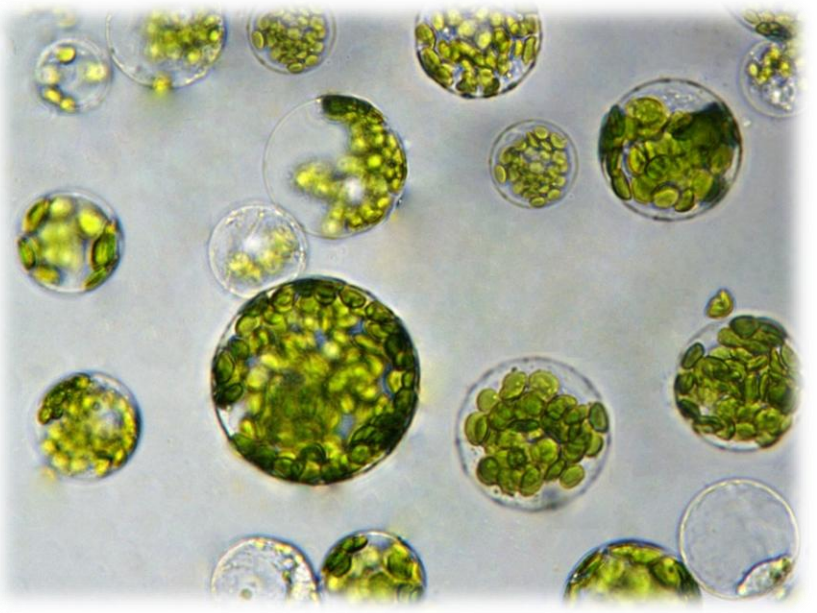
2015

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Optimização dos processos de isolamento e cultura de protoplastos de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)



Diana Henriques Augusto

2015

Optimização dos processos de isolamento e cultura de protoplastos de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)

Diana Henriques Augusto

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Optimização dos processos de isolamento e cultura de protoplastos de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Doutora Sandra Isabel Marques Correia (Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra).

Diana Henriques Augusto

2015

Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias.

Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam ao longo deste último ano e que, de alguma forma, contribuíram para a realização e enriquecimento do trabalho aqui apresentado.

Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, meu orientador, não só por me ter aceitado no seu grupo de investigação, como também pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho. Agradeço todo o apoio e orientação científica, bem como a revisão do texto. Obrigada ainda por toda a boa disposição e simpatia.

À Doutora Sandra Correia, minha co-orientadora, pelos seus amplos conhecimentos científicos que abriram portas à abordagem de novas técnicas e pela revisão de todo o texto. Além disso, agradeço todo o seu incentivo e perseverança.

À Dona Isabel, a primeira pessoa com quem eu contactei aquando da minha chegada a Coimbra, no dia 11 de Agosto de 2013. Obrigada por se ter sempre prontificado em ajudar-me naquilo que eu necessitava. Agradeço também todas as palavras amigas e motivadoras, principalmente nos momentos um pouco mais complicados do meu trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado e de laboratório pelo convívio destes 2 anos. Principalmente, ao Luís Silva por toda a amizade, compreensão e entre - ajuda.

Ao meu caro colega e amigo João Martins, pela infindável ajuda no laboratório e paciência que demonstrou ao longo de todo o ano. À Ana Alves, pela boa companhia proporcionada nos jantares regulares e por todos os outros bons momentos. Em suma, obrigada aos dois do fundo do meu coração.

À Doutora Margarida Caeiro, que apesar de ser de uma área académica completamente diferente, sempre se interessou pelo meu trabalho e me incutiu serenidade.

Aos meus familiares, por todas as palavras encorajadoras.

E, mais importante, aos meus Pais, Mário e Carmo, e à minha Vovó Maria. O meu eterno agradecimento, pois sem o seu apoio incondicional não teria sido possível estudar em Coimbra, que tanto contribuiu para a minha vida pessoal e académica. Esta tese é-lhes dedicada.

A Todos, o Meu Muito Obrigada!

ÍNDICE

RESUMO vii

ABSTRACT ix

1. Introdução 1

1.1. Considerações gerais 3

1.2. Tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.) 4

1.2.1. Caracterização, distribuição e importância económica 4

1.2.2. Micropropagação 7

1.3. Protoplastos 9

1.3.1. Importância como *single - cell systems*: aplicações 19

1.4. Objectivos 22

2. Material e Métodos 25

2.1. Material Vegetal 27

2.2. Métodos 27

2.2.1. Precondicionamento do material vegetal 27

a) Explantes foliares das linhas diplóides e tetraplóides 27

b) Explantes embriogenicamente induzidos 28

c) *Calli* embriogénico e não embriogénico 28

2.2.2. Isolamento e purificação de protoplastos 30

a) A partir de explantes foliares 30

b) A partir de *calli* e explantes embriogenicamente induzidos 37

2.2.3. Contagem e determinação da viabilidade dos protoplastos 44

2.2.4. Cultura de protoplastos 45

2.2.5. Extracção e análise da qualidade de RNA total dos protoplastos 47

a) Extracção e quantificação de RNA total dos protoplastos 47

b) Avaliação da qualidade do RNA por electroforese 47

2.2.6. Análise estatística 48

3. Resultados 49

3.1. Isolamento e purificação de protoplastos 51

a) A partir de explantes foliares 51

b) A partir de *calli* e explantes embriogenicamente induzidos 59

3.2. Cultura de protoplastos 68

3.3. Extracção e análise da qualidade de RNA total dos protoplastos 70

a) Extracção e quantificação de RNA total dos protoplastos 70

b) Avaliação da qualidade do RNA por electroforese 70

4. Discussão 73

4.1. Isolamento e purificação de protoplastos 75

a) A partir de explantes foliares 75

b) A partir de *calli* e explantes embriogenicamente induzidos 80

4.2. Cultura de protoplastos 83

4.3. Extracção e análise da qualidade de RNA total dos protoplastos 84

5. Conclusões e Perspectivas Futuras 87

6. Referências bibliográficas 91

RESUMO

O tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.) é uma espécie arbórea de pequeno porte, pertencente à família Solanaceae, e que apresenta características económicas, nutricionais e biotecnológicas bastante interessantes. No entanto, as populações naturais desta espécie possuem uma baixa variabilidade genética, a qual não é possível ultrapassar sem a aliança entre as técnicas de manipulação genética e os métodos de melhoramento mais convencionais. Os protoplastos podem assim ser considerados como uma ferramenta importante para o melhoramento desta espécie, na medida em que constituem um passo prévio a várias técnicas de manipulação genética, nomeadamente hibridação somática (por fusão de protoplastos) e transformação genética. Recorrendo ao método "*one factor at a time*", analisaram-se os principais factores que afectam tanto o rendimento como a viabilidade dos protoplastos obtidos a partir de diferentes explantes em cultura *in vitro* de tamarilho. Estes dois parâmetros são influenciados pelo estabilizador osmótico (neste caso em concreto, a sacarose), tipos de enzimas hidrolíticas e sua concentração, temperatura e duração da digestão enzimática e métodos de purificação dos protoplastos. O maior rendimento de protoplastos isolados a partir de explantes foliares foi conseguido através da solução K3 com sacarose a 0,4 M contendo celulase "Onozuka" R-10 a 2% (w/v) e macerozima R-10 a 0,5% (w/v). As condições de incubação enzimática com melhores respostas foram a 27 ºC *overnight* e 30 ºC durante 6 horas para as linhas diplóide e tetraplóide, respectivamente. A centrifugação por gradiente de densidade a 100 *g* durante 10 min. com obtenção de uma banda interfásica revelou-se o método de purificação dos protoplastos mais eficiente. Para estimar a viabilidade dos protoplastos recorreu-se ao corante de exclusão Evans blue, registando-se valores de protoplastos viáveis acima dos 50%. No entanto, apesar de a quantidade de protoplastos viáveis por grama de peso fresco ser considerável, ainda não foi possível regenerar plantas a partir de protoplastos colocados em meio de cultura. As condições óptimas para o isolamento e purificação de protoplastos de *calli* e tecidos embriogenicamente induzidos envolveram a digestão enzimática com a combinação de celulase a 1%, driselase a 0,2% e pectinase a 0,02% (w/v), em solução K3 com sacarose a 0,4 M, durante 20 – 22 horas a 25 ºC (para calo embriogénico) ou *overnight* a 27 ºC (calo não embriogénico e explantes embriogenicamente induzidos), seguida de purificação por sedimentação dos protoplastos num *pellet*, quando sujeito a uma centrifugação inicial de 100 *g* durante 10 min. O desenvolvimento de um protocolo

eficiente de isolamento e purificação de protoplastos a partir de diferentes explantes permitiu a avaliação do rendimento possível de obter com a extracção de RNA total e a sua aplicabilidade em futuras análises transcriptómicas de populações específicas de células.

PALAVRAS-CHAVE

Calo embriogénico, cultura *in vitro*, enzimas hidrolíticas, explantes embriogenicamente induzidos, mesófilo, ploidia, protoplastos.

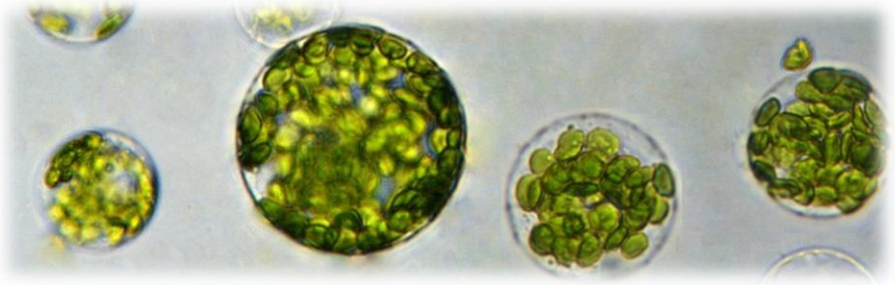
ABSTRACT

Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) is a small solanaceous tree with interesting economical, nutritional and biotechnological features. The low genetic variability observed in natural populations of tamarillo demands for the need for genetic manipulation techniques to circumvent this problem by complementing the more conventional methods of breeding. Plant protoplast technology can be considered an important tool for *S. betaceum* improvement because it can be a predecessor step for these genetic manipulation techniques, such as somatic hybridization (by protoplast fusion) and genetic transformation. Thus, the basis of this study was to determine the main factors affecting the isolation of protoplasts from different *in vitro* cultured tissues of tamarillo. Sucrose as the osmotic stabilizer, types of plant cell wall - degrading enzymes and their concentration, temperature and time of enzymatic incubation, and purification methods were evaluated in terms of their effects on protoplast yield and viability by using the "one factor at a time" method. Results showed that the highest leaf mesophyll protoplast yield was provided by 2% (w/v) cellulase "Onozuka" R-10 and 0.5% (w/v) macerozyme R-10 dissolved in 0.4 M sucrose – K3 solution. This enzymatic mixture was subjected to an overnight incubation at 27 ºC for diploid lines and to 6 h incubation at 30 ºC for tetraploid genotype. The density gradient centrifugation at 100 *g* for 10 min with the separation of an interphase band was the most effective protoplast purification method tested. The optimal conditions achieved for *calli* and embryogenic induced - derived protoplast isolation and purification involved an enzymatic digestion with a combination of 1% (w/v) cellulase "Onozuka" R-10, 0.2% (w/v) driselase and 0.02% (w/v) pectinase, also dissolved in 0.4 M sucrose – K3 solution, for a 20 - 22h incubation period at 25 ºC (embryogenic *callus*) or an overnight incubation at 27ºC (non-embryogenic *callus* and embryogenic induced explants), followed by centrifugation at 100 *g* for 10 min to pellet the protoplasts. Viability of protoplasts from leaf mesophyll and embryogenic *callus* was evaluating using Evans blue staining, with viable protoplasts over 50%. However, despite the high number of viable protoplasts, an efficient regeneration of plants from leaf mesophyll protoplasts was not yet achieved. The development of efficient protoplast isolation and purification protocols, from different explants allowed for the evaluation of the yield possible to achieve with a method for total RNA extraction in order to estimate the application of this technique in subsequent transcriptomic analysis of specific populations of cells.

KEYWORDS

Embryogenic *callus*, embryogenic induced explants, culture *in vitro*, hydrolytic enzyme mixture, leaf mesophyll, ploidy, protoplasts.

1. INTRODUÇÃO



1.1. Considerações gerais

O contínuo aumento da população mundial nos países em desenvolvimento, contrastante com a diminuição da área de solos agrícolas, tem levantado grandes preocupações relativamente ao agravamento das necessidades alimentares da espécie humana e ao facto de os métodos de melhoramento convencionais poderem não suportar o aumento requerido de bens alimentares (Irninger, 2003).

No decorrer dos últimos anos, inúmeras metodologias têm vindo a ser desenvolvidas em prol do avanço científico na área das ciências botânicas, e cuja exploração tem contribuído para o melhoramento das colheitas. Tais metodologias estão integradas na Biotecnologia Vegetal, que recorre à manipulação de plantas para a obtenção de novas características ou à sua utilização para a obtenção de determinados produtos ou realização de determinadas funções (Canhoto, 2010). A Biotecnologia Vegetal não deve ser encarada como a solução para resolver a escassez de alimentos, na medida em que não haveria essa escassez se houvesse uma distribuição equitativa destes a nível mundial; deve sim ser considerada como um auxílio para as tecnologias convencionais (Borlaug e Dowswell, 2005), combinação essa que será crucial para garantir uma produção sustentável de alimentos para mais 2 mil milhões de habitantes em 2050, segundo dados da FAO (http://www.fao.org/biotechnology/en/).

Na vasta área da Biotecnologia Vegetal inclui-se a cultura *in vitro*, a qual é destacada pela sua importância basilar no desenvolvimento deste trabalho. Define-se como o estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células (*callus*) (Chawla, 2010). Estas culturas são mantidas em condições assépticas e perfeitamente controladas – luz, temperatura, pH, humidade, composição do meio de cultura (Canhoto, 1994), podendo ser utilizadas com diversas finalidades. Dos principais objectivos desta técnica destacam-se: i) a micropropagação de plantas, ii) a produção de metabolitos secundários, iii) a transformação genética, iv) o isolamento de protoplastos e v) a obtenção de plantas haplóides (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006). A micropropagação de plantas não é mais que um processo de clonagem, na medida em que se procede à obtenção de indivíduos geneticamente iguais ao

que lhes deu origem. Este procedimento é possível devido à capacidade das plantas de regenerar rebentos e novas plantas a partir de tecidos somáticos.

No laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC) têm sido realizados vários trabalhos na área da Biotecnologia Vegetal, nomeadamente no âmbito da micropropagação *in vitro* de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.). Os trabalhos realizados com esta espécie têm revelado o seu potencial na aplicação de diversos protocolos de micropropagação e na busca pela compreensão dos mecanismos básicos que regem estes processos, e é neste sentido que este trabalho foi desenvolvido, com foco especial no desenvolvimento de mais uma importante ferramenta biotecnológica para utilização com o tamarilho, que é a obtenção de protoplastos.

