplastos de mesófilo foliar de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79), cultivadas "in vitro", com protoplastos de células de suspensão (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79 ou H 50-7209).

Os produtos de fusão não foram cultivados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS

4.1.1. Protoplastos de folhas

4.1.1.1. Protoplastos de folhas "in vitro" x protoplastos de folhas "in vivo"

Um dos fatores que afetam a liberação de protoplastos viáveis é a condição fisiológica do tecido doador (EVANS, 1983b). Daí uma das razões de se utilizar plantas cultivadas em ambientes mais controlados, seja em casa de vegetação, sala de crescimento ou mesmo em condições assépticas, por permitirem um maior controle das condições de crescimento do material.

Neste trabalho, foram testadas como fontes de protoplastos folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) com diferentes idades, cultivadas em vermiculita em sala de crescimento, ou "in vitro" em diferentes meios de cultura. A produção de protoplastos foi avaliada através de contagens em hemacitômetro, sendo que os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito de diferentes fontes de tecido foliar na liberação de protoplastos de cana-de-açúcar.

Material vegetal	Condições de cultivo	Solução enzimática	Tempo de digestão	Densidade (Nº prtos/ml)	Estado e aparência	Observações
1) Tecido foliar "adulto"	Meio MP "in vitro"	SF ₁	4 horas	10 x 10 ⁴	(++)	. protoplastos com tamanho semelhante . alguns protoplastos vacuolados . presença de cloroplastos diferenciados
		SF ₂	10 horas	< 10 ⁴	(+)	. idem anterior
2) Tecido foliar "adulto"	Meio MS "in vitro"	SF ₁	4 horas	5 x 10 ⁴	(++)	. idem anterior
		SF ₂	10 horas	< 10 ⁴ **	(+)	. idem anterior
3) Tecido foliar "adulto"	Vermiculita sala de crescimento	SF ₁	24 horas	N*	-	-
		SF ₂	24 horas	N*	-	-
4) Tecido foliar "jovem"	vermiculita sala de crescimento	SF ₁	4 horas	6,02 x 10 ⁵	(+)	. presença de cloroplastos não diferenciados . protoplastos de vários tamanhos, os maiores vacuolados.
		SF ₂	4 horas	1,5 x 10 ⁵	(++)	. idem anterior

(+) alguns protoplastos com forma irregular

(++) forma esférica, estado perfeito

N* não foi observada a liberação de protoplastos

** (<10⁴) não foi possível a contagem em hemacitômetro, mas observou-se a liberação de alguns protoplastos.

SF₁ - Solução enzimática contendo 0,25% de mistura purificada de Driselase, Cellulysin e Rhozyme HP 150 e 0,05% de Pectolyase.

SF₂ - Solução enzimática contendo Cellulase Onozuka R-10 (4%) e Macerozyme (3%).

A idade da folha é um fator importante para a liberação de protoplastos e no caso de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em sala de crescimento não foi possível obter a liberação de protoplastos a partir de folhas adultas. CHEN & LIU (1974) e EVANS *et alii* (1980) também obtiveram liberação de protoplastos de ápices foliares bem jovens de plantas de cana-de-açúcar, não conseguindo a produção de protoplastos a partir de folhas adultas. Resultado similar foi obtido por DEKA & SEN (1976) quando utilizaram folhas expandidas de plantas de arroz, obtendo somente bons resultados de liberação de protoplastos com bainhas foliares bem tenras de plantas com 3 - 5 dias de idade.

No entanto, plantas de cana-de-açúcar cultivadas "in vitro" podem fornecer folhas adultas capazes de liberar protoplastos, como pôde ser observado neste trabalho. São várias as vantagens da utilização de culturas "in vitro". Além de propiciar um ambiente mais controlado para o crescimento das plantas, o espaço necessário para sua manutenção é reduzido, garante o crescimento juvenil e tenro, elimina os ciclos de crescimento anuais e não é necessária a desinfestação do material (ERIKSSON, 1985).

SMITH & McCOWN (1983) também obtiveram maiores produções de protoplastos e com maior viabilidade a partir de culturas de plantas de *Betula* e *Rhododendron* "in vitro", quando comparadas às produções de protoplastos obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação.

A própria constituição do meio de cultura também afetou a liberação de protoplastos, havendo maior produção a partir de plantas cultivadas em meio MP. Isto se deve provavelmente ao fato deste meio propiciar o desenvolvimento de folhas mais tenras, como foi observado durante o manuseio do material.

Os tipos de enzimas empregadas afetam tanto a produção e viabilidade dos protoplastos, como também o tempo necessário para sua liberação. Como mostra a Tabela 6, a solução enzimática SF₁, após 4 horas de incubação, libera quantidades apreciáveis de protoplastos em todos os materiais utilizados, com exceção das folhas adultas e plantas cultivadas em vermiculita. Esta solução enzimática, que contém as enzimas Driselase, Cellulysin, Rhozyme HP 150 e Pectolyase mostrou-se mais eficaz do que a solução SF₂ que contém Cellulase e Macerozyme e que necessita de períodos mais longos de incubação do material para iniciar a liberação de protoplastos.

Os protoplastos de mesofilo normalmente apresentam-se morfolologicamente bem uniformes (ERIKSSON, 1985). Neste trabalho observou-se bastante uniformidade no tamanho e morfologia dos protoplastos isolados de folhas adultas de plantas de cana-de-açúcar cultivadas "in vitro". Uma das características marcantes deste tipo de protoplasto é a presença de cloroplastos bem diferenciados (Figura 5 e 6). Já, protoplastos isolados de folhas bem jovens (Figura 7) apresentam

uma maior variação no tamanho e na morfologia, podendo ser observados desde protoplastos muito pequenos, com citoplasma denso, não vacuolados e sem cloroplastos diferenciados, provavelmente oriundos de células meristemáticas e também protoplastos maiores, mais vacuolados, às vezes com alguns plastídeos em início de diferenciação.

Figura 5. Tecido foliar adulto de plantas cultivadas "in vitro" liberando protoplastos.

Figura 6. Protoplastos isolados de folhas adultas de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 52-79) cultivadas "in vitro".

Figura 7. Protoplastos isolados de folhas jovens de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) cultivadas em sala de crescimento.