1.2. Tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)

1.2.1. Caracterização, distribuição e importância económica

A espécie *Solanum betaceum* Cav. (= *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), pertencente à família Solanaceae, é vulgarmente conhecida como tamarilho, "tamarillo", "tree tomato" ou "tomate de la paz" (Bois, 1927), conforme os locais. A designação tamarilho surgiu em 1967, na Nova Zelândia, como consequência do célere aumento de produção e consumo deste fruto que levou à necessidade de criar um nome comercial apelativo que não fosse confundido com o tomate (*Solanum lycopersicum*) (Morton, 1987).

Trata-se de um árvore (Fig. 1A) subtropical de pequeno porte (2 a 4 metros), semi-lenhosa e de rápido crescimento (Canhoto *et al.*, 2005). As folhas são decíduas e podem ter 10 a 30 centímetros de comprimento. As flores (Fig. 1B) apresentam uma cor rosa-esbranquiçada e surgem agrupadas próximo dos pecíolos das folhas, sendo o período de floração entre meados da Primavera até meados do Verão, apesar de por vezes surgirem noutros períodos do ano (Correia *et al.*, 2009). A polinização é essencialmente autogâmica, o que pode estar na origem da baixa variabilidade observada em populações naturais desta espécie (Barghchi, 1986). Os frutos (Fig. 1C) são bagas ovóides (5 a 7 centímetros de

comprimento), com longos pedúnculos e de exocarpo glabro, cuja tonalidade pode ser vermelha, laranja ou amarela consoante o cultivar. De salientar que são os frutos vermelhos os mais apreciados pelo seu sabor e aroma mais intensos (Correia *et al.*, 2009).

Figura 1. *Solanum betaceum*. (A) Exemplar existente no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. (B) Flores em diferentes estádios de desenvolvimento. (C) Frutos. (Correia e Canhoto, 2012)

S. betaceum é nativa dos Andes (Peru, Chile, Bolívia e Argentina) (Fig. 2; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011), onde cresce entre os 1100 e os 2300 metros de altitude. A sua domesticação e cultivo são anteriores à descoberta do continente americano. Como consequência da sua descoberta, acabou por ser difundida para outros locais subtropicais, nomeadamente para a Índia e Sudeste Asiático. Pensa-se que terá sido introduzida nos arquipélagos dos Açores e da Madeira no século XIX (Guimarães *et al.*, 1996; Canhoto *et al.*, 2005). Contudo, só mais recentemente se tem generalizado o interesse por esta espécie, essencialmente devido à procura dos seus frutos. Hoje em dia,

para além dos locais onde a espécie é espontânea, o tamarilho é maioritariamente cultivado no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador, E.U.A. (Califórnia), Quénia, Índia, Indonésia, Austrália e Nova Zelândia (Fig. 2; Mertz *et al.*, 2009). Em Portugal, esta planta é cultivada principalmente nas ilhas atlânticas, tendo já despertado o interesse de alguns agricultores do continente (Correia e Canhoto, 2012).

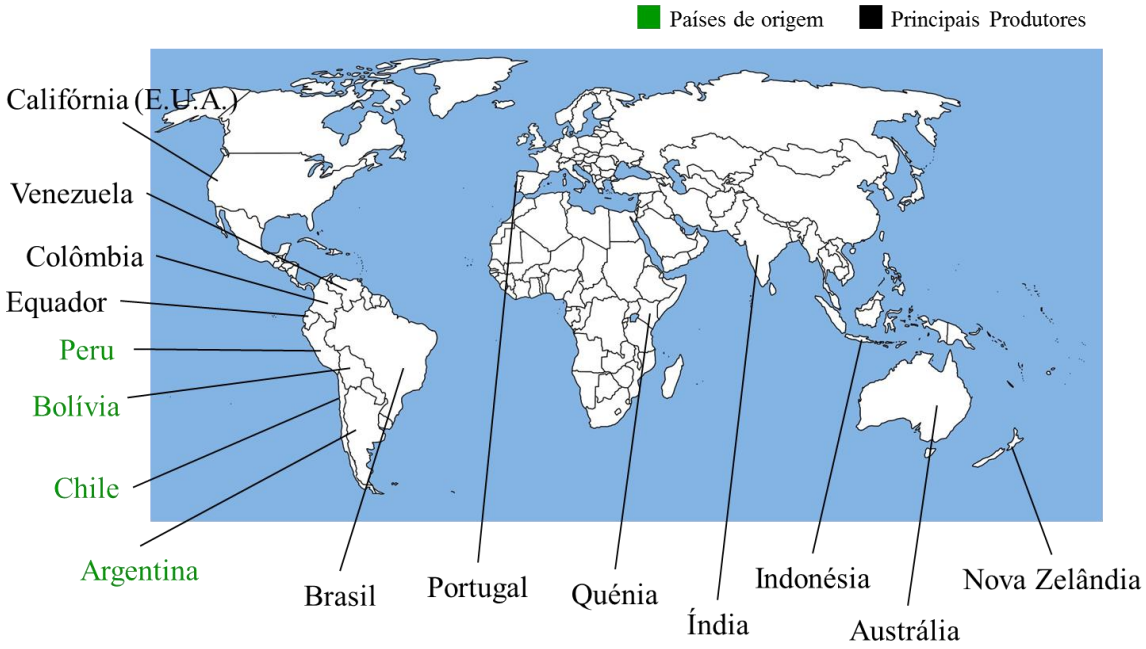


Figura 2. Distribuição geográfica de *S. betaceum*. Encontram-se destacados os países de onde é nativa (a verde), bem como os seus principais produtores (a preto).

Trata-se de uma espécie adaptável e de fácil cultivo, com um ciclo de reprodução curto e com um tempo médio de vida de 8 anos. A frutificação inicia-se, normalmente, 2 anos após o cultivo e o clímax de produção é atingido em 5 anos, começando a haver um declínio da produção de frutos após 6 anos de cultivo (Meadows, 2002). A baixa tolerância à geada e a sensibilidade a temperaturas elevadas constantes, a secas prolongadas e a solos inundados são outras limitações ao cultivo do tamarilho (Lopes *et al.*, 2000).

Salienta-se o facto de os frutos maduros possuírem um elevado valor nutricional, pelo que podem ter vários usos alimentares, desde saladas a produtos processados (como sumos ou compotas). Apresentam um teor relativamente elevado de proteínas (1,5 - 2 g /

100 g), vitamina C (20 - 45 mg / 100 g), vitamina E (1,86 mg / 100 g), provitamina A e também alguns minerais como ferro e potássio. Além disso, o teor em hidratos de carbono é reduzido (7,7 g / 100 g), bem como o seu valor calórico (cerca de 28 cal / 100 g) (McCane e Widdowson, 1992). Vários estudos têm sido realizados para a avaliação do teor e tipo de antocianinas e carotenóides presentes nos frutos do tamarilho (De Rosso e Mercadante, 2007; Kou *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2009). Os resultados têm mostrado que alguns destes componentes podem ter propriedades antioxidantes, terapêuticas e preventivas importantes (Villegas-Ruiz *et al.*, 2012; Noor Atiqah *et al.*, 2014), tornando os frutos uma fonte de alimento que merece uma melhor exploração.

Deste modo, considera-se que o tamarilho tem potencial económico (Correia *et al.*, 2009; 2011), embora ainda seja considerado como NUC (*Neglected or Underutilizated Crop*), i.e., uma espécie com potencial para ser utilizada na prática agrícola mas que, por alguma razão, não tem sido devidamente explorada (www.cropsforthefuture.org/). Se por um lado, se notam baixos níveis de produção e consumo de tamarilho, por outro, os seus frutos têm-se mostrado bastante rentáveis, atingindo elevados preços no mercado (10 a 15 €/Kg). Como consequência, torna-se importante aumentar a produção desta espécie fruteira, quer em termos quantitativos, quer qualitativos. De referir ainda que o tamarilho reúne condições para ser uma espécie competitiva em algumas zonas do País, podendo vir a tornar-se uma espécie interessante para os nossos agricultores. Além disso, o tamarilho surge também como um importante sistema de referência para a optimização de protocolos de cultura *in vitro* e estudos de biologia do desenvolvimento de lenhosas, sendo uma espécie que responde facilmente ao cultivo *in vitro* (Correia e Canhoto, 2012) através de: i) proliferação de meristemas existentes no explante inicial, ii) indução de organogénese e iii) embriogénese somática.

1.2.2. Micropropagação

Foram já publicados vários ensaios que descrevem a micropropagação do tamarilho através da proliferação de meristemas axilares (Cohen e Elliot, 1979; Barghchi, 1998; Obando *et al.*, 1992), de organogénese (Guimarães *et al.*, 1996; Obando e Jordan, 2001) e de embriogénese somática (Guimarães *et al.*, 1988, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et*

al., 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011, 2012). No entanto, o primeiro método a ser aplicado para a micropropagação do tamarilho foi a proliferação de meristemas axilares (Barghchi, 1986; Cohen e Elliot, 1979).

O desenvolvimento de meristemas axilares do tamarilho pode ocorrer em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento, contudo maiores taxas de proliferação são conseguidas com a inoculação em meio de cultura suplementado com uma citocinina, 6-benzilaminopurina (BAP). No entanto, esta citocinina leva à formação de um tecido caloso indiferenciado na base da planta, inibindo o desenvolvimento do sistema radicular do rebento em cultura (mais evidente em alguns genótipos do que noutros). Para promover o enraizamento, é necessário inocular as plantas num novo meio de cultura mas sem a adição de BAP (Correia *et al.*, 2011).

A embriogénese somática (ES) é um processo com particular interesse, pois surge como uma poderosa ferramenta para o melhoramento vegetal, via transformação genética, clonagem de indivíduos a grande escala, fixação de genótipos com as características desejadas e ainda criopreservação de linhas de interesse (Correia *et al.*, 2011). Desde 1988, têm sido estudados diferentes aspectos relacionados com a indução de ES e o desenvolvimento de embriões somáticos de tamarilho no nosso laboratório (Guimarães *et al.*, 1988, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011, 2012). São vários os explantes de tamarilho que têm potencial para a iniciação de culturas embriogénicas, incluindo embriões zigóticos, folhas jovens, cotilédones e hipocótilos (Canhoto *et al*., 2005).

A indução de ES é alcançada com um meio de cultura rico em auxinas, suplementado com elevados níveis de sacarose (9%, w/v), o que aumenta significativamente a formação de embriões somáticos (Correia e Canhoto, 2012), através de duas vias diferentes consoante a auxina utilizada (ácido 1-naftaleno acético [NAA], ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D] ou picloram). Na presença de NAA os embriões somáticos desenvolvem-se a partir de tecidos dos embriões zigóticos, com uma formação reduzida de calo, sendo a indução e a maturação dos embriões somáticos feita no mesmo meio de cultura – processo "one-step" (Guimarães *et al.*, 1996). Quando se recorre a 2,4-D ou picloram, os embriões zigóticos ou os explantes foliares produzem um tecido embriogénico possível de ser mantido, através de subculturas sucessivas no mesmo meio com auxina, e que começa a formar embriões e, mais tarde plantas, quando transferido para um meio sem auxinas – processo "two step" (Canhoto *et al.*, 2005). Neste último processo

verifica-se a formação de dois tipos de calo distintos, quer na sua morfologia e aspecto, quer na sua funcionalidade – calo embriogénico e calo não embriogénico (Correia *et al.*, 2009, 2011). O calo não embriogénico (CNE) de tamarilho é caracterizado por ser mais amarelado e friável (Lopes *et al.*, 2000), enquanto o calo embriogénico (CE) apresenta-se mais esbranquiçado e compacto e com um crescimento muito mais lento que o calo não embriogénico (Guimarães *et al.*, 1988). É possível manter o CE em cultura (meio sólido ou líquido), na presença de auxinas, durante um determinado período de tempo, sem aparentes perdas de capacidade embriogénica (Guimarães *et al.*, 1988; Canhoto, 2010). No entanto, a maturação e desenvolvimento das massas pro-embriogénicas em embriões somáticos só ocorre quando o tecido embriogénico é transferido para um meio de cultura sem auxina e com concentrações de sacarose inferiores.

No tamarilho, a maturação, germinação e desenvolvimento de embriões somáticos é, regra geral, conseguida com a sua transferência para meio sem hormonas (Canhoto, 2010; Correia e Canhoto, 2012). As primeiras fases do desenvolvimento dos embriões somáticos podem ser observadas na superfície do calo com 3 semanas. Este desenvolvimento é um processo assíncrono, onde as diferentes fases morfológicas da maior parte dos embriões somáticos são semelhantes às que ocorrem durante a embriogénese zigótica – globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

1.3. Protoplastos

Como mencionado anteriormente, a variabilidade genética observada em populações naturais de *S. betaceum* é relativamente reduzida, devido a uma baixa taxa de polinização cruzada e a uma elevada incidência de fenómenos de incompatibilidade dentro desta espécie. Deste modo, recorrer a técnicas de manipulação genética é tido como uma mais – valia para o melhoramento do tamarilho (Barghchi, 1998), o que vai de encontro à perspetiva deste trabalho experimental, na medida em que os protoplastos constituem um passo prévio a várias técnicas de manipulação genética ou de hibridação somática (Giri e Giri, 2007; Rezazadeh e Niedz, 2015). Assim, o estabelecimento de um protocolo de isolamento de protoplastos representa uma importante abordagem para futuros programas de melhoramento desta espécie fruteira.

O termo "protoplasto" (Fig. 3) refere-se à célula vegetal desprovida de parede celular, estando apenas a membrana plasmática a delimitar os respectivos organitos celulares do ambiente exterior. No entanto, do ponto de vista fisiológico, o protoplasto não pode ser considerado simplesmente como uma célula cuja parede celular foi removida, uma vez que tanto os mecanismos envolvidos no seu isolamento, causadores de um stresse profundo, bem como os factores ambientais vão influenciar indubitavelmente o seu metabolismo e levar a alterações citológicas e funcionais (Smith, 1977).

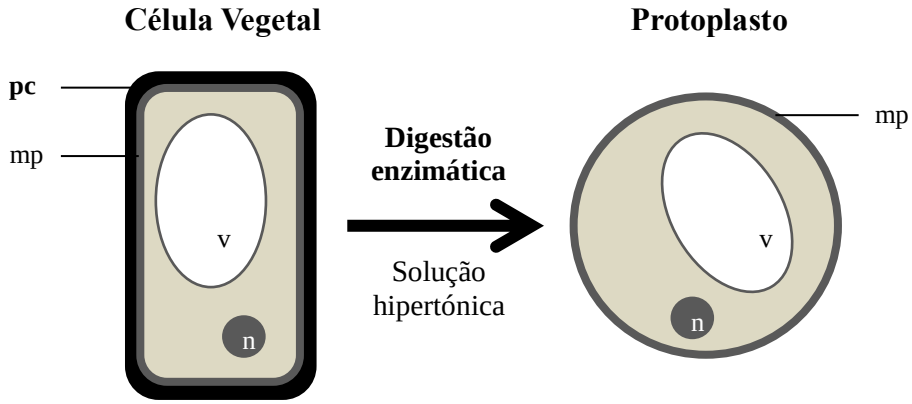


Figura 3. Esquema geral da obtenção de protoplastos a partir de células vegetais. Legenda: pc – parede celular; mp – membrana plasmática; v – vacúolo; n – núcleo.

Os protoplastos podem ser isolados a partir de diferentes tipos de explante *ex* e *in vitro*. Contudo, a utilização de material vegetal estabelecido previamente *in vitro* é vantajosa se a finalidade dos protoplastos isolados for a regeneração de plantas, não só pelo facto de este material já se encontrar em condições assépticas, como também por apresentar uma frequência de regeneração mais elevada devido à condição do tecido dador para o crescimento rápido (Maheshwari *et al.*, 1986). A proliferação *in vitro* de meristemas permite ainda um contínuo fornecimento de tecidos jovens, o que também contribui para o isolamento de protoplastos, especialmente em plantas lenhosas (Davey e Anthony, 2010).

Para resultados mais consistentes, os explantes foliares continuam a ser os mais adequados ao garantirem o isolamento de um grande número de protoplastos viáveis relativamente uniformes (Liu, 2005) (Fig. 4). Além disso, a organização celular do mesófilo facilita o acesso das enzimas à parede celular das suas células (Chawla, 2010). Folhas jovens (e.g., provenientes de cultura *in vitro*) respondem melhor que folhas mais

diferenciadas (e.g., folhas de plantas em estufa) (Giri e Giri, 2007). Isto deve-se, em parte, ao facto de as plantas micropropagadas *in vitro* se encontrarem nas condições fisiológicas óptimas, o que se reflecte no desenvolvimento de uma cutícula fina nas suas folhas, ao contrário das folhas provenientes de plantas *ex vitro*, nas quais há necessidade de remover previamente a epiderme abaxial de modo a permitir a penetração da solução enzimática (Bhojwani e Razdan, 1996). É igualmente possível recorrer a folhas jovens resultantes de sementes germinadas *in vitro* (Zhai *et al.*, 2009); no entanto, não asseguram uniformidade genética, pelo que não têm utilidade quando o objectivo é a propagação de genótipos seleccionados (Correia, 2011).

Os protoplastos podem ter dimensões entre 20 μm e os 50 μm de diâmetro (e.g., protoplastos derivados de explantes de *Oryza sativa* e de *Nicotiana tabacum*, respectivamente) (Davey e Anthony, 2010).

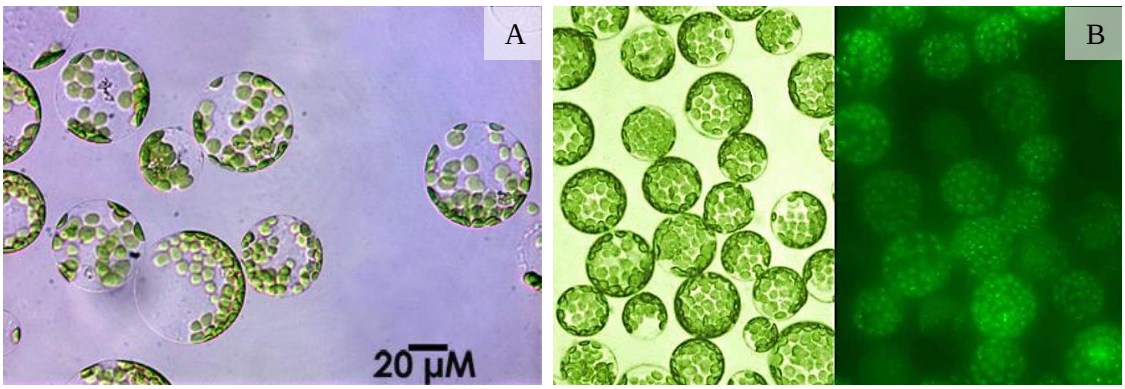


Figura 4. Protoplastos isolados a partir do mesófilo foliar de *Nicotiana tabacum* (A) (http://www.autom8.com/nanion/application/Others/mesophyll-cells.jpg, acedido a 22/06/2014) e de *Arabidopsis thaliana* (B) (Sheen, 2001). A população uniforme de protoplastos de *Arabidopsis* (B) foi observada num microscópio com campo claro (esquerda) e com filtro de fluorescência (direita), usando fluoresceína diacetato (FDA) para detectar os protoplastos viáveis.

Calli ou suspensões celulares embriogénicas também constituem sistemas ideais para a obtenção de protoplastos, pois existe a possibilidade dos protoplastos assim obtidos regenerarem plantas mais facilmente por embriogénese somática (Oliveira e Pais, 1991).

A ausência de uma parede celular funcional pode afectar a permeabilidade do plasmalema. Deste modo, um tratamento inicial de pré-plasmólise (Fig. 5) é aplicado aos tecidos dadores, os quais são sujeitos a um potencial osmótico baixo que leva à diminuição da turgescência das suas células e à separação da membrana plasmática da parede celular (Ferrando e Spiess, 2001; Estavillo *et al.*, 2014). É assim mitigado o choque osmótico aplicado durante o processo de isolamento e bloqueada a entrada de substâncias exógenas prejudiciais para as células. Esta pré-plasmólise pode ser feita com a adição de substâncias não iónicas, tais como hidratos de carbono (manitol, sorbitol, glucose, frutose, galactose ou sacarose), ou de sais inorgânicos, como cloreto de cálcio, cloreto de potássio e sulfato de magnésio (George, 2008). O manitol e o sorbitol são os mais frequentemente usados como estabilizadores osmóticos no isolamento de protoplastos do mesófilo foliar (Navratilova, 2004).

Regra geral, a concentração do estabilizador osmótico ronda os 13% (w/v), mas deve ser ajustada empiricamente de modo a manter os protoplastos numa condição esférica que é adoptada quando se encontram em meio hipertónico (Smith, 1977), uma vez que concentrações inferiores podem resultar na lise celular, enquanto um excesso de agente osmótico pode levar à redução do tamanho dos protoplastos através da plasmólise; quando isto acontece a regeneração da parede celular é inibida e o consequente crescimento é retardado ou mesmo inibido (Bengochea e Dodds, 1986).

A remoção da parede celular pode ser conseguida por métodos mecânicos ou enzimáticos. O primeiro isolamento de protoplastos com sucesso está datado de 1892, no qual von Klercker, através de métodos mecânicos, conseguiu remover as paredes celulares de células plasmolisadas de *Stratiotes aloides* e, posteriormente, de *Allium cepa* (Landgren, 1978; Tomar e Dantu, 2009). No entanto, apenas 70 anos depois, Cocking (1960) retoma as potencialidades desta tecnologia, mas recorrendo a enzimas hidrolíticas (celulases) do fungo fitopatógeno *Myrothecium verrucaria* para a obtenção de protoplastos a partir de células radiculares de *Solanum lycopersicum*. O facto de o método enzimático apresentar um maior rendimento e reprodutibilidade face ao método mecânico (Liu, 2005) e a consequente disponibilidade comercial de enzimas que degradam os componentes da parede celular, deu aso à expansão da sua aplicação a partir de 1970 (Park *et al.*, 2012).

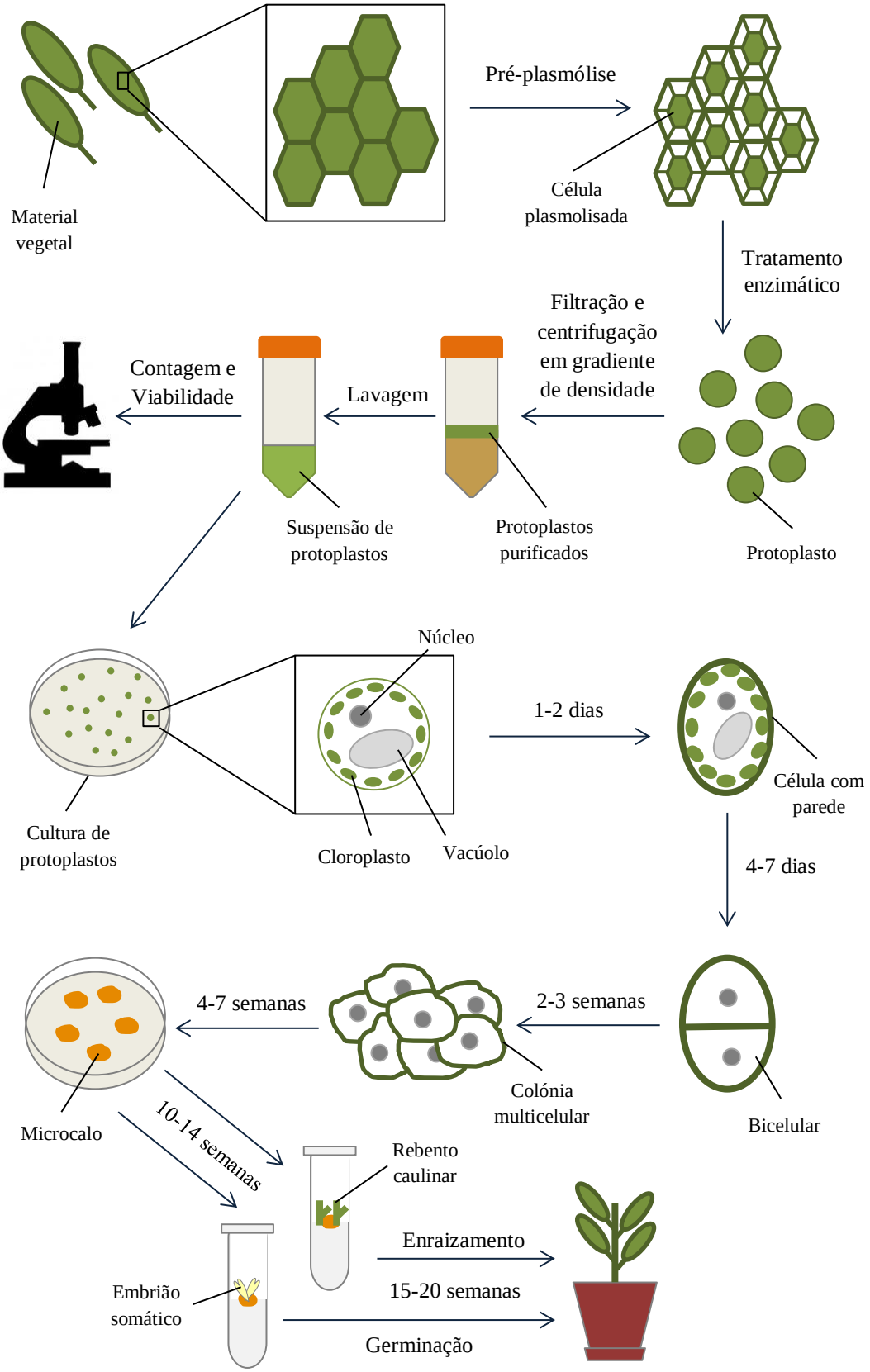


Figura 5. Esquema representativo do isolamento, purificação e cultura de protoplastos. Os períodos referidos para o final de cada fase são apenas indicativos, variando com a origem dos protoplastos e as condições de cultura (adaptado de Canhoto, 2010).

Deste modo, após a pré-plasmólise os explantes são sujeitos a combinações enzimáticas eficientes e de alto rendimento (Fig. 5), tais como celulases e pectinases, obtidas essencialmente a partir de fungos (*Aspergillus*, *Irpex*, *Rhizopus*, *Trichoderma*) ou de bactérias (*Bacillus polymyxa*), e com vista à degradação dos componentes da sua parede celular (Tomé, 1991; Bhojwani e Razdan, 1996).

A parede celular consiste numa complexa mistura de celulose, hemicelulose, pectinas e menores quantidades de minerais, proteínas, lípidos, fenóis e outros hidratos de carbono. As pectinases possuem actividade poligalacturonásica, pelo que são responsáveis pela digestão da lamela média e da matriz da parede primária, enquanto as celulases, compostas por hemicelulase, β-1,4-glucanase, quitinase, lipase, nucleases e pectinase, catalisam a reacção de degradação da celulose e das hemiceluloses. As enzimas mais frequentemente usadas são a celulase "Onozuka" R-10, que foi parcialmente purificada dos fungos *Trichoderma reesei* e *T. viride*, e a pectinase macerozima, que deriva do fungo *Rhizopus arrhizus*. A driselase (extraída de *Irpex lacteus*) é um exemplo de enzima que apresenta simultaneamente actividade celulásica e pectinásica, tendo sido usada com sucesso no isolamento de protoplastos a partir de células em cultura (Chawla, 2010).

A actividade das enzimas é dependente do pH, sendo então o pH das soluções enzimáticas ajustado entre 4,7 e 6,0. Além disso, a temperatura adequada para o isolamento dos protoplastos ronda os 25 a 30 ºC (Chawla, 2010). Tanto a composição das soluções enzimáticas como o período e a temperatura de incubação são variáveis. Geralmente a digestão enzimática ocorre no escuro ou sob luz difusa, e por períodos de incubação curtos (e.g., 2 – 6h) ou longos (e.g., 12 – 20h; *overnight*, Davey e Anthony, 2010).

Para além das enzimas e do estabilizador osmótico já referidos, a solução de isolamento de protoplastos deve ainda conter cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$) ou dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) para a estabilização do plasmalema e, opcionalmente, um tampão (e.g. 2-N-morfino-etano sulfonato [MES]) que minimize as variações de pH (Liu, 2005).

Deve-se ter igualmente em consideração o estado fisiológico do material vegetal. Por vezes, é necessário efectuar um pré-tratamento à planta inteira, uma vez que um grande número de factores, tais como a idade, temperatura, intensidade luminosa ou fotoperíodo, pode afectar não só o *status* metabólico das células, mas também a composição das suas

paredes celulares, o que se vai reflectir tanto no isolamento como na subsequente estabilidade dos protoplastos (Maheshwari *et al.*, 1986).

Na sequência do tratamento enzimático obtém-se uma mistura de tecido não digerido, células plasmolisadas, cloroplastos e outros organitos citoplasmáticos, restos de parede celular e protoplastos. É então necessário proceder à purificação dos protoplastos, a qual é conseguida pela combinação de filtração, centrifugação e lavagem (Giri e Giri, 2007; Fig. 5). Numa primeira fase, a solução resultante da digestão enzimática deve ser filtrada através de crivos de malha metálica ou de nylon com 40 a 100 μm, de modo a reter as células não digeridas e os agregados celulares de maiores dimensões. A solução filtrada contendo os protoplastos e ainda outros detritos celulares, subprotoplastos e vacúolos, é depois purificada através de diferentes vias: i) repetidas ressuspensão / centrifugação dos protoplastos em meio de lavagem, pelo que a velocidade de centrifugação deverá ser ajustada de modo a precipitar os protoplastos (*pellet*) e manter os fragmentos celulares em suspensão (sobrenadante) (Grønlund *et al.*, 2012); ii) passagem da mistura de incubação através de uma malha de poro adequado a deixar apenas passar os protoplastos; iii) centrifugação por gradiente de densidade, que permite a flutuação dos protoplastos numa solução hipertónica. De entre as soluções mais usadas em gradientes de densidade destacam-se a sacarose, o manitol, e compostos de elevado peso molecular, como Percoll e Ficoll 400 (Tomé, 1991; Estavillo *et al.*, 2014).