Outra diferença em relação aos 2 tipos de materiais testados, folhas jovens de plantas cultivadas em vermiculita e folhas adultas de plantas "in vitro", é que no primeiro ocorre intensa oxidação de fenóis, que inclusive são excretados na solução enzimática após o período de digestão (4 horas).

4.1.1.2. Efeito de pré-cultura das folhas "in vitro"

Um dos problemas da utilização de material foliar de plantas cultivadas em vermiculita, em condições controladas ou do próprio campo, é a possibilidade de contaminação, apesar dos tratamentos de esterilização. Tem sido observado que, principalmente para o material de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) o problema de contaminação bacteriana é grave, provavelmente por ser de origem endógena. Esta foi uma das razões porque foi testada a pré-cultura de folhas retiradas de plantas cultivadas no campo.

Além de possibilitar a detecção de material contaminado, a pré-cultura é recomendada alguma vezes para aumentar a atividade mitótica das células foliar e estimular a divisão dos protoplastos após o isolamento (ERIKSSON, 1985).

Neste teste foi utilizado o meio de indução de

calos (MC 0,5) para cultivar os ápices foliares jovens de plantas de cana-de-açúcar. Normalmente o meio indutor de calos é o mais usado durante este período de pré-cultura (ENGLER & GROGAN, 1983).

Através da Figura 8, verifica-se as produções de protoplastos para a solução enzimática SF_1 como para o SF_2 , foram maiores quando se utilizou ápices foliares com 4 dias de cultivo. Pode-se perceber também que houve diferenças na liberação de protoplastos causadas pelo tipo de mistura enzimática utilizada (solução enzimática SF_1 ou SF_2) durante o decorrer do período de incubação do material. A ação da solução enzimática SF_1 sobre o material foliar com 4 dias de cultura foi mais rápida, atingindo a produção máxima logo após 2 horas de incubação.

Por sua vez, a produção de protoplastos pela solução enzimática SF_2 , de início pequena, aumenta conderavelmente após 6 horas de incubação, mostrando-se, portanto, bastante eficiente. Observa-se na Figura 7 que, utilizando-se 4 dias de cultivo, a solução SF_2 é mais lenta na sua ação de liberação de protoplastos (atinge o máximo após 6 horas de incubação) do que a solução SF_1 (atinge o máximo de liberação após 2 horas).

Figura 8. Efeito de diferentes períodos de pré-cultura (4 e 8 dias) de segmentos de folhas jovens em meio MC 0,5 sobre a liberação de protoplastos.

A maior eficiência da solução SF_1 foi comprovada quando se observou a liberação de protoplastos com material de 8 dias de cultivo "in vitro" (Figura 8). Observa-se que a produção de protoplastos determinada pela solução SF_1 aumenta com o tempo de incubação atingindo o máximo após 6 horas. O mesmo ocorre com a solução SF_2 , porém com intensidade bem menor.

Contudo, em ambos os casos (4 ou 8 dias de cultivo) ocorre uma diminuição de protoplastos intactos no meio de incubação SF_1 , observando-se ruptura dos mesmos e aparecimento de debris celulares, o que acontece com maior intensidade após 8 horas de incubação. Entretanto, a solução SF_2 mantém a sua atividade, a qual aumenta como no material com 4 dias de cultivo, ou permanece constante como no material com 8 dias de cultivo.

Ao que tudo indica, o período de pré-cultura, é importante para a eficiência de produção dos protoplastos. Em períodos mais longos, o tecido foliar estaria em estádios mais avançados de desdiferenciação, o que dificultaria a ação da solução enzimática.

Observou-se também que os protoplastos isolados de ápices foliares com 8 dias de cultivo apresentaram-se mais desuniformes quanto ao tamanho e aparência, detectando-se um maior número de protoplastos vacuolados. ERIKSSON (1985) também observou que o isolamento de protoplastos de folhas

cultivadas não é tão uniforme quanto as de folhas não cultivadas.

4.1.2. Protoplastos de calos de explantes foliares

Calos de cana-de-açúcar, originados de explantes foliares, após 1 - 2 meses de cultivo em meio MC sólido foram separados em 2 tipos: friáveis e não friáveis (nodulares). Os calos friáveis apresentam aspecto mais translúcido, enquanto os calos não friáveis são opacos com estrutura nodular e mais consistentes (Figura 3).

Os calos friáveis produziram uma quantidade de protoplastos muito pequena (produção inferior a 10^3 protoplastos/ml) após 20 horas de digestão, apresentando-se deformados nas soluções SS_1 , SS_2 , SS_5 e SF_1 . Nestas e nas demais soluções enzimáticas observou-se um grande número de células plasmolisadas livres e fragmentos de tecido.

Por sua vez, os calos não friáveis (nodulares) liberaram uma maior quantidade de protoplastos do que os calos friáveis em algumas das soluções enzimáticas testadas (Tabela 7). Maiores rendimentos de produção foram obtidos com a utilização das soluções enzimáticas SF_1 e SF_2 . Isto sugere que parece ser necessária uma osmolaridade mais alta (0,6M) para a liberação de protoplastos em calos não friáveis, pois a solução SF_2 (0,6M) difere da solução SS_3 (0,4M) apenas com relação a este aspecto.

Tabela 7. Efeito de diferentes soluções enzimáticas sobre a liberação de protoplastos a partir de calos não friáveis.

Soluções Enzimáticas	Nº de protoplastos/mL		Estado e aparência	
	Tempo de digestão 8 horas	Tempo de digestão 24 horas	Tempo de digestão 8 horas	Tempo de digestão 24 horas
SS ₁	N	P.R.	-	deformados
SS ₂	C	P.R.	-	deformados
SS ₃	N	P.R.	-	deformados
SS ₄	1,2 x 10 ⁴	P.D.	esféricos, tamanho semelhante	deformados
SS ₅	2,3 x 10 ⁴	P.D.	esféricos, tamanho semelhante	-
SF ₁	9 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴	esféricos, tamanho variado	deformados
SF ₂	P.R.	6,5 x 10 ⁴	esféricos, tamanho variado	tamanho variado, esféricos, pouco deformados

N - não houve liberação de protoplastos, material não digerido

C - liberação de células ou grupos de células livres plasmolisada

P.D. - protoplastos destruídos e fragmentos de tecidos

P.R. - raros protoplastos e células livres plasmolisadas

SS₁ - solução enzimática (0,4M) contendo Driselase (2%), Cellulysin (2%) e Rhozyme HP 150 (0,5%)

SS₂ - solução enzimática (0,4M) contendo Driselase (2%), Cellulysin (2%) Rhozyme HP 150 (0,5%) e Pectolyase Y 23 (0,05%)

SS₃ - solução enzimática (0,4M) contendo Cellulase Onozuka (4%) e Mace-rozyme (3%)

SS₄ - solução enzimática (0,4M) contendo Driselase (2%), Cellulysin (2%) Homicellulase (1%) e Pectolyase Y 23 (0,05%)

SS₅ - solução enzimática (0,4M) contendo Cellulasetm Macerase (5%) e Pictinase purificada(1%)

SF₁ - solução enzimática (0,6M) contendo 0,25% de mistura purificada (Driselase, Cellulysin e Rhozyme HP 150) e 0,05% de Pectoliase Y23

SF₂ - solução enzimática (0,6M) contendo Cellulase Onozuka (4%) e Mace-rozyme (3%).