As concentrações destes compostos que conferem gradientes de densidade e a velocidade e duração do período de centrifugação devem ser optimizados para cada situação, pois existem diferenças consideráveis nos rendimentos obtidos com o mesmo material vegetal de diferentes cultivares de uma mesma espécie (Canhoto, 2010). Depois de recolhidos os protoplastos purificados, deve-se efectuar a remoção completa da solução enzimática que ainda poderá ter sido recolhida juntamente com os protoplastos. Para tal, os protoplastos são centrifugados ainda a uma velocidade inferior de modo a sedimentarem (*pellet*). As centrifugações devem ser feitas quantas vezes as necessárias para remover totalmente as enzimas, uma vez que se o objectivo é a cultura de protoplastos, é possível que as enzimas inibam a regeneração da parede celular e a consequente divisão celular (George, 2008).

Depois de purificados os protoplastos, deve-se proceder à sua contagem e à determinação da viabilidade.

A contagem dos protoplastos (Fig. 5) pode ser facilmente realizada usando um hemocitómetro (http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf, acedido a 23/03/2015), extrapolando-se os valores obtidos para o volume total de meio onde se encontram os protoplastos. Deste modo, é possível calcular o rendimento do processo, i.e., determinar a quantidade de protoplastos obtida a partir do material vegetal inicial, o que é crucial para a fase de cultura, pois implica que os protoplastos sejam cultivados a determinadas densidades (Tomé, 1991). Se a concentração for reduzida, é necessário optimizar os processos de digestão e purificação dos protoplastos de forma a aumentar os rendimentos. Se, pelo contrário, a quantidade de protoplastos obtida for muito elevada, tem que se diminuir a sua densidade pela adição de meio de cultura adequado. Além disso, a viabilidade dos protoplastos também permite verificar se as condições de isolamento e purificação são as ideais. Caso a viabilidade seja reduzida, é necessário proceder a alterações no procedimento experimental que permitam aumentar a concentração de células viáveis.

Um indicador muito fiável da viabilidade dos protoplastos derivados do mesófilo foliar está relacionado com a forma como os cloroplastos estão distribuídos na célula. Em protoplastos viáveis, os cloroplastos distribuem-se uniformemente, enquanto em células mortas eles têm tendência a depositar por acção da gravidade (Canhoto, 2010).

Avaliações mais precisas e objectivas da viabilidade dos protoplastos são conseguidas recorrendo a corantes vitais, tais como fluoresceína diacetato (FDA), Evans blue, fenosafranina (Franklin e Dixon, 1994) e cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (Watanabe *et al.*, 1992).

Outras observações podem ser efectuadas, tais como: i) observação de movimentos de ciclose como evidência de um metabolismo activo, ii) variação das dimensões dos protoplastos em resposta a alterações do potencial osmótico do meio, iii) análise da autofluorescência da clorofila (vermelha) usando microscopia de fluorescência, iv) absorção de oxigénio medido através de um eléctrodo de oxigénio e indicativo de um activo metabolismo respiratório, e v) estudos de fotossíntese (Chawla, 2010).

Contudo, a viabilidade dos protoplastos é indubitavelmente confirmada através da sua capacidade para desdiferenciar e ressintetizar a parede celular, entrar em sucessivas divisões mitóticas e regenerar plantas (Eeckhaut *et al.*, 2013; Fig. 5). No entanto, a totipotência nem sempre se expressa, pois algumas células perdem esta competência

durante a cultura. Algumas células são mais receptivas do que outras a estímulos que condicionam a sua desdiferenciação. Geralmente, a competência morfogénica depende de três factores, que são: i) genótipo da planta; ii) estado ontogenético do explante inicial; iii) e as condições de cultura em que os protoplastos e as suas células derivadas são mantidos. O último inclui a composição do meio de cultura e as condições físicas de crescimento (Davey and Anthony, 2010).

Os protoplastos de diferentes espécies e inclusivamente diferentes tecidos da mesma planta podem ter requisitos nutritivos distintos. Consequentemente, o meio óptimo para a cultura de protoplastos com vista à regeneração de plantas deve ser determinado empiricamente. Regra geral, os meios de cultura de protoplastos são muito semelhantes em composição aos utilizados em cultura *in vitro*, baseando-se assim nos meios MS (Murashige e Skoog, 1962) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), mas aos quais é conveniente adicionar um estabilizador osmótico que previna o seu rebentamento (Giri e Giri, 2007; Kärkönen *et al.*, 2011).

Durante a cultura, a maioria dos protoplastos isolados de células altamente diferenciadas entra rápida e imediatamente em processo de desdiferenciação ao mesmo tempo que inicia a síntese de uma nova parede celular (24 – 36 h) após a sua transferência para um meio de cultura adequado, perdendo a sua característica forma esférica (Kärkönen *et al.*, 2011; Figs. 5 e 6).

No entanto, até regenerarem totalmente a parede celular pode ser preciso a presença de agentes osmóticos metabolicamente activos (e.g. glucose e sacarose) juntamente com metabolicamente inertes (e.g. manitol) (Chawla, 2010). As substâncias activas vão sendo gradualmente metabolizadas pelos protoplastos durante a fase inicial de regeneração da parede celular, resultando numa redução gradual do estabilizador osmótico. Isto elimina alterações bruscas no potencial osmótico quando os protoplastos são colocados num meio de cultura para a regeneração de plantas (Davey *et al.*, 2005).

Os fitorreguladores, tais como auxinas e citocininas, são essenciais para o crescimento e iniciação e manutenção da divisão celular dos protoplastos, apesar de em *Daucus carota* e *Arabidopsis* apenas ser necessária a presença de auxinas (Dovzhenko *et al.*, 2003).

Figura 6. Após alguns dias em cultura, os protoplastos isolados a partir do mesófilo foliar de *N. tabacum* (A) regeneram a sua parede celular e entram em divisão (B) (Kärkönen *et al.*, 2011).

A maioria dos protoplastos, tal como as suspensões celulares, têm uma densidade de plaqueamento óptima de acordo com o seu potencial de divisão, que se situa entre 5 x 10^3 e 10^6 protoplastos/ml (Chawla, 2010). Os protoplastos isolados podem ser cultivados num meio de cultura líquido, ou embebidos em meio semi-sólido ou sólido adequado contendo agar, agarose ou alginato (Tomar e Dantu, 2009; Ayala *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2015).

A coloração com Calcofluor White (CFW) permite detetar a viabilidade das células. O CFW liga-se a β-glicanos (nomeadamente a celulose) da parede celular sintetizada *de novo*, emitindo um anel de fluorescência branco azulada que envolve as células quando observado num microscópio de fluorescência com filtro de excitação UV (Hervé *et al.*, 2011). Além disso, se os protoplastos apresentarem uma birrefringência quando observados ao microscópio óptico pode ser uma referência à regeneração da parede celular (Davey e Anthony, 2010).

A divisão celular e a citocinese são concomitantes à formação da parede celular. Ocasionalmente não ocorre citocinese, devido provavelmente a uma parede celular incompleta, dando origem a células binucleadas que poderão não ter capacidade de prosseguir com a divisão celular (Smith, 1977).

Nagata e Takebe (1971) foram capazes de induzir *calli* a partir de culturas de protoplastos, utilizando folhas de *Nicotiana tabacum* como explante. Posteriormente, aplicando o mesmo sistema, foi conseguida a regeneração de plantas morfologicamente normais (apesar de a maioria apresentar aberrações cromossómicas numéricas) a partir destes mesmos *calli*, ficando assim demonstrada a totipotência dos protoplastos (Takebe *et al.*, 1971). Geralmente, a formação de plantas a partir de protoplastos ocorre após a passagem por uma fase de *callus*, sendo raras as situações em que um protoplasto pode originar directamente um embrião somático sem se formar um *callus* intermédio (Canhoto, 2010). Assim, uma vez obtidos *calli* com as dimensões apropriadas é necessário aplicar estímulos hormonais adequados à formação de rebentos caulinares (por indução de organogénese) ou de embriões somáticos (por indução de embriogénese somática) (Liu, 2005).

1.3.1. Importância como *single - cell systems*: aplicações

Actualmente já existem inúmeros protocolos de isolamento e cultura de protoplastos, em condições de assepsia, para uma variada gama de culturas em larga escala de mono- e dicotiledóneas com interesse agro - económico (Davey *et al.*, 2005; Thorpe, 2006). Para além do seu interesse do ponto de vista da cultura de plantas, os protoplastos constituem uma ferramenta versátil ao serem sistemas *single - cell*, i.e., entidades celulares isoladas capazes de sintetizar *de novo* a parede celular e regenerar (sob condições adequadas) uma planta, expressando o seu potencial de totipotência (Davey *et al.*, 2005; Sugiyama, 2015). Este facto é de considerável vantagem, pois não só a propagação *in vitro* em larga escala das linhas clonais de interesse se torna mais eficiente, como também as torna adequadas para técnicas de manipulação genética, nomeadamente variação somaclonal, citometria de fluxo, hibridação somática e transformação genética (Giri e Giri, 2007). Também constituem um sistema experimental para uma gama larga de estudos bioquímicos e moleculares, desde estudos sobre propriedades de crescimento das células individuais até transporte membranar (Park *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de protocolos de isolamento de protoplastos de uma variada gama de tecidos vegetais possibilitou a aplicação de técnicas de citometria de fluxo e *cell*

sorting no estudo de processos de crescimento e desenvolvimento vegetal. Um dos requisitos fundamentais para o funcionamento dos citómetros de fluxo é a disponibilidade de suspensões celulares com formas isodiamétricas, na medida em que esta técnica envolve medições de populações de células isoladas (Galbraith, 2014). Com a excepção dos grãos de pólen e dos micrósporos, os protoplastos permanecem o único exemplo, dentro das plantas superiores, de suspensões de células isoladas que se adequam a uma análise de citometria de fluxo. Além disso, é possível adaptar técnicas de citometria de fluxo e de *fluorescence-activated cell sorting* para a análise de protoplastos vegetais sem interferir na sua viabilidade (Galbraith, 2014).

Uma das razões da aplicação da citometria de fluxo a sistemas de protoplastos vegetais derivou do interesse generalizado pela hibridação somática por fusão induzida de protoplastos (Galbraith, 1989). É igualmente importante referir o contributo do desenvolvimento e optimização de protocolos de isolamento de protoplastos nos programas de melhoramento de culturas com interesse agro - económico através da hibridação somática. A fusão de protoplastos permitiu ultrapassar as barreiras de incompatibilidade reprodutora entre as espécies, por forma a obter híbridos somáticos passíveis de serem regenerados em novas plantas com as características desejadas (Giri e Giri, 2007). Para que haja uma eficiente fusão entre os protoplastos dos dois genótipos distintos é necessário recorrer a métodos químicos (e.g. polietilenoglicol [PEG]) ou físicos (e.g. electrofusão) (Thorpe, 2006; Park *et al.*, 2012). Melchers *et al.* (1978) relataram a regeneração de híbridos somáticos resultantes da fusão entre protoplastos de batateira (*Solanum tuberosum*) e de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), cujo cruzamento interespecífico em condições naturais não era possível.

A utilização de tecnologias que se baseiam em protoplastos tem decaído nos últimos 20 anos. Este declínio deve-se, em parte, ao ênfase que é dado aos métodos de transferência de DNA mediado por *Agrobacterium* ou biolística (Davey and Anthony, 2010). No entanto, o isolamento e cultura de protoplastos continuam a ser fundamentais para estudos de expressão transiente de genes (Yoo *et al.*, 2007).

A incorporação de segmentos de DNA em protoplastos está na base da transformação não só dos genomas nucleares (transiente ou estável), como também dos genomas plastidiais. A partir da década de 90 começaram a surgir trabalhos de investigação baseados na transferência directa de DNA para protoplastos (Gad *et al.*, 1990; Karesch *et al.*, 1991; Negrutiu *et al.*, 1990; Neuhaus e Spangenberg, 1990), a qual permite

a inserção de mais do que um segmento de DNA exógeno no mesmo ou em vectores separados. Esta transformação de protoplastos implica a abertura de poros nas membranas celulares para a introdução do DNA pretendido, através de i) tratamentos com PEG na presença de catiões divalentes (e.g. iões cálcio); ii) electroporação; iii) microinjecção. Este método de transformação directa foi crucial na transferência de DNA em espécies recalcitrantes a outros métodos (e.g. mediado por *Agrobacterium tumefaciens)*, nomeadamente os cereais, mas para os quais já estavam estabelecidos sistemas de regeneração de plantas a partir de protoplastos (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Contudo, o facto de a probabilidade de transformação ser muito baixa (1 em 10^4 protoplastos origina um transformante estável) reitera a necessidade de haver eficientes sistemas de selecção dos protoplastos transformados e da consequente regeneração de plantas (Davey *et al.*, 2005).

Além disso, a expressão génica transiente em protoplastos, que já foi utilizada em várias espécies vegetais para além de *A. thaliana*, demonstrou ser uma importante e versátil ferramenta para uma rápida análise funcional de um determinado gene, localização subcelular de uma proteína e para manipulações bioquímicas (Yoo *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2014). Os protoplastos são usados em estudos de expressão transiente pois são capazes de serem transformados com material estranho, tal como DNA plasmídico, RNA ou vírus e expressar elevados níveis dos seus produtos génicos 24 h após a inoculação (Nagata *et al.*, 1981; Kikkawa *et al.*, 1982). Com o advento do gene repórter *GFP* foi possível identificar protoplastos com potencial para a embriogénese somática, revelado por Chesnokov *et al.* (2002), cujos protoplastos isolados, derivados do mesófilo de *Nicotiana plumbaginifolia*, foram previamente transformados com a construção *GFP*.

Há vantagens na transformação do genoma cloroplastidial relativamente à do genoma nuclear e que passam por uma maior capacidade de síntese de proteínas heterólogas, bem como pela ausência de efeitos de natureza epigenética nas plantas regeneradas (Bock, 2001; Daniell *et al.*, 2002). A primeira transformação de cloroplastos ocorreu por introdução de construções de DNA (mediada por PEG) em protoplastos de *N. tabacum* (Golds *et al.*, 1993; O'Neill *et al.*, 1993; Koop *et al.*, 1996). É provável que esta tecnologia assuma uma maior importância com a possibilidade de extrapolar os protocolos experimentais existentes para organismos modelo como *N. tabacum* para culturas com interesse económico, com o intuito de levar à produção de proteínas recombinantes em larga escala (Maliga, 2003).

Na actual geração das biotecnologias ómicas, os protoplastos demonstraram novamente o seu potencial de *single-cell system* ao poderem contribuir para avanços significativos na genómica, transcritómica, proteómica e metabolómica (Davey *et al.*, 2005).

Em suma, as potencialidades dos protoplastos como *single - cell systems* tornam cada vez mais importante a sua aplicação a plantas com crescente interesse comercial e biotecnológico, como é o caso do tamarilho.

1.4. Objectivos

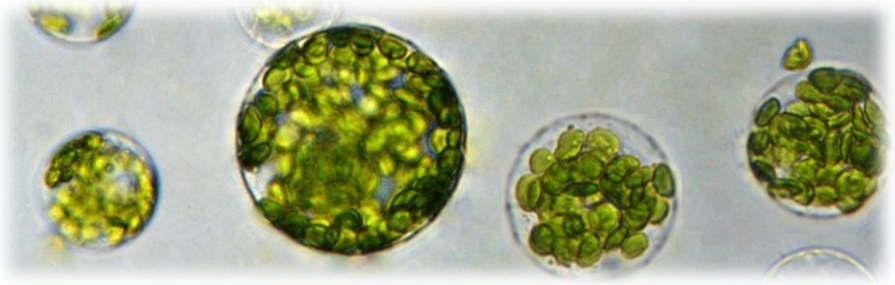
O tamarilho é uma espécie cujo interesse económico e biotecnológico tem vindo a crescer significativamente nos últimos anos. As particularidades nutritivas dos seus frutos são uma característica apelativa para a produção desta planta como espécie frutícola. Além disso, o seu potencial biotecnológico como sistema modelo alternativo para o estudo de aspectos chave do processo de indução de embriogénese somática tem sido demonstrado através de diversos resultados obtidos. Sendo uma espécie para a qual foram já desenvolvidos protocolos eficientes de micropropagação, nomeadamente através de embriogénese somática, e alguns dos quais associados à regeneração de plantas geneticamente modificadas, torna-se de extrema importância alargar esse leque de tecnologias através do desenvolvimento de um protocolo de isolamento, cultura e regeneração de plantas a partir de protoplastos de tamarilho. As potencialidades desta tecnologia com importantes aplicabilidades, quer em processos de melhoramento, quer de análise molecular da espécie, irão contribuir como novas ferramentas para a cultura do tamarilho e também reforçar o seu papel como sistema modelo numa perspectiva de investigação em ciência fundamental.

Deste modo, o trabalho de investigação desenvolvido teve como principal objetivo a optimização e estabelecimento de protocolos optimizados de isolamento e purificação de protoplastos de tamarilho, com vista à sua aplicação em trabalhos futuros de regeneração *in vitro* de plantas a partir desses protoplastos, tendo por base estudos preliminares iniciados neste laboratório (Tomé *et al.*,1992; Guimarães *et al.*, 1996). Após a optimização da

metodologia de obtenção de protoplastos do mesófilo foliar, a sua aplicação alargou-se a outros tipos de explantes iniciais, nomeadamente calos embriogénicos e não embriogénicos e explantes embriogenicamente induzidos, de forma a aumentar a abrangência do protocolo desenvolvido e a possibilitar a sua utilização em processos de melhoramento da espécie ou em ensaios direccionados para estudos de biologia molecular e de expressão de genes relacionados com a competência embriogénica.

O estabelecimento destes protocolos é um pré-requisito para o desenvolvimento de estudos subsequentes, nomeadamente: i) eficiente regeneração *in vitro* a partir dos protoplastos foliares; ii) transformação genética a partir da utilização de protoplastos; ii) análises de biologia molecular ao nível de *single - cell analysis*; iii) genómica funcional; e iv) melhoramento vegetal (e.g., obtenção de híbridos somáticos por fusão entre protoplastos diplóides e tetraplóides).

2. MATERIAL E MÉTODOS



2.1. Material Vegetal

Para a realização deste trabalho experimental utilizou-se material vegetal previamente estabelecido em cultura *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, nomeadamente três linhas clonais diplóides (denominadas TD1, TD2 e TD3) (Fig. 7A) e uma linha tetraplóide (designada por TT) (Fig. 7B). A linha tetraplóide foi obtida a partir da linha diplóide TD1 por tratamento com colquicina (Antunes, 2010).

Recorreu-se também a *calli* embriogénico e não embriogénico (linhas CE e CNE, respectivamente) (Figs. 7C e 7D), obtidos em meio de indução de embriogénese somática em explantes foliares de plantas da linha TD1 (Correia, 2011), bem como a explantes foliares da mesma linha TD1 após 6 semanas de indução.

2.2. Métodos

2.2.1. Precondicionamento do material vegetal

a) Explantes foliares das linhas diplóides e tetraplóides

As plantas previamente estabelecidas *in vitro* foram micropropagadas a partir da proliferação de meristemas axilares. Os segmentos nodais foram inoculados em meio base MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose a 3% (w/v) e 6-benzilaminopurina (BAP) a 0,2 mg/l, sendo o pH ajustado a 5,6-5,8. O meio de cultura, designado por MSBA, foi solidificado com agar a 0,6% (w/v) e autoclavado a 121ºC, durante 20 minutos. Dez a doze segmentos nodais foram inoculados por cada caixa de cultura (Microbox Combiness, 97 x 80 mm, com filtro XXL) com cerca de 90 ml de meio. As culturas foram colocadas numa câmara de crescimento, sob as seguintes condições:

24±1 ºC de temperatura e um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, sendo a intensidade luminosa 15-20 μmol.m^{-2}.s^{-1}. Este material foi subcultivado com uma periocidade de 3 a 4 semanas, sendo posteriormente transferido para um meio de cultura MS com a mesma composição (excepto BAP) e pH, de modo a permitir uma maior expansão foliar e a constante disponibilidade destes explantes para a realização dos ensaios de isolamento de protoplastos. Seis a sete plântulas foram inoculadas em cada caixa de cultura (Microbox Combiness, 97 x 120 mm, com filtro XXL) com 100 ml do referido meio de cultura MS.

b) Explantes embriogenicamente induzidos

As folhas apicais mais jovens e expandidas, com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, foram excisadas dos rebentos caulinares da linha TD1 inoculados em meio de cultura MSBA. Cada uma das folhas foi seccionada em 4 segmentos, procedendo-se de seguida ao ferimento aleatório da sua face abaxial, com o auxílio de um bisturi. Dez a doze segmentos foram colocados com a face abaxial em contacto com 60 ml de meio de indução de embriogénese em caixas de cultura (Microbox Combiness, 97 x 50 mm, com filtro XXL). O meio de indução – meio TP – é constituído por meio base MS, suplementado com sacarose a 9% (w/v) e picloram a 5 mg/l, e cujo pH foi ajustado a 5,6 – 5,8. O meio TP foi gelificado com Phytagel (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,25% (w/v) e autoclavado a 121 ºC durante 20 minutos. As culturas foram incubadas em estufa a 24±1 ºC, no escuro.

c) *Calli* embriogénico e não embriogénico

A manutenção e proliferação *in vitro* das linhas de calo embriogénico e não embriogénico previamente estabelecidas foram feitas através de subculturas sucessivas em meio de cultura TP fresco. Com uma periodicidade de 3 a 4 semanas, transferiram-se massas de *callus* (cerca de 40 mg) para 50 ml de meio TP líquido em balões Erlenmeyer de 100 ml. As massas celulares foram colocadas em cultura numa incubadora com agitação orbital (120 rpm), a 25 ºC e no escuro. Os *calli* em meio líquido foram igualmente

repicados em papel de filtro estéril colocado sobre 15 ml de meio TP sólido em caixas de Petri (100 mm x 20 mm). As culturas foram incubadas em estufa a 24±1 ºC, no escuro.

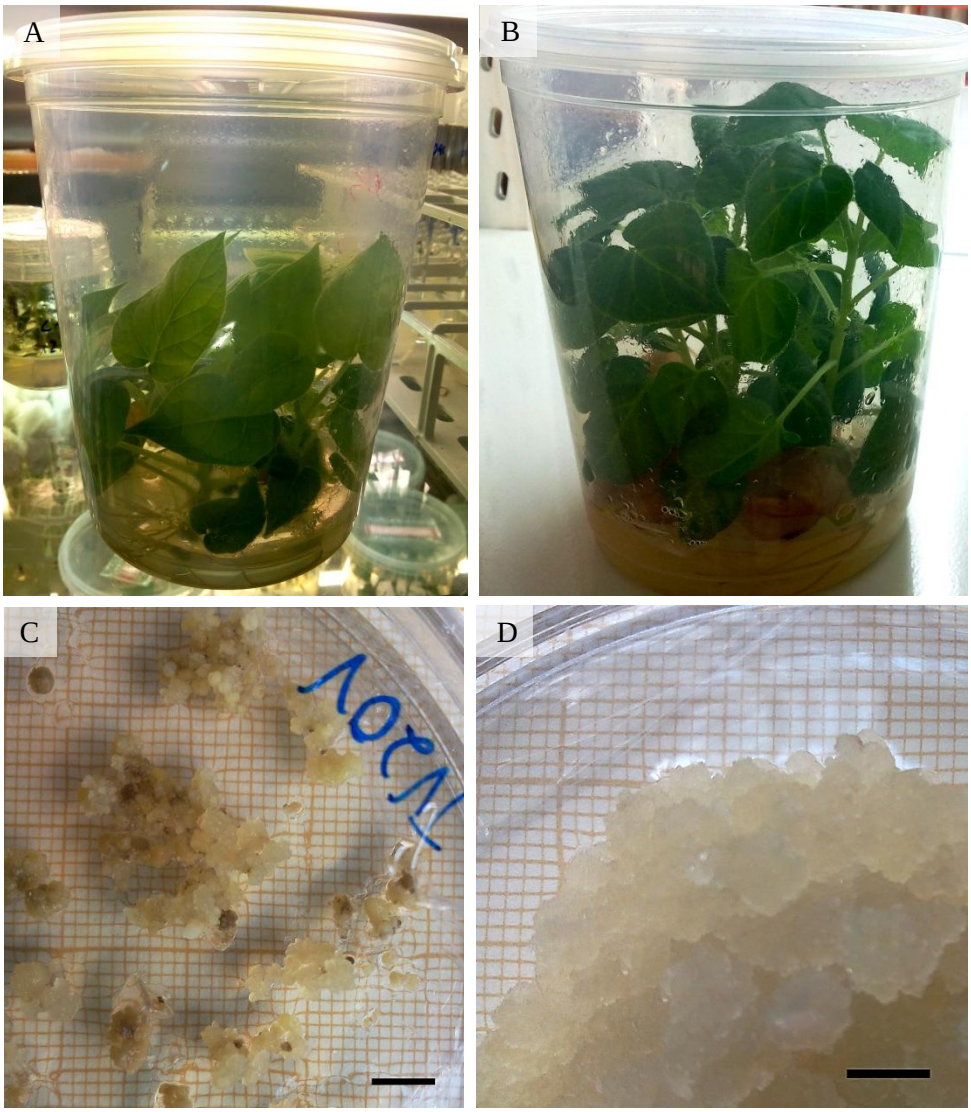


Figura 7. Material vegetal de tamarilho utilizado para o isolamento de protoplastos. Plantas das linhas TD1 (A) e TT (B) com 4 - 6 semanas em meio MS e *calli* CE (C) e CNE (D) após 6 semanas em meio TP gelificado. As barras nas figuras C e D correspondem a 5mm.

2.2.2. Isolamento e purificação de protoplastos

a) A partir de explantes foliares

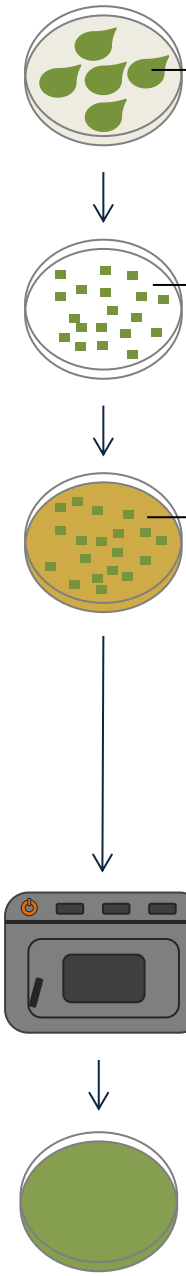
Este procedimento teve como base o protocolo de isolamento e purificação de protoplastos a partir de folhas de *Solanum lycopersicum* descrito por Horváth (2009). É de salientar que todo o processo foi realizado em condições de assepsia. As soluções abaixo mencionadas foram esterilizadas por filtração através de filtros de seringa de malha de acetato de celulose com 0,20 μm (Ministart NML, Sartorius, Alemanha). As plantas foram colocadas no escuro 1 a 3 dias antes da realização dos ensaios.

Após 4 a 6 semanas em meio MS, 1 g de peso fresco de folhas jovens bem expandidas e sem pecíolos das linhas diplóides TD (TD1, TD2 e TD3) e tetraplóide TT (Fig. 8) foi colocado numa caixa de Petri (100 mm x 20 mm) com 15 ml de solução K3 – sacarose a 0,4 M (adaptado de Nagy e Maliga, 1976) (Tabela 1). O pH da solução K3 foi ajustado a 5,5 antes da adição da sacarose. As nervuras centrais foram removidas e as folhas cortadas em segmentos de 2 a 3 mm^2.

Após 10 minutos de incubação na solução de pré-plasmólise, esta foi substituída por 15 ml de solução enzimática. A solução enzimática era composta por celulase "Onozuka" R-10 (Yakult Pharmaceuticals, Japão) e macerozima R-10 (Yakult Pharmaceuticals, Japão), dissolvidas em meio K3 – sacarose a 0,4 M, sendo o pH ajustado a 5,7. Foram testadas diferentes concentrações de celulase (1,5% e 2% w/v) e de macerozima (0,25%, 0,50% e 0,75% w/v), por forma a determinar a influência de cada combinação enzimática no rendimento e viabilidade dos protoplastos obtidos (tratamentos 1B a 1G – Tabela 2; Fig. 8). A solução enzimática contendo celulase a 2% (w/v) e macerozima a 0,5% (w/v) (tratamento 1B – Tabela 2) foi aquela que melhores rendimentos proporcionou, pelo que todo o procedimento subsequente foi efectuado de acordo com esta combinação enzimática.

O efeito da temperatura/duração da digestão enzimática em condições de escuridão também foi testado. Para tal, as réplicas foram incubadas numa estufa com agitação orbital

a: i) 27 ºC, *overnight* (14 – 16 h), 30 rpm (tratamento 1B – Tabela 2); ii) 30 ºC, 6 h, 40 rpm (tratamento 1H – Tabela 2); e iii) 30 ºC, 7 h, 40 rpm (tratamento 1I – Tabela 2).



Solução enzimática (15ml)

Celulase (% w/v)	Macerozima (% w/v)	Tratamento
1,5	0,25	1E
	0,50	1F
	0,75	1G
2,0	0,25	1C
	0,50	1B
	0,75	1D

Incubação enzimática (escuro)

	Tratamento
27 ºC, *overnight*, 30 rpm	1B
30 ºC, 6h, 40 rpm	1H
30 ºC, 7h, 40 rpm	1I

Figura 8. Representação esquemática do isolamento de protoplastos a partir de explantes foliares.