4.1.3. Protoplastos de suspensões celulares

4.1.3.1. Protoplastos das suspensões NA_1 , NA_2 e H

Outra fonte de protoplastos muito utilizada são as culturas de células em suspensão. Em comparação a órgãos ou tecidos de plantas intactas, as células em suspensão apresentam a vantagem de não necessitarem de pré-tratamento de esterilização e como já estão condicionadas a crescer "in vitro", pode ser menos difícil de se obter divisão nos protoplastos cultivados (EVANS & BRAVO, 1983).

Diferentes suspensões (NA_1 , NA_2 e H) foram comparadas quanto a sua capacidade de liberar protoplastos em 3 tipos de solução enzimática.

A Figura 9 mostra o aspecto dos aglomerados da suspensão H e a Figura 10, os protoplastos isolados a partir de suas células (*Saccharum* spp. c.v. H 50-7209). Por sua vez, protoplastos das células da suspensão NA_1 , semelhantes aos obtidos para a suspensão NA_2 , ambas *Saccharum* spp. c.v. NA 56-79, podem ser observados na Figura 11.

Figura 9. Células da suspensão H (*Saccharum* spp. c.v. H 50 - 7209) utilizadas como fonte de protoplastos.

Figura 10. Protoplastos isolados de células da suspensão H (*Saccharum* spp. c.v. H 50-7209).

Figura 11. Protoplastos isolados de células da suspensão NA_1 (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79).

Os resultados apresentados na Figura 12 permitem observar que ambas as suspensões celulares de *Saccharum* spp. c.v. NA 56-79 (suspensões NA_1 e NA_2) liberaram quantidades semelhantes de protoplastos, porém inferiores às produções obtidas para a suspensão H (*Saccharum* spp. c.v. H 50 - 7209) nas 3 soluções enzimáticas testadas. Isto está de acordo com HEYSER (1984), que obteve diferentes rendimentos de protoplastos para diferentes linhagens de suspensão de *Panicum miliaceum* L. . LARKIN (1982) conseguiu obter suspensões de protoplastos homogêneas somente de 2 culturas de células em suspensão de *Saccharum* spp., provenientes de cultivares diferentes, dentre 6 suspensões testadas.

Figura 12. Produção de protoplastos (número de protoplastos/ml de suspensão de protoplastos filtrada) obtida a partir das suspensões NA₁, NA₂ e H.

* Ver legenda da Tabela 7.

A eficiência de liberação de protoplastos é função da qualidade da suspensão, isto é, culturas "dispersas" com rápida taxa de crescimento são mais eficientes para a produção de protoplastos (POTRYKUS et alii, 1979). Por outro lado, o grau de dispersão da suspensão depende do genótipo da cana-de-açúcar, sendo difícil a cultura de células de culturas que contêm altas concentrações de compostos fenólicos (LIU, 1984).

A análise das curvas de crescimento obtidas para as suspensões NA_1 , NA_2 e H (Figura 13), permite observar que o período necessário para a duplicação de massa celular seca inicial não varia muito para as suspensões H e NA_1 (3,5 e 4 dias, respectivamente). Pode-se observar que apesar de serem obtidas de calos da mesma variedade, as suspensões NA_1 e NA_2 apresentam curvas de crescimento diferentes, sendo esta última de crescimento mais lento.

O tipo de calos que deu origem à suspensão, a frequência das transferências e o meio de cultura podem explicar esta diferença de crescimento entre suspensões da mesma variedade de cana-de-açúcar.

Como não pode ser realizada a determinação do número de células, pode haver alguma diferença mais significativa entre as taxas de crescimento das diferentes suspensões. De toda maneira, existe uma relação direta entre taxa de crescimento da suspensão e produção de protoplastos. Na Figura

Figura 13. Curvas de crescimento das suspensões celulares NA_1 , NA_2 e H.

12 observa-se que a produção de protoplastos decresce em direção à suspensão celular de crescimento mais lento (suspensão NA₂).

Outra justificativa para as maiores produções de protoplastos a partir da suspensão H pode ser atribuída ao fato desta suspensão possuir agregados menores com células mais homogêneas que as demais suspensões. Apesar de terem sido filtradas através de peneiras (malha de 500 µm) as suspensões NA₁ e NA₂ filtradas ainda possuíam aglomerados celulares maiores e mais heterogêneos que os das suspensões H.

Essa observação está de acordo com LIU & LAI (1982) que observaram uma diminuição do rendimento de protoplastos de células em suspensão de *Oryza sativa* L. à medida que se aumentava o tamanho dos agregados celulares.

A quantidade e a qualidade dos protoplastos obtidos para cada suspensão foram modificados pelas diferentes soluções enzimáticas utilizadas. Testes preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que a enzima Cellulase Onozuka R-10 sozinha não foi capaz de liberar protoplastos das suspensões celulares de cana-de-açúcar NA₁, NA₂ e H. Isto discorda dos resultados obtidos por VASIL et alii (1983), que conseguiram obter grandes quantidades de protoplastos somente com a utilização de Cellulase R-10 na digestão de células em suspensão de *Pennisetum purpureum* Schum.

Por sua vez, a mistura de Cellulase R-10 e Macerozyme, apesar de sua ação mais lenta, foi capaz de liberar protoplastos a partir das 3 suspensões (Figura 12). CHEN & LIU (1974), utilizando suspensões celulares de cana-de-açúcar não conseguiram isolar protoplastos somente com Cellulase e Macerozyme.