Tabela 1. Composição química do meio de pré-plasmólise, K3 – sacarose a 0,4M, e dos meios de cultura Mprot, B5 e MS.

	K3 – sacarose 0,4M pH 5,5	**Mprot** pH 5,8	**B5** pH 5,8	**MS** pH 5,8
Macronutrientes		mg/l		
KNO_3	2500,0	2500,0	2500,0	1900,0
NH_4NO_3	250,0	---	---	1650,0
$(NH_4)_2SO_4$	134,0	134,0	134,0	---
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	900,0	450,0	150,0	440,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250,0	250,0	250,0	370,0
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	150,0	170,0	150,0	---
$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	---	100,0	---	---
KH_2PO_4	---	---	---	170,0
Micronutrientes		mg/l		
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10,0	13,2	10,0	22,3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0	2,0	2,0	8,6
H_3BO_3	3,0	3,0	3,0	6,2
KI	0,75	0,75	0,75	0,83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,25	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,025
Fonte de Ferro		mg/l		
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,3	37,3	37,3	37,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	27,8	27,8	27,8
Compostos Orgânicos		mg/l		
Glicina	---	---		2,0
Ácido nicotínico	1,0	1,0	1,0	0,5
Piridoxina • HCl	1,0	1,0	1,0	0,5
Tiamina • HCl	10,0	10,0	10,0	0,1
Mio-inositol	100,0	100,0	100,0	100,0
Açúcares		g/l		
Xilose	0,250	---	---	---
Sacarose	136,92	1,0	10,0	10,0
Glucose	---	18,0	18,0	18,0
Manitol	---	100,0	100,0	100,0
PGRs		mg/l		
2,4-D	---	0,1	0,1	0,1
NAA	---	1,0	1,0	1,0
BAP	---	1,0	1,0	1,0

Dois métodos de purificação foram aplicados às soluções resultantes da incubação enzimática dos explantes foliares (Fig. 9), de modo a separar os protoplastos dos restantes tecidos degradados ou não digeridos. Numa primeira abordagem, a solução foi filtrada através de um crivo de malha metálica de 70 μm. O filtrado foi transferido equitativamente para 2 tubos de centrífuga Greiner de 12 ml (Sigma-Aldrich), sobre o qual se adicionou, cuidadosamente, 2 ml de solução W5 (9,0 g/l de NaCl, 18,4 g/l de $CaCl_2.2H_2O$, 0,8 g/l de KCl e 1 g/l de glucose, a pH 5,8; adaptado de Menczel *et al.*, 1981). Efetuou-se uma centrifugação a 100 *g*, fazendo-se variar o tempo em 5 e 10 minutos (tratamentos 1A e 1B, respectivamente – Tabela 2). Neste método, os protoplastos purificados constituem uma banda interfásica que se forma após a centrifugação entre as 2 camadas líquidas, sendo recolhidos com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferidos para um novo tubo de centrífuga. Juntou-se 5 ml da solução W5 e ressuspendeu-se suavemente. Efetuou-se uma nova centrifugação a 50 *g*, durante 5 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* ressuspendido em 5 ml de W5, repetindo-se a última centrifugação.

Num segundo método de purificação (adaptado de Grønlund *et al.*, 2012), o material vegetal digerido foi filtrado através de um filtro de malha de nylon de 70 μm (Fisherbrand, Fisher Scientific) para tubos Falcon de 50 ml (Corning). Adicionou-se 4 ml da solução de lavagem W5 e testou-se 2 sequências de centrifugação: i) 100 *g* – 10 min, 50 *g* – 5 min (tratamento 1J – Tabela 2), e ii) 300 *g* – 5 min, 300 *g* – 5 min (tratamento 1K – Tabela 2). Entre cada centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* ressuspendido suavemente em 5 ml da solução W5. Após a segunda centrifugação, removeu-se o sobrenadante, estimou-se o volume de suspensão de protoplastos e fez-se a contagem de protoplastos. Posteriormente, filtrou-se a suspensão celular através de um filtro de malha de nylon de 40 μm (Fisherbrand, Fisher Scientific), realizou-se uma nova contagem dos protoplastos obtidos e ressuspendeu-se com W5 por forma a obter o volume final pretendido (Fig. 9).

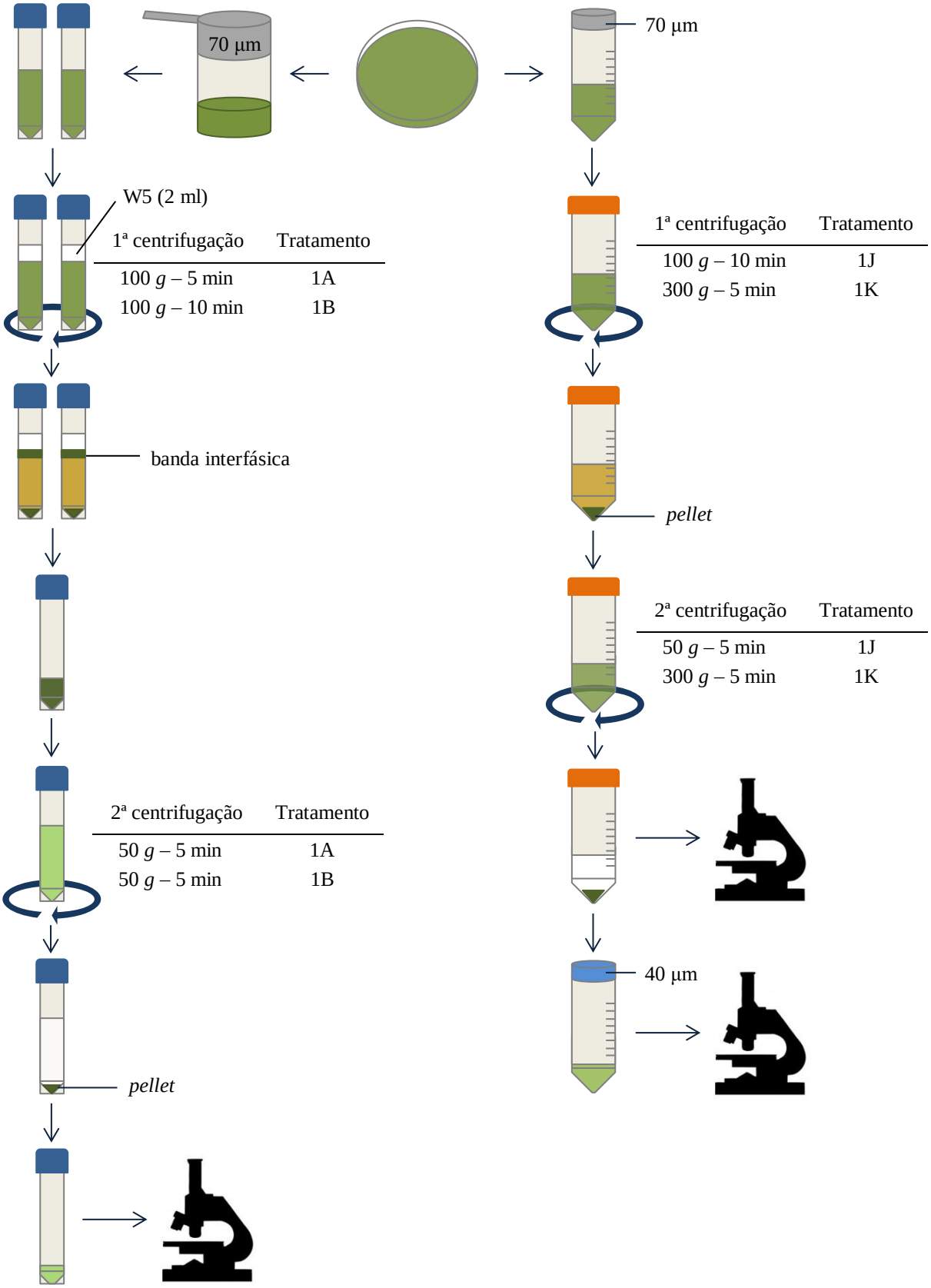


Figura 9. Representação esquemática dos 2 métodos de purificação de protoplastos obtidos a partir de explantes foliares.

Tabela 2. Resumo dos tratamentos de isolamento e purificação utilizados para a obtenção de protoplastos a partir de explantes foliares. Legenda: cel – celulase; mac – macerozima.

	TRATAMENTO 1					
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
Material vegetal (1 g PF)	Folhas de TD	Folhas de TD e TT	Folhas de TD e TT	Folhas de TD e TT	Folhas de TD e TT	Folhas de TD e TT
Pré-tratamento material vegetal	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro
Pré-plasmólise (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,5)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS						
Solução enzimática (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,7)	cel 2%, mac 0,5%	cel 2%, mac 0,5%	cel 2%, **mac 0,25%**	cel 2%, **mac 0,75%**	**cel 1,5%**, mac 0,25%	**cel 1,5%**, mac 0,5%
Temperatura (ºC)	27	27	27	27	27	27
Duração (h)	14 – 16	14 – 16	14 – 16	14 – 16	14 – 16	14 – 16
Agitação orbital (rpm)	30	30	30	30	30	30
PURIFICAÇÃO DE PROTOPLASTOS						
1ª Filtragem (μm)	70	70	70	70	70	70
1ª Centrifugação	100 *g* 5 min Banda interfásica	100 *g* **10 min** Banda interfásica	100 *g* 10 min Banda interfásica	100 *g* 10 min Banda interfásica	100 *g* 10 min Banda interfásica	100 *g* 10 min Banda interfásica
2ª Centrifugação	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min
2ª Filtragem (μm)	---	---	---	---	---	---

Tabela 2 (cont.). Resumo dos tratamentos de isolamento e purificação utilizados para a obtenção de protoplastos a partir de explantes foliares. Legenda: cel – celulase; mac – macerozima.

	TRATAMENTO 1 (continuação)				
	G	**H**	**I**	**J**	**K**
Material vegetal (1 g PF)	Folhas de TD e TT	Folhas de TD e TT	Folhas de TD e TT	Folhas de TD	Folhas de TD
Pré-tratamento material vegetal	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro	1 – 3 dias ao escuro
Pré-plasmólise (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,5)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS					
Solução enzimática (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,7)	**cel 1,5%**, mac 0,75%	cel 2%, mac 0,5%	cel 2%, mac 0,5%	cel 2%, mac 0,5%	cel 2%, mac 0,5%
Temperatura (ºC)	27	30	30	27	27
Duração (h)	14 – 16	**6**	**7**	14 – 16	14 – 16
Agitação orbital (rpm)	30	40	40	30	30
PURIFICAÇÃO DE PROTOPLASTOS					
1ª Filtragem (μm)	70	70	70	**70**	70
1ª Centrifugação	100 *g* 10 min Banda interfásica	100 *g* 10 min Banda interfásica	100 *g* 10 min Banda interfásica	100 *g* 10 min ***Pellet***	**300 *g*** 5 min ***Pellet***
2ª Centrifugação	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	300 *g* 5 min
2ª Filtragem (μm)	---	---	---	**40**	40

b) A partir de *calli* e explantes embriogenicamente induzidos

Três a quatro dias antes da realização de cada ensaio, os calos foram repicados para meio TP líquido fresco. Tanto os explantes embriogenicamente induzidos como os *calli* foram incubados em caixas de Petri com 15 ml de solução enzimática (Fig. 10). Diferentes composições enzimáticas foram testadas primeiramente com a linha CE, tendo-se utilizado celulase "Onozuka" R-10 (Yakult Pharmaceuticals, Japão) a 1% (w/v) e variado as concentrações de pectinase (Sigma-Aldrich), driselase (Fluka AG, Buchs SG, Suíça) e macerozima R-10 (Yakult Pharmaceuticals, Japão) (tratamentos 2A a 2D – Tabela 3); as enzimas foram dissolvidas em meio K3 – sacarose a 0,4 M (Tabela 1) e o pH da solução ajustado a 5,7. A composição enzimática a partir da qual se obteve um maior rendimento foi celulase a 1% (w/v), driselase a 0,2% (w/v) e pectinase a 0,02% (w/v) (tratamento 2D – Tabela 3), pelo que todos os passos subsequentes para a obtenção de protoplastos se basearam nesta solução enzimática.

Com o objetivo de determinar a influência da temperatura/duração da incubação enzimática, as amostras foram colocadas numa estufa com agitação orbital e no escuro, sob as seguintes condições: i) 25 ºC, *overnight* (20 – 22 h), a 30 rpm; ii) 27 ºC, *overnight* (14 – 16 h), a 30 rpm; e iii) 30 ºC, 6 h 30 min, em vácuo (dentro de um excicador), a 40 rpm (tratamentos 2D, 2F e 2G, respectivamente – Tabela 3).

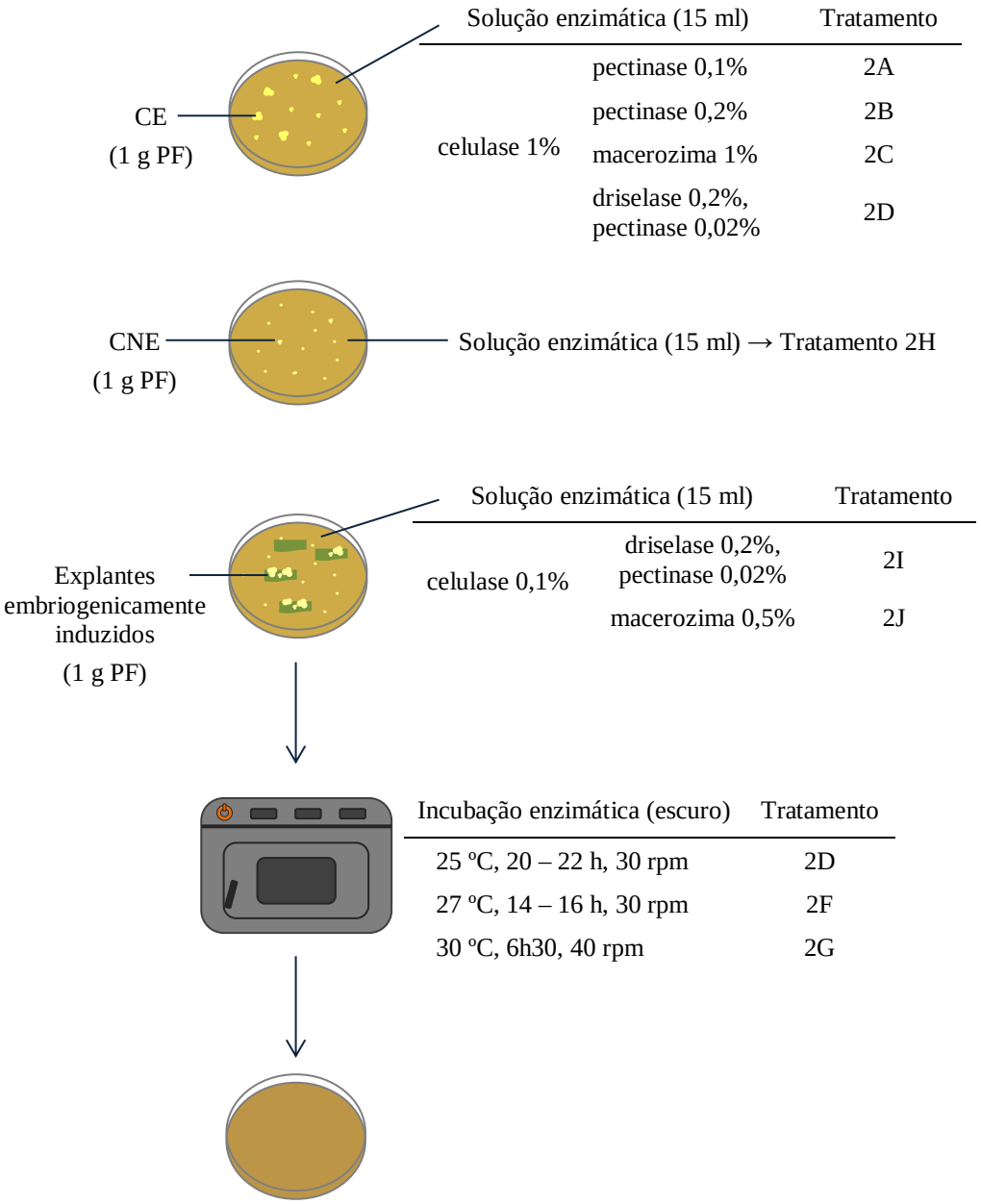


Figura 10. Representação esquemática do isolamento de protoplastos, a partir de explantes embriogenicamente induzidos e *calli*.

De seguida, aplicou-se um método de purificação de protoplastos idêntico ao descrito para os explantes foliares (Fig. 11). O material vegetal digerido foi filtrado através de filtros de malha de nylon de 70 μm (Fisherbrand, Fisher Scientific) para tubos Falcon de 50 ml (Corning), adicionando-se posteriormente 4 ml da solução de lavagem W5. Verificou-se a influência da velocidade de centrifugação, realizando-se para tal 2 sequências de centrifugação distintas: i) uma sequência já estabelecida para os protoplastos obtidos a partir dos explantes foliares, 100 *g* – 10 min, 50 *g* – 5 minutos (tratamento 2D – Tabela 3), e ii) 300 *g* – 5 min, 300 *g* – 5 min (tratamento 2E – Tabela 3).

Após a segunda centrifugação, removeu-se o sobrenadante, estimou-se o volume de suspensão de protoplastos e efectuou-se a contagem de protoplastos. Nos tratamentos 2F e 2G (Tabela 3) filtrou-se ainda a suspensão celular através de um filtro de malha de nylon de 40 μm (Fisherbrand, Fisher Scientific), fez-se uma nova contagem dos protoplastos obtidos e ressuspendeu-se com W5 por forma a obter o volume final pretendido.

Estipulou-se o tratamento 2F (Tabela 3) na linha CE como padrão, pelo que se aplicou os mesmos parâmetros ao calo CNE e aos explantes embriogenicamente induzidos (tratamento 2H e 2I, respectivamente – Tabela 3).

Para o tecido embriogenicamente induzido, dada a sua condição de transição de explante foliar para tecido caloso, testou-se também a mesma combinação enzimática estabelecida para a obtenção de protoplastos a partir de folhas (tratamento 2J – Tabela 3).

Na Figura 12, estão representados os explantes de tamarilho que foram utilizados para o isolamento de protoplastos, bem como os passos de manipulação necessários até alcançar a sua purificação.

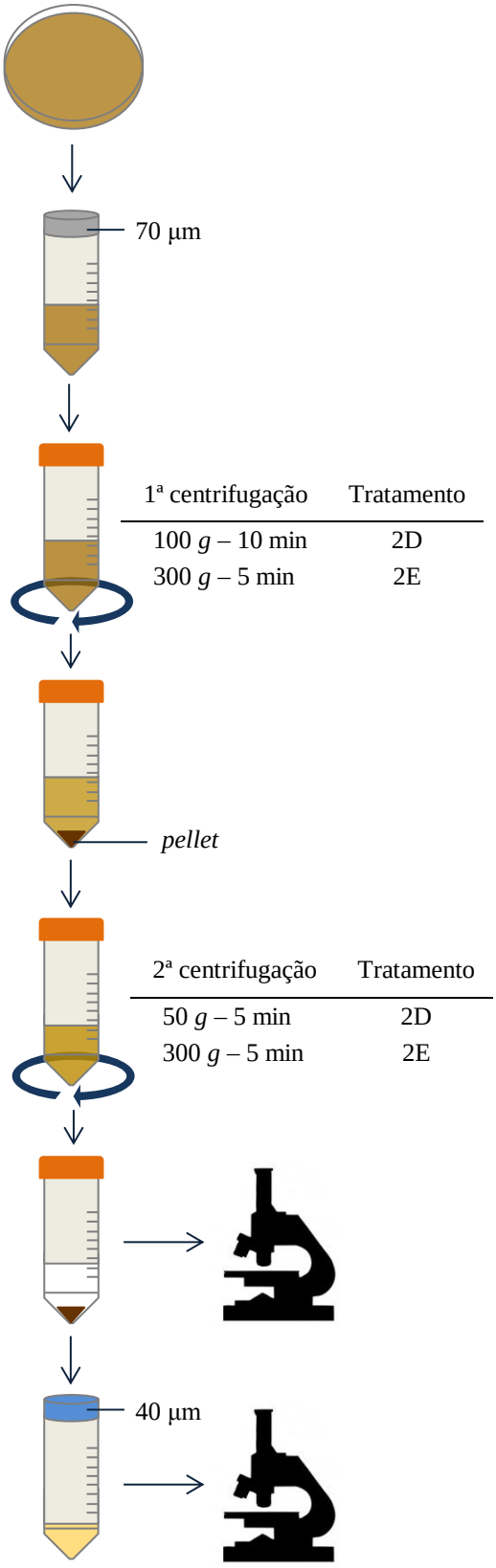


Figura 11. Representação esquemática do método de purificação de protoplastos a partir de explantes embriogenicamente induzidos e *calli*.

Tabela 3. Resumo dos tratamentos de isolamento e purificação utilizados para a obtenção de protoplastos a partir de *calli* e de explantes embriogenicamente induzidos. Legenda: cel – celulase; mac – macerozima; pect – pectinase; dris – driselase.

	TRATAMENTO 2				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**
Material vegetal (1 g PF)	calo CE	calo CE	calo CE	calo CE (ou 0,5 g PF)	calo CE
Pré-tratamento material vegetal	3 – 4 dias meio TP fresco	3 – 4 dias meio TP fresco	3 – 4 dias meio TP fresco	3 – 4 dias meio TP fresco	3 – 4 dias meio TP fresco
Pré-plasmólise (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,5)	Não	Não	Não	Não	Não
ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS					
Solução enzimática (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,7)	cel 1%, pect 0,1%	cel 1%, pect 0,2%	cel 1%, mac 1%	cel 1%, dris 0,2%, pect 0,02%	cel 1%, dris 0,2%, pect 0,02%
Temperatura (ºC)	25	25	25	25	25
Duração (h)	20 - 22	20 - 22	20 - 22	20 - 22	20 - 22
Agitação orbital (rpm)	30	30	30	30	30
PURIFICAÇÃO DE PROTOPLASTOS					
1ª Filtragem (μm)	70	70	70	70	70
1ª Centrifugação	100 *g* 10 min ***Pellet***	100 *g* 10 min ***Pellet***	100 *g* 10 min ***Pellet***	100 *g* 10 min ***Pellet***	300 *g* 5 min ***Pellet***
2ª Centrifugação	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	300 *g* 5 min
2ª Filtragem (μm)	---	---	---	---	---

Tabela 3 (cont.). Resumoesumo dos tratamentos de isolamento e purificação utilizados para a obtenção de protoplastos a partir de *calli* e de explantes embriogenicamente induzidos. Legenda: cel – celulase; mac – macerozima; pect – pectinase; dris – driselase.

	TRATAMENTO 2 (continuação)				
	F	**G**	**H**	**I**	**J**
Material vegetal (1 g PF)	calo CE	calo CE (0,5 g PF)	calo CNE (0,5 g PF)	Tecido embriogenicamente induzido	
Pré-tratamento material vegetal	3 – 4 dias meio TP fresco	3 – 4 dias meio TP fresco	3 – 4 dias meio TP fresco	---	---
Pré-plasmólise (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,5)	Não	Não	Não	Não	Não
ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS					
Solução enzimática (K3 – sacarose 0,4M) (pH 5,7)	cel 1%, dris 0,2%, pect 0,02%	cel 1%, dris 0,2%, pect 0,02%	cel 1%, dris 0,2%, pect 0,02%	cel 1%, dris 0,2%, pect 0,02%	cel 2%, mac 0,5%
Temperatura (ºC)	27	30	27	27	27
Duração (h)	14 - 16	6h30	14 - 16	14 - 16	14 - 16
Agitação orbital (rpm)	30	40	30	30	30
PURIFICAÇÃO DE PROTOPLASTOS					
1ª Filtragem (μm)	70	70	70	70	70
1ª Centrifugação	100 *g* 10 min ***Pellet***	100 *g* 10 min ***Pellet***	100 *g* 10 min ***Pellet***	100 *g* 10 min ***Pellet***	100 *g* 10 min ***Pellet***
2ª Centrifugação	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	50 *g* 5 min	100 *g* 5 min
2ª Filtragem (μm)	40	40	---	40	40

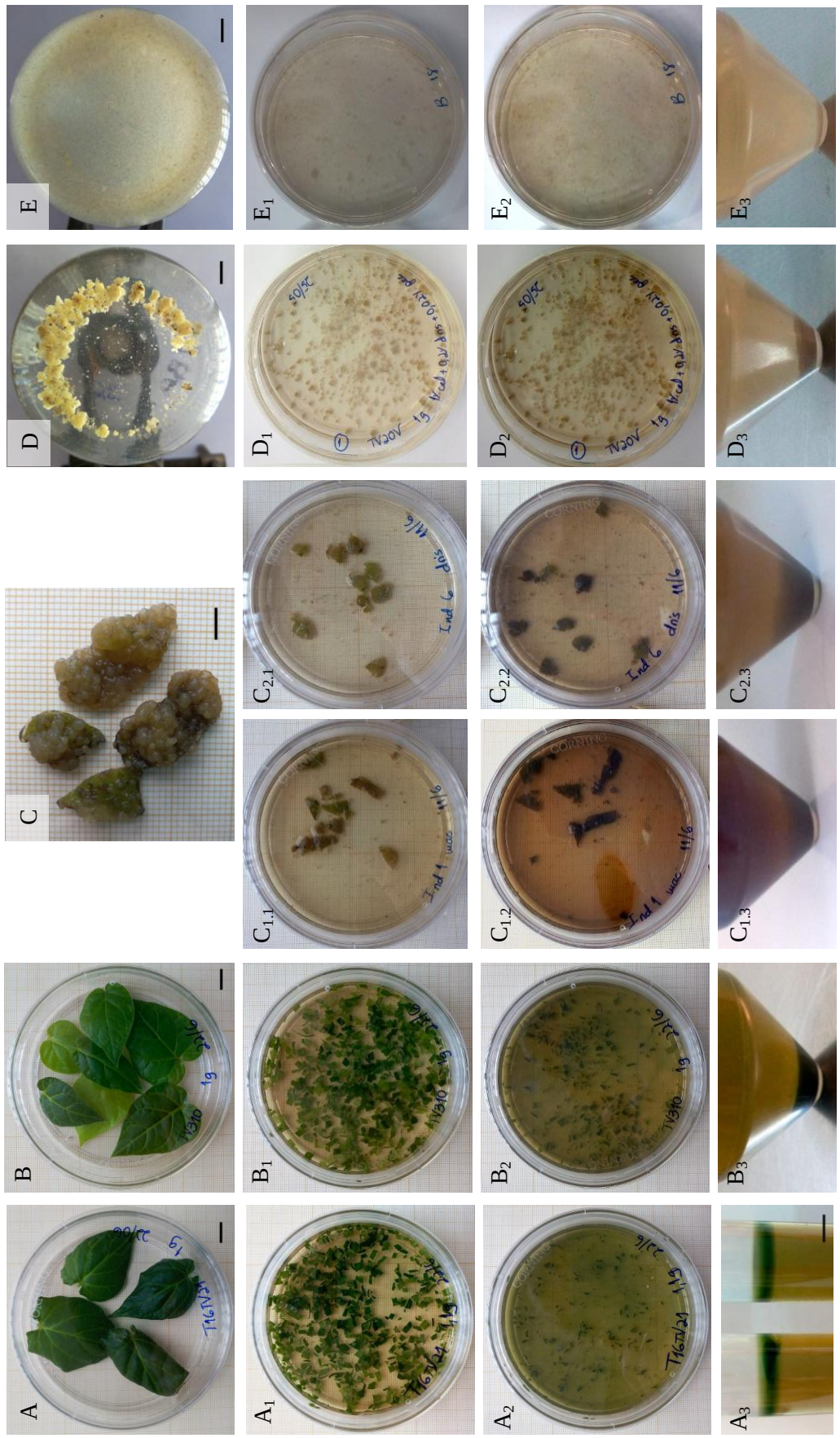


Figura 12. Explantes utilizados no isolamento e purificação de protoplastos obtidos a partir de explantes foliares dos genótipos TT (A) e TD1 (B), embriogenicamente induzidos de TD1 (C) e dos *calli* das linhas CE (D) e CNE (E). Em cada coluna, da esquerda para a direita, estão constituídos os passos dos Tratamentos 1B ($A_1 – A_3$), 1J ($B_1 – B_3$), 2J ($C_{1.1} – C_{1.3}$), 2I ($C_{2.1} – C_{2.3}$),, 2F ($D_1 – D_3$) e 2H ($E_1 – E_3$) (Tabelas 2 e 3).

2.2.3. Contagem e determinação da viabilidade dos protoplastos

Procedeu-se à determinação da concentração (c.c.) dos protoplastos em suspensão, recorrendo a um hemocitómetro, com 0,10 mm de profundidade e 2 câmaras de contagem. Em cada uma destas câmaras, procedeu-se à contagem das células nos 5 quadrados assinalados a azul na Figura 13A. Dentro de cada quadrado azul, fez-se uma contagem em *zig-zag*, como mostra a Figura 13B. No caso dos protoplastos se situarem nos limites inferior e direito de cada quadrado, estes não são tidos em conta para a contagem (Fig. 13C).