Com a manipulação da mistura enzimática pode ser possível aumentar a eficiência de liberação de protoplastos, como pôde ser verificado para as suspensões NA_1 e NA_2 se forem comparadas as soluções enzimáticas SS_1 e SS_2 com a solução enzimática SS_3 (que contém somente Cellulase e Macerozyme). No entanto, apesar das misturas enzimáticas SS_1 e SS_2 serem mais eficientes quanto à quantidade de protoplastos liberada, parece haver um efeito prejudicial das mesmas sobre a qualidade destes. Isto foi sugerido pela presença de protoplastos destruídos após períodos mais prolongados de digestão (maior que 8 horas) ou mesmo em períodos mais curtos em que muitos protoplastos não apresentavam forma esférica perfeita.

A solução enzimática constituída por Cellulase R-10 e Macerozyme, embora tivesse uma ação mais lenta, produziu protoplastos com forma esférica perfeita. Assim como VASIL *et alii* (1983) observaram que, para as células de *Pennisetum purpureum* L. as enzimas Driselase e Rhozyme aumentaram substancialmente o número de protoplastos, mas também provocaram alta incidência de fusões espontâneas e lise dos proto-

plastos, acredita-se que o mesmo efeito observado para a solução enzimática SS_1 e SS_2 seja causado por aquelas enzimas presentes nestas soluções.

A enzima Pectolyase Y 23 (solução enzimática SS_2) considerada indispensável à produção de protoplastos de suspensões celulares de cana-de-açúcar em trabalho realizado por GUIDERDONI (1985) não se mostrou benéfica neste trabalho.

Tendo em vista os resultados obtidos, recomenda-se para futuros trabalhos de isolamento de protoplastos de suspensões, a utilização de vários genótipos da espécie a ser estudada, devido a sua importância sobre a qualidade da suspensão, fator crítico para a obtenção de protoplastos.

4.1.3.2. Efeito da fase de crescimento da suspensão

Neste estudo, células da suspensão H coletadas aos 4, 10 e 20 dias após a última transferência representaram, respectivamente, as fases logarítmica, início da fase estacionária ou pós-logarítmica e estacionária (ver curvas de crescimento da suspensão H na Figura 13).

A produção de protoplastos foi reduzida quando se utilizou células na fase estacionária do seu ciclo de crescimento (células coletadas aos 20 dias), sendo isto válido para os 3 tipos de soluções enzimáticas (Figura 14).

Figura 14. Efeito de diferentes fases do crescimento da suspensão celular H (4, 10 e 20 dias) sobre a produção de protoplastos nas soluções enzimáticas SS₁, SS₂ e SS₃.

* Ver legenda da Tabela 7.

No entanto, com relação à células coletadas aos 4 e aos 10 dias de idade, observou-se que o efeito da fase de crescimento sobre a produção de protoplastos dependeu do tipo de solução enzimática testada. Para as soluções enzimáticas SS_2 e SS_3 , praticamente não houve diferenças quanto à produção de protoplastos a partir de células com 4 e 10 dias de idade, o que não ocorreu com a solução enzimática SS_1 . Isto indica que a eficiência de determinada solução enzimática depende da fase de crescimento em que se encontram as células fornecedoras de protoplastos.

Para suspensões celulares de cana-de-açúcar, MARETZKI & NICKELL (1973) verificaram que as células de suspensões liberavam protoplastos com maior facilidade quando eram utilizadas células com duas semanas de idade, quando se encontravam na fase logarítmica tardia ou pós-tardia.

Grande parte dos pesquisadores têm observado que a fase logarítmica do crescimento de uma suspensão representa o melhor estágio para a liberação de protoplastos (UCHIMIYA & MURASHIGE, 1974; CHOUREY & ZURAWSKI, 1981; LIU & LAI, 1982).

Uma das justificativas apresentadas é que na fase logarítmica a cultura é composta por um grande número de células presumivelmente com parede celular mais fina que células mais velhas (UCHIMIYA & MURASHIGE, 1974).

Outro aspecto que deve ser discutido é a presença de protoplastos aglomerados (2 - 4 protoplastos/aglomerado) que parecem estar se "fundindo", e que não se separam mesmo em períodos longos de digestão enzimática (maiores que 24 horas). Neste sentido observou-se nos testes realizados que a solução SS_1 , embora tivesse maior eficiência na produção de protoplastos, apresentou maiores porcentagens de aglomerados de protoplastos (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito da fase de crescimento da suspensão H sobre a presença de aglomerados de protoplastos (após filtração em peneiras de malha de 35 μ m) nas soluções enzimáticas SS_1 , SS_2 e SS_3 .

Solução Enzimática	Nº de horas de digestão	Aglomerados de protoplastos (%)		
		4 dias	10 dias	20 dias
SS_1	4	15,0	21,2	25,0
SS_2	4	8,3	10,3	24,3
SS_3	8	7,4	7,8	4,7

A porcentagem de aglomerados decresceu nas preparações de protoplastos das soluções enzimáticas SS_2 e SS_3 .

Para as soluções SS_1 e SS_2 ocorreu aumento na porcentagem de aglomerados com o envelhecimento da cultura, e também um aumento no número de protoplastos vacuolados. Este último aspecto também foi verificado por UCHIMIYA & MURASHIGE (1974) em suspensões celulares de *Nicotiana tabacum* L.

4.2. CULTURA DOS PROTOPLASTOS

4.2.1. Cultura de protoplastos de folhas

Protoplastos de mesófilo foliar cultivados em meio líquido à concentração de $1 - 5 \times 10^4$ protoplastos/ml não mostraram sinais de divisão celular em todos os meios testados (MCP_1 , MCP_2 , MCP_3 e MCP_4). Parece ser necessária a presença do 2,4-D em meio de cultura, uma vez que se observou que os protoplastos em meio MCP_4 (isento de 2,4-D) degeneravam após 2 - 4 dias do seu isolamento e cultivo.

Os protoplastos cultivados em meio de cultura contendo 2,4-D ainda permaneciam intactos durante um período mais longo (2 - 3 semanas).

CHEN & LIU (1976) também constataram a necessidade da presença de 2,4-D em meio de cultura de protoplastos de folhas jovens de cana-de-açúcar, uma vez que obtiveram uma frequência muito baixa de protoplastos que regeneraram a parede celular em meio ausente de 2,4-D.

De modo geral, os protoplastos de mesófilo foliar de gramíneas são considerados difíceis de se cultivar (VASIL, 1983). Mesmo testando-se várias condições culturais, BRAR et alii (1980) não conseguiram obter divisões celulares em protoplastos de mesófilo foliar de milho. A divisão celular não ocorreu, independentemente da idade da folha, composição do meio ou genótipo usado.

Em trabalhos realizados com cana-de-açúcar, foram cultivados protoplastos de folhas que deram origem à estruturas pluricelulares, porém sem desenvolvimento posterior (LIU & CHEN, 1976; KRISHNAMURTHI, 1976; EVANS *et alii*, 1980).

Neste trabalho foram cultivados protoplastos de células de mesófilo foliar diferenciado (lâmina foliar de folhas "in vitro"), o que poderia explicar o fato de não sofrerem nenhuma divisão celular.

Normalmente, as suspensões de protoplastos de folhas jovens apresentaram muitos "debris" celulares e a centrifugação com solução de sacarose ou de Percoll não foi capaz de purificar adequadamente os protoplastos.

As tentativas de cultivo de protoplastos de folhas jovens não foram bem sucedidas, nem tampouco tiveram continuidade devido à problemas de falta de métodos de purificação adequados e este tipo de protoplastos, contaminação microbiana e oxidação de fenóis.

Os protoplastos de mesófilo foliar jovem talvez fossem os mais interessantes de se cultivar pois os explantes destas folhas jovens são capazes de formar calos, indicando uma maior capacidade de responder às condições de cultura "in vitro"

4.2.2. Cultura de protoplastos de suspensões

4.2.2.1. Protoplastos da suspensão H

Foram obtidos a partir da suspensão H, preparações de protoplastos menos contaminadas com agregados de protoplastos (5%).

Os protoplastos obtidos nas soluções enzimáticas SS₁ e SS₂ não apresentaram aspecto desejado, muitos com forma esférica não perfeita. Após alguns dias em meio de cultura líquida, observou-se alguns protoplastos destruídos. Por sua vez, os protoplastos liberados na solução enzimática SS₃ apresentaram melhor aparência e forma esférica. Muitos protoplastos obtidos nesta solução, quando cultivados após 4 - 5 dias de cultura em meio líquido, tornaram-se ovalados e após 7 - 10 dias de cultura foram verificadas as primeiras divisões (Figuras 15 e 16).

Depois de 2 semanas de cultura já se podia ver a olho nu pequenas colônias celulares, (Figura 17) as quais, quando transferidas para meio de cultura sólido contendo metade da concentração de manitol do meio YEP inicial (0,4M) continuaram seu crescimento até a formação de calos (Figura 18).

Não foi obtido nenhum tipo de organogênese nestes calos, mesmo quando transferidos para meio de regeneração de plantas (MP).

Figura 15. Primeira divisão de protoplastos da suspensão H, cultivados em meio líquido.

Figura 16. Protoplastos da suspensão H, em divisão após 7 - 10 dias de cultivo em meio líquido.

Figura 17. Formação de colônias celulares a partir do cultivo dos protoplastos da suspensão H.

Figura 18. Obtenção de calos a partir dos protoplastos da suspensão H.

Os protoplastos cultivados em discos de agarose apresentavam-se com forma não esférica, mas apesar da maior dificuldade de acompanhar seu desenvolvimento, colônias foram visíveis a olho nu após 16 - 18 dias de cultura. O número de colônias observadas foi maior na cultura de protoplastos isolados na solução SS₃. Estas microcolônias também continuaram crescendo posteriormente até formar culturas de calos.

Em cana-de-açúcar, o emprego de suspensões celulares como fonte de protoplastos forneceu melhores resultados permitindo o reestabelecimento da cultura de origem (MARETZKI & NICKELL, 1973; LARKIN, 1982; GUIDERDONI, 1985). Apesar da dificuldade de regenerar plantas a partir de calos oriundos de protoplastos, trabalhos mais recentes já relataram a diferenciação de plantas de cana-de-açúcar a partir de protoplastos (QUIUSHENG & XUEQUIN, 1984; SRINIVASAN & VASIL, 1985).

4.2.2.2. Protoplastos da suspensão NA₁

As melhores preparações de protoplastos obtidas da suspensão NA₁ após filtração por peneira de malha de 35 µm e centrifugação à 500 rpm durante 3 - 5 minutos ainda apresentavam 10 - 13% de agregados de protoplastos (2 - 4 protoplastos). Mesmo centrifugando-se com solução de sacarose a 21% (250 rpm, 5 ou 10 minutos), não foi possível separar estes agregados de protoplastos de forma efetiva.

GUIDERDONI (1985), utilizando centrifugação com solução de sacarose a 21% conseguiu obter suspensão de protoplastos livres de células não digeridas.

A centrifugação com solução de Percoll (250 rpm, 5 ou 10 minutos), também não foi satisfatória quanto à eliminação dos protoplastos aglomerados.

A adição de meio "condicionado" ao meio de cultura dos protoplastos parece ter estimulado a formação da parede celular e as primeiras divisões. Em meio de cultura contendo meio "condicionado", após 7 - 8 dias do isolamento observou-se protoplastos com forma ovalada, indicando a regeneração da parede celular e após 10 - 12 dias do isolamento as primeiras divisões celulares.

Aos 15 - 16 dias após o isolamento observou-se agregados com 4 células. Não foi possível, neste estágio, ter certeza se estes agregados eram provenientes da divisão dos protoplastos isolados ou se já estavam presentes na suspensão de protoplastos em cultura, devido ao pequeno número observado.

Em meio de cultura sem meio "condicionado" houve um atraso em relação à regeneração da parede celular (protoplastos ovalados aos 12 dias) e primeira divisão após 2 semanas. O número de agregados com 4 protoplastos foi muito inferior ao da cultura com meio "condicionado".

Não houve continuidade de divisão celular em ambos os meios de cultura, mesmo com adição posterior de meio sem o agente osmótico.

Protoplastos de maior tamanho, vacuolados, não se dividiram, observação também feita por GUIDERDONI (1985) quando cultivou protoplastos de suspensões celulares de cana-de-açúcar.

Uma das possíveis causas da não divisão dos protoplastos desta suspensão poderia ser atribuída ao fato de seu crescimento ser muito dependente da densidade celular (observações experimentais preliminares). A adição do meio condicionado foi uma tentativa de solucionar este problema sem que houvesse necessidade de aumentar muito a densidade de protoplastos em cultura, porém, não foi condição suficiente para resolvê-lo.

GUIDERDONI (1985) salientou a importância da densidade celular para a proliferação de células isoladas de cana-de-açúcar. Segundo o autor, a explicação poderia ser uma simples detoxificação do meio, tornando as concentrações dos diversos metabólitos compatíveis com o crescimento das células isoladas, ou a difusão de fatores de divisão celular no meio por parte das células agregadas.

4.3. FUSÃO DE PROTOPLASTOS

4.3.1. Fusão espontânea

Observações preliminares realizadas com coloração de núcleos através da metodologia descrita por OHYAMA (1982) mostraram que alguns protoplastos de células em suspensão H e de mesófilo foliar de plantas cultivadas "in vitro" continham mais de um núcleo (2 - 3 núcleos). Estas fusões espontâneas são freqüentemente citadas na literatura.

CHEN & LIU (1976) as observaram em 7% dos protoplastos isolados de folhas jovens de *Saccharum* spp., sendo que a maioria destes protoplastos continha de 2 a 4 núcleos. E no caso de protoplastos de células em suspensão de cana-de-açúcar, GUIDERDONI (1985) encontrou protoplastos bi, tri e tetranucleados.

Existem casos em que se observa até 52,8% de protoplastos multinucleados, como foi relatado por BRAR et alii (1980) em protoplastos de suspensões celulares de milho.

4.3.2. Fusão com PEG

Através da metodologia descrita foi possível induzir a fusão de protoplastos de cana-de-açúcar de mesófilo foliar com os de células em suspensão utilizando-se o PEG.

A fusão deu-se em 2 etapas. Na primeira ocor-

reu adesão dos protoplastos logo após a adição da solução de PEG. Nos testes realizados observou-se também a formação de grandes aglomerados de protoplastos.

Após 15 minutos, ao iniciar a diluição da solução de PEG, observou-se que muitos protoplastos começaram a se fundir (Figura 19). Logo após o término do enxague foram detectados os produtos de fusão. Estes apresentavam grânulos citoplasmáticos provenientes de células em suspensão e cloroplastos provenientes de protoplastos de mesófilo foliar (Figura 20).

As porcentagens desses produtos híbridos, obtidos pela fusão de protoplastos de mesófilo foliar (*Saccharum* spp. c.v. NA 56-79) com protoplastos de células das suspensões NA₁ ou H não diferiram muito, estando ao redor de 13 - 16%.

Figura 19. Fusão incompleta entre protoplastos de mesofilo com protoplastos de células em suspensão.

Figura 20. Produto da fusão de protoplasto de mesófilo com protoplasto de células em suspensão.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Protoplastos de cana-de-açúcar podem ser obtidos de células do mesofilo de plantas regeneradas "in vitro" e também de calos e células em suspensão, utilizando-se uma mistura das enzimas, celulose, hemicelulase e pectinase.
- Os protoplastos isolados de mesofilo e de células em suspensão podem ser fusionados em presença de polietilenoglicol (PEG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, M.R. Isolation, culture and fusion of protoplasts: problems and prospects. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 31 (2/3):66-77, 1982.
- BAJAJ, Y.P.S. Protoplasts isolation, culture and somatic hybridization. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. ed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.467-96.
- BATES, L.S. & DEYOE, C.W. Wide hybridization and cereal improvement. *Economic Botany*, New York, 27:401-12, 1973.
- BLONSTEIN, A.D. & KING, P.J. Plant mutant isolation via protoplasts. In: FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*. Florida, CRC Press, 1985. cap. 11, p.151-68.
- BRAR, D.S.; RAMBOLD, S.; CONSTABEL, F.; GAMBORG, O.L. Isolation, fusion and culture of *Sorghum* and corn protoplasts. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 96:269-75, 1980.
- CARLSON, P.S.; SMITH, H.H.; DEARING, R.D. Parasexual interespecific plant hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 69:2292-4, 1972.

- CHEN, W.H. & LIU, M.C. Isolation of protoplasts from sugarcane young leaves. *Report of Taiwan Sugar Research Institute*, 64:1-10, 1974.
- CHEN, W.H. & LIU, M.C. Nuclear behavior and cell wall regeneration in protoplasts from sugarcane young leaves. *Report of Taiwan Sugar Research Institute*, 71:1-9, 1976.
- CHOUREY, P.S. & ZURAWSKI, D.B. Callus formation from protoplasts of a maize cell culture. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 59:341-4, 1981.
- COCKING, E.C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, London, 187:962-3, 1960.
- CONSTABEL, F. & CUTLER, A.J. Protoplast fusion. In: FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*. Florida, CRC Press, 1985. cap. 4, p.53-66.
- COULIBALY, M.Y. & DEMARLY, Y. Regeneration of plantlets from protoplasts of rice, *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzenzüchtg*, Berlin, 96:79-81, 1986.
- CROCOMO, O.J.; OCHOA-ALEJO, N.; GONÇALVES, C.H.R.P.; BACCHI, O.S. Genetic engineering for the sugarcane plant system. In: CROCOMO, O.J.; TAVARES, F.C.A.; SODRZEIESKI, D., ed. *Genetic Engineering for Biotechnology*, São Paulo, PROMOCET, 1981. p.29-32.
- DEKA, P.C. & SEN, S.K. Differentiation in calli originated from isolated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) through plating technique. *Molecular and General Genetics*, Berlin, 145:239-43, 1976.

ENGLER, D.E. & GROGAN, R.G. Isolation, culture and regeneration of lettuce leaf mesophyll protoplasts. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 28:223-9, 1983.

ERIKSSON, T.R. Protoplast isolation and culture. In: FOWLE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*. Florida, CRC Press, 1985. cap. 1, p.1-20.

EVANS, D.A. Agricultural applications of plant protoplast fusion. *Bio Technology*, 1(3):253-61, 1983a.

EVANS, D.A. Protoplast fusion. In: EVANS, D.A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. *Handbook of Plant Cell Culture Technique for Propagation and Breeding*. New York, Mac Millan Publishing Company, 1983b. v.1, cap. 7, p.291-321.

EVANS, D.A. & BRAVO, J.E. Protoplast isolation and culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. *Handbook of Plant Cell Culture Technique for Propagation and Breeding*. New York, Mac Millan Publishing Company, 1983. vol 1., cap. 4 p.124-76.

EVANS, P.K.; KEATES, A.G.; COCHING, E.C. Isolation of protoplasts from cereal leaves. *Planta*, Berlin, 104:178 - 81, 1972.

FERENCZY, L. & MARETZKI, A. Success in preparing sugarcane protoplasts. In: HAWAIIAN SUGAR PLANTER'S ASSOCIATION. *Annual Report*, Aiea, 1970. p.64-5.

FOWKE, L.C. Protoplasts for studies of cell organelles. In: FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*, Florida, CRC Press, 1985. cap. 3, p. 39-52.

FROMM, M.E.; TAYLOR, L.P.; WALBOT, V. Stable transformation of maize after gene transfer by eletroporation. *Nature*, London, 319:791-3, 1986.

FUJIMURA, T.; SAKURAI, M.; AKAGI, H.; NEGISHI, T.; HIROSE, A. Regeneration of rice plants from protoplasts. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 4, Minneapolis, Somers, D.A. et alii, 1986. p.161.

GALUN, E. & AVIV, D. Cytoplasmic hybridization: Genetic and breeding applications. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, R.V.; YAMADA, Y., ed. *Handbook of Plant Cell Culture* New York, Mac Millan Publishing Company, 1983. vol. 1, cap. 9, p.358-92.

GILES, K.L. & WHITEHEAD, H.C.M. The localization of introduced *Azotobacter* cells within the mycelium of a modified mycorrhize. (*Rhizopogon*) capable of nitrogen fixation. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 10:367-72, 1977.

GUIDERDONI, E. Culture "in vitro" de cellules et de protoplastes de canne à sucre (*Saccharum* sp.). *L'Agronomie Tropicale*, Paris, 40(4):309-14, 1985.

HARMS, C.T. Somatic incompatibility in the development of higher plant somatic hybrids. *The Quartely Review of Biology*, New York, 58:325-53, 1983.

HARMS, C.T. Hybridization by somatic fusion. In: FOWKE, L. C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*. Florida, CRC Press, 1985. cap. 12, p.170-203.

HEYSER, J.W. Callus and shoot regeneration from protoplasts of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 113:293-9, 1984.

- HO, W. & VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Annals of Botany*, London, 51: 719-26, 1983.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.*, 347, 1950.
- IMBRIE-MILLIGAN, C.W. & HODGES, T.K. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta*, Berlin, 168: 395-401, 1986.
- JONES, M.G.K. & DALE, P.J. Reproducible regeneration of callus from suspension culture protoplasts of the grass *Lolium multiflorum*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 105(3): 267-74, 1982.
- KAO, K.N. Staining methods for protoplasts and cells. In: WETTER, L.R. & CONSTABEL, F. *Plant Tissue Culture Methods*, 2. ed. Saskatoon, National Research Council of Canada, 1982. p.67-71.
- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, Berlin, 120: 215-27, 1974.
- KANAI, R. & EDWARDS, G.E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C₃, C₄, and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two-phase system. *Plant Physiology*, Washington, 52: 484-90, 1973.
- KARUNARATNE, S.M. & SCOTT, K.J. Mitotic activity in protoplasts isolated from *Sorghum bicolor* leaves. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 23: 11-6, 1981.

- KAUR-SAWHNEY, R.; FLORES, H.E.; GALSTON, A.W. Polyamine - induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiology*, Washington, 65: 368-71, 1980.
- KOHLLENBACH, H.W. Cytodifferentiation. In: FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*. Florida, CRC Press 1985. cap. 7, p.91-104.
- KRISHNAMURTHI, M. Isolation, fusion and multiplication of sugarcane protoplasts and comparison of sexual and parasexual hybridization. *Euphytica*, Wageningen, 25: 145-50, 1976.
- KUSTER, E. Über die verschmelzung nackter protoplasten. *Berchete du Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Berlin, 27: 589-98, 1909.
- LARKIN, R.J. Sugarcane tissue and protoplasts culture. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, Netherlands, 1(3): 149-64, 1982.
- LEONARD, R.T. & RAYDER, L. The use of protoplasts for studies on membrane transport in plants. In: FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*. Florida, CRC Press, 1985. cap. 8, p.105-18.
- LIU, M.C. Sugarcane. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. *Handbook of Plant Cell Culture Crop Species*. New York, Macmillan Publishing Company, 1984. vol. 2, cap. 20, p.572-605.
- LIU, M.C. & CHEN, W.H. Fusion and cell clump formation in sugarcane protoplasts. *ISSCT Sugar Cane Breeder's Newsletter*, 37: 39-46, 1976.

- LIU, L.F. & LAI, K.L. Isolation and culture of rice protoplasts from cells originated from young embryo. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 5, Tokyo, 1982. *Proceedings*. Tokyo, A.Fujiwara, 1982. p.581-2.
- LÖRZ, H.; BAKER, B.; SCHELL, J. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplasts transformation. *Molecular and General Genetics*, Berlin, 199: 178-82, 1985.
- LU, C.Y.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Jena, 104: 311-8, 1981.
- LÜHRS, R. & LÖRZ, H. Somatic embryogenesis, cell and protoplasts culture of *Hordeum vulgare* L. (Barley). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 4, Minneapolis, 1986. *Abstracts*. Minneapolis, Sommers, D.A. et alii, 1986. p.45.
- MARETZKI, A. & NICKELL, L.G. Formation of protoplasts from sugarcane cell suspensions and the regeneration of cell cultures from protoplasts. In: *Colloques Internationaux C.N.R.S.*, Versailles, 1973. Paris, INTA.
- MOTOYOSHI, F. Protoplast isolation from callus cells of maize endosperm. *Experimental Cell Research*, New York, 68: 452-6, 1972.
- MOTOYOSHI, F. Protoplasts in virology. In: FOWKE, L.C. e CONSTABEL, F. ed. *Plant Protoplasts*. Florida, CRC Press, 1985. cap. 9, p.119-38.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 15: 473-97, 1962.

- NEGRUTIU, I.; JACOBS, M.; CABOCHE, M. Advances in somatic cell genetics of higher plants - the protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 67: 289-304, 1984.
- PELLETIER, G. & CHUPEAU, Y. Plant protoplast fusion and somatic plant cell genetics. *Physiologie Vegetale*, Paris, 22(3):377-99, 1984.
- POTRYKUS, I.; HAROLD, D.; HARMS, C.; LARKIN, P.; LÖRZ, H. Corn protoplasts. *Maize Genetics Coop. News Letter*, 53: 15, 1979.
- POTRYKUS, I.; HARMS, C.T.; LÖRZ, H.; THOMAS, E. Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Molecular and General Genetics*, Berlin, 156:347-50, 1977.
- POTRYKUS, I.; HARMS, C.T.; LÖRZ, H. Callus formation from cell culture protoplast of corn (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 54:209-14, 1979.
- POTRYKUS, I.; SAUL, M.W.; PETRUSKA, J.; PASKOWSKI, J.; SHILUTO, R.D. Direct gene transfer to cells a graminaceous monocot. *Molecular and General Genetics*, Berlin, 199(2): 189-93, 1985.
- POWER, J.B.; CUMMINS, S.E.; COCKING, E.C. Fusion of isolated protoplasts. *Nature*, London, 225:1016-8, 1970.
- QUIUSHENGE, Y. & XUEQIN, Z. Organogenesis from sugarcane protoplasts. *Kexue Tongbao*, Beijing, 1984 (no prelo).
- QUIUSHENG, Y. & XIANGHUI, L. Isolation, culture of sugarcane protoplasts and callus formation. *Kexue Tongbao*, Beijing, 29(3):381-5, 1984.

ROCHE, A. de la.; KELLER, W.A.; SINGH, J.; SIMINOVITCH, D.

Isolation of protoplasts from unhardened and hardened tissues of winter rye and wheat. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 55:1181-5, 1977.

SENN, A. & PILET, P.E. Isolation and some morphological properties of maize root protoplasts. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 100(4):299-310, 1980.

SHIMAMOTO, K.; HAYASHI, Y.; KYOZUKA, J. High frequency plant regeneration from protoplasts of rice (*Oryza sativa*). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, Minneapolis, Somers, D.A. et alii, 1986, p.161.

SILVA, D.M.; MIACHIR, J.I.; SILVA, M.C.; REIS, B.F. Fusão de duas espécies de solanáceas e de duas leguminosas em campos elétricos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 13: 113-21, 1987.

SMITH, M.A.L. & McCOWN, B.H. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 28(2):149-56, 1982/1983.

SRINIVASAN, C. & VASIL, I.K. Callus formation and plantlet regeneration from sugarcane protoplasts isolated from embryogenic cell suspension cultures. *American Journal of Botany*, New York, 72(6):833, 1985.

SRINIVASAN, C. & VASIL, I.K. Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Plant Physiology*, Gainesville, 126(1):41-8, 1986.

- TABAEIZADEH, Z.; FERL, R.J.; VASIL, I.K. Somatic hybridization in the gramineae: *Saccharum officinarum* L. (sugarcane) and *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 83(15):5616-9, 1986.
- THOM, M.; MARETZKI, A.; KOMOR, E. Vacuoles from sugarcane suspension cultures. I. Isolation and partial characterization. *Plant Physiology*, Washington, 69:1315-9, 1982.
- TORIYANA, K. & HINATA, K. Plant regeneration from protoplast of anther callus in rice. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 4, Minneapolis, 1986. *Abstracts*, Minneapolis, Somers, D.A. et alii, 1986. p.160.
- UCHIMYA, H. & MURASHIGE, T. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from culture tobacco cells. *Plant Physiology*, Washington, 54:936-44, 1974.
- UCHIMYA, H. Progress in plant protoplast technology - isolation, culture and genetic manipulation. *Reports of the Institute for Agricultural Research Tohoku University, Sendai*, 30:29-53, 1979.
- VASIL, I.K. The progress, problems, and prospects of plant protoplast research. *Advances in Agronomy*, New York, 28:119-60, 1976.
- VASIL, I.K. Toward the development of a single cell system for grasses. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH-INSTITUTE. ed. *Cell and Tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Beijing, Science Press, 1983. p.131-44.

- VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant tissue cultures in genetics and plant tissue cultures. *Advances in Genetics*, New York, 20:127-215, 1979.
- VASIL, V. & VASIL, I.K. Isolation and culture of cereal protoplasts. I. Callus formation from pearl millet (*Pennisetum americanum*) protoplasts. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 92:379-83, 1979.
- VASIL, V. & VASIL, I.K. Isolation and culture of cereal protoplasts. Part. 2. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 56:97-9, 1980.
- VASIL, V.; WANG, D.; VASIL, I.K. Plant regeneration from protoplasts of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 111:233-9, 1983.
- VERHOEK-KÖHLER, B.; HAMPP, R.; ZIEGLER, H.; ZIMMERMANN, V. Electro-fusion of mesophyll protoplasts of *Avena sativa*. *Planta*, Berlin, 158:199-204, 1983.
- VU DYK KUANG; SHAMINA, Z.B.; BUTENKO, R.G. Use of nurse tissue culture to obtain clones from cultured cells and protoplasts of corn. *Soviet Plant Physiology*, Washington, 30(4,II):613-20, 1984.
- WHITAKER, R.J. & EVANS, D.A. Organelle transfer for genetic transformation of plant protoplasts. In: EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V., ed. *Handbook of Plant Cell Culture*. New York, MacMillan Publishing Company, 1986. vol. 4, cap. 7, p.172-96.

- WALLIN, A.; GLIMELIUS, K.; ERIKSON, T. The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 74:64-80, 1974.
- WILLISON, J.H.M. Isolated protoplasts as laboratory tools in study of cell wall deposition. In: FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant Protoplasts*. Florida CRC Press, 1985. cap. 6, p.77-90.
- WULLENS, G.J.; KRENS, F.A.; SCHILPEROORT, R.A. Transformation of protoplasts via cocultivation with *Agrobacterium* and via ti plasmids. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V., ed. *Handbook of Plant Cell Culture*. New York, MacMillan Publishing Company, 1986. vol.4, cap. 8, p.197-220.
- YAMADA, Y.; ZHI-QI, Y.; DING-TAI, T. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, Berlin, 5:85-8, 1986.
- ZIMMERMANN, U. Electrical field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 694:227-77, 1982.
- ZIMMERMANN, U. & SCHEURICH, P. Fusion of *Avena sativa* mesophyll cell protoplasts by electrical breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 641:160-5, 1981.