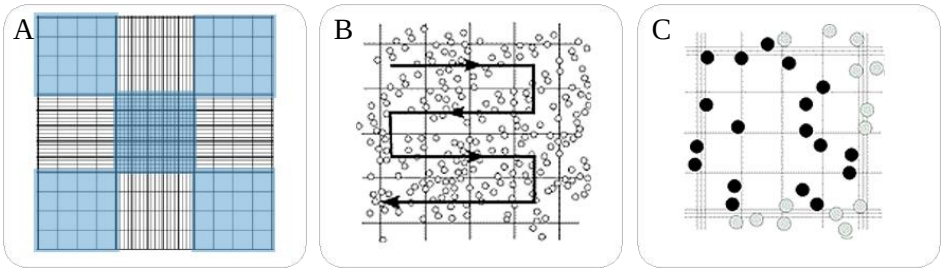


Figura 13. Câmara de contagem do hemocitómetro. São necessários pelo menos 5 quadrados (a azul, A) para efectuar uma estimação significativa do número de protoplastos em suspensão. Deve proceder-se a uma contagem em *zig-zag* por forma a considerar todos os protoplastos existentes no campo de visão (B), não se devendo ter em conta os protoplastos localizados sobre os limites inferior e direito do quadrado (C).

A observação foi feita num microscópio óptico (Nikon Eclipse E400), sendo as imagens captadas com a câmara Nikon Digital Sight DS-U1 e com o software Act-U.

Estimou-se igualmente a viabilidade dos protoplastos, usando o corante Evans blue (Sigma-Aldrich) a 0,4% (w/v) (Ling *et al.*, 2010), tendo a osmolaridade da solução sido ajustada com sacarose a 0,4 M. Ressuspendeu-se suavemente 15 µl da solução de Evans blue – sacarose a 0,4 M com 15 µl da suspensão de protoplastos. Aplicou-se posteriormente 10 µl em cada uma das câmaras de contagem do hemocitómetro.

Após a contagem dos protoplastos totais e viáveis, calculou-se a concentração, c.c. (protoplastos.ml^{-1}) de cada um destes,

$$c.c. = \frac{\sum(protoplastos\ em\ 5\ quadrados\ da\ câmara\ de\ contagem)\ \times 10^4}{5 \times\ factor\ de\ diluição \times 1/2}$$

e o número de protoplastos:

$$\#protoplastos = c.c. \times volume\ inicial\ da\ suspensão\ de\ protoplastos\ (ml)$$

O rendimento do processo de isolamento e purificação de protoplastos, η (protoplastos . g PF^{-1}), viáveis e totais, para cada uma das réplicas constantes do ensaio realizado foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\eta = \frac{\#protoplastos}{massa\ (PF)\ de\ material\ vegetal\ (g)}$$

A viabilidade dos protoplastos foi estimada como a percentagem do número de células viáveis relativamente ao número total de células observado no mesmo campo, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%viabilidade = \frac{\#protoplastos\ viáveis}{\#protoplastos\ totais} \times 100$$

2.2.4. Cultura de protoplastos

Após a contagem e determinação da c.c. de protoplastos totais, procedeu-se à diluição da suspensão com meio de cultura de modo a obter uma concentração de plaqueamento de 5 – 7 x 10^5 protoplastos.ml^{-1}. Dois meios de cultura foram inicialmente testados – MS (Murashige e Skoog, 1962) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968) –, suplementados com 2,4-D a 0,1 mg/l, NAA a 1,0 mg/l e BAP a 1,0 mg/l, e sacarose a 10% (w/v) (Tabela 1). Também se testou os meios Mprot (Reinert e Yeoman, 1982) e Mprot suplementado com sacarose a 10% (w/v) (Ayala *et al.*, 2011).

No caso dos meios MS e B5, apenas se testou a cultura em meio líquido, tendo-se adicionado iguais volumes de suspensão de protoplastos e do respectivo meio de cultura em caixas de Petri (60 mm x 20 mm). Após 3 dias de cultura, fez-se a diluição das suspensões de protoplastos com o dobro do volume de meio de cultura utilizado.

Os meios Mprot, gelificados com agarose tipo VII (Sigma-Aldrich) a 1,2% (w/v), foram previamente aquecidos a 40 ºC (Fig. 14). Ao volume de suspensão de protoplastos foi adicionado igual volume deste meio de cultura e cefotaxima a 250 µg/ml (d'Utra Vaz *et al.*, 1993), ressuspendendo a mistura suavemente com uma pipeta de plástico (ponta larga). Aplicou-se esta mistura em forma de 4 a 5 *droplets* (aproximadamente com 1 cm de diâmetro) numa caixa de Petri (60 mm x 20 mm). Após a gelificação das *droplets*, adicionou-se 3 ml de meio Mprot líquido. As culturas de protoplastos foram incubadas em estufa a 28 ºC, ao escuro, durante 10 dias, sendo depois transferidas para uma câmara de crescimento a 24±1 ºC, com fotoperíodo 16h luz / 8h escuro, mas com fraca intensidade luminosa. Após 15 dias, o meio Mprot – sacarose a 10% (w/v) líquido foi substituído por um meio Mprot – sacarose a 3% (w/v) líquido, devendo-se proceder a esta substituição de 2 em 2 semanas. A evolução das culturas foi seguida regularmente, tendo em atenção aspectos como a formação de parede celular, a viabilidade das células e a sua entrada em divisão celular.

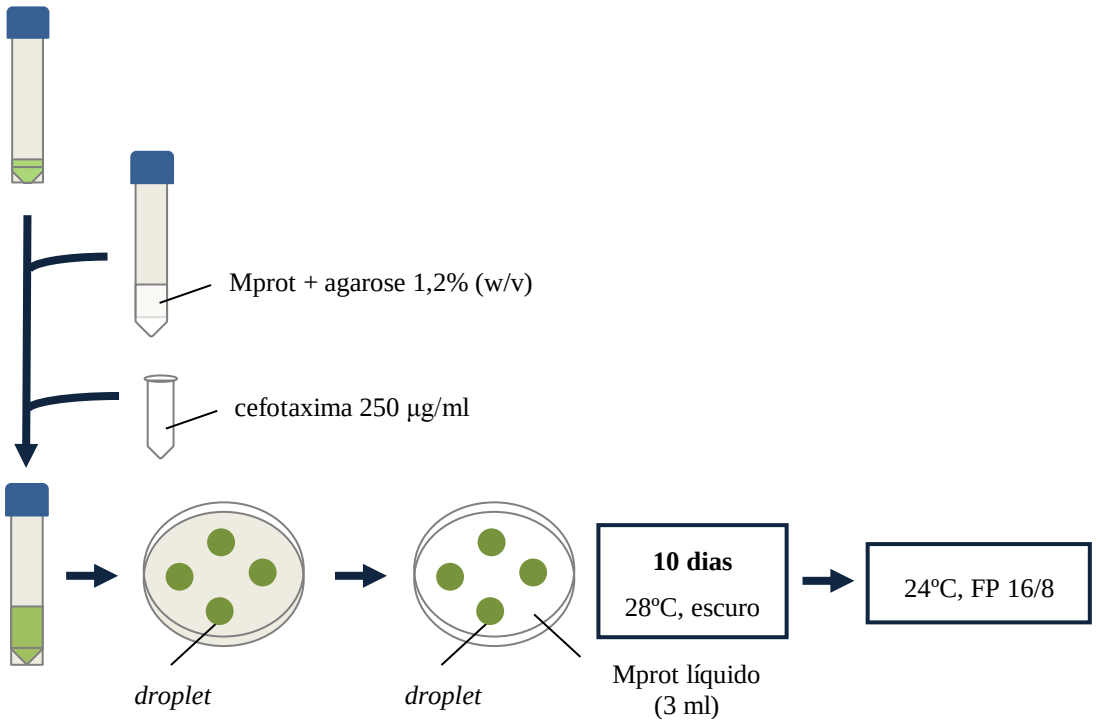


Figura 14. Cultura de protoplastos obtidos a partir de explantes foliares.

2.2.5. Extracção e análise da qualidade de RNA total dos protoplastos

a) Extracção e quantificação de RNA total dos protoplastos

Este procedimento foi adaptado de Yadav *et al.* (2013) e para a extracção do RNA total dos protoplastos provenientes das linhas TD1, CE, CNE e do tecido embriogenicamente induzido foi utilizado o kit Nucleospin RNA plant (Macherey-Nagel, Alemanha). As suspensões celulares foram mantidas em gelo, adicionando-se tampão RAP até perfazer 3 ml de volume final. Adicionou-se β-mercaptoetanol a 1% (v/v) e seguidamente 1,5 ml de etanol a 70% (v/v) (mantido previamente em gelo). Nas etapas de ligação do RNA à membrana, digestão de DNA, dessalinização e lavagem da membrana e eluição do RNA, seguiu-se as indicações do manual do kit acima mencionado. A quantidade de RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria em Nanodrop 2000c.

b) Avaliação da qualidade do RNA por electroforese

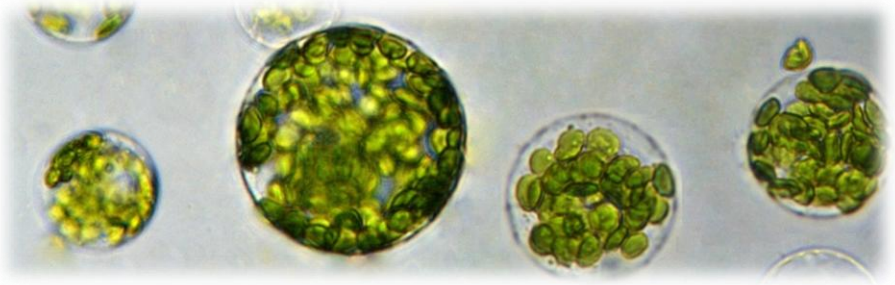
Todo o material utilizado na electroforese foi tratado *overnight* em de água bidestilada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% (v/v). A água bidestilada tratada com DEPC foi posteriormente recolhida e autoclavada duas vezes a 121ºC durante 20 minutos.

O gel para electroforese foi preparado com agarose a 1,2% (w/v) em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) (1x). Dissolveu-se a agarose por aquecimento e depois arrefeceu-se a cerca de 65 ºC antes de se adicionar 4 µl do corante Midori Green (Nippon Genetics) por cada 100 ml de gel. Foram carregados em gel 375 ng de RNA total não desnaturado de cada amostra. A electroforese foi feita com a aplicação de 80V, à temperatura ambiente, durante cerca de 2 horas, usando como padrão de peso molecular 12 µl do Hyperladder^{TM} I (Bioline).

2.2.6. Análise estatística

Para cada tratamento, foram efectuadas pelo menos 2 réplicas. Na determinação do rendimento de protoplastos de cada réplica procedeu-se pelo menos a 3 contagens independentes no hemocitómetro. Fez-se a análise de variância dos dados (ANOVA) e as médias e desvios padrão foram estatisticamente comparados usando o teste de Fisher (*Least Significant Difference*, LSD) ($p < 0,05$). Para a comparação de valores médios entre 2 tratamentos independentes usou-se o teste paramétrico t de *Student* bicaudal ($p < 0,05$). Os dados foram analisados através do GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., EUA).

3. RESULTADOS



3.1. Isolamento e purificação de protoplastos

a) A partir de explantes foliares

Com o intuito de optimizar um protocolo de isolamento e purificação de protoplastos a partir de explantes foliares das linhas diplóides e tetraplóides, foram analisados vários parâmetros, nomeadamente a combinação enzimática, temperatura e duração da incubação enzimática, e os métodos de purificação. Deste modo, foi possível determinar, quer o rendimento, quer a percentagem de viabilidade dos protoplastos obtidos em cada tratamento realizado, a partir de 1 grama de peso fresco de folhas.

É importante referir que plantas das 3 linhas diplóides (TD1, TD2, TD3) foram utilizadas aleatoriamente num mesmo tratamento, visto que o objectivo não era ter em conta o efeito de cada tratamento num determinado genótipo, mas sim na condição de diploidia, de modo a estabelecer subsequentes comparações com a linha tetraplóide TT. Assim, independentemente do genótipo diplóide utilizado como réplica, serão genericamente designados por TD.

No tratamento 1A (Tabela 2), após a 1ª centrifugação efectuada, verificou-se a existência de partículas ainda em suspensão no sobrenadante, as quais poderiam ser protoplastos que, devido à duração da centrifugação (5 min.), não haviam ainda sido integrados na banda interfásica formada entre as 2 soluções. Deste modo, procedeu-se primeiro à averiguação do tempo da 1ª centrifugação, testando-se também 10 min. (tratamento 1B – Tabela 2). Verificou-se que uma centrifugação a 100 *g* durante 10 min. (2,041±0,293 x 10^6 protoplastos / g PF) em vez de 5 min. (3,666±0,276 x 10^5 protoplastos / g PF), aumentou significativamente o rendimento de protoplastos obtidos (Fig. 15).

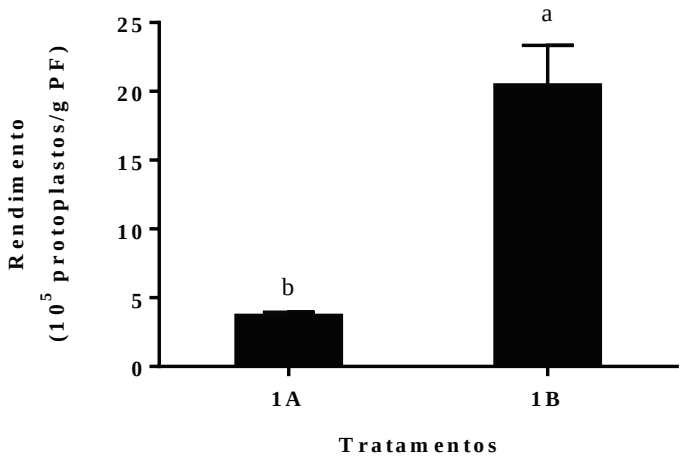


Figura 15. Efeito dos diferentes tempos de duração da 1ª centrifugação a 100 *g* (tratamentos 1A, 5 min. e 1B, 10 min.) no rendimento dos protoplastos obtidos a partir de explantes foliares das linhas TD. Os valores correspondem à média ± desvio padrão de 3 réplicas. Os valores com letras diferentes são significativamente diferentes, segundo o teste paramétrico t de *Student* bicaudal, ($p < 0,05$).

Após esta verificação, testou-se o efeito da combinação enzimática no rendimento e viabilidade dos protoplastos das linhas TD e TT. Para tal, recorreu-se a soluções com celulase a 2% (w/v), variando a concentração de macerozima: 0,25, 0,5 e 0,75% (w/v) (respectivamente, tratamentos 1C, 1B e 1D – Tabela 2).

Dentro de cada nível de ploidia, não se observaram diferenças significativas nos rendimentos entre os tratamentos (Fig. 16A). No entanto, a solução contendo celulase a 2% (w/v) e macerozima a 0,5% (w/v), foi aquela que proporcionou um maior rendimento (2,041±0,293 x 10^6 protoplastos / g PF) para a linha TD, pois tendo em conta a ordem de grandeza, representou cerca de 1 milhão de protoplastos a mais do que nos tratamentos C e D (1,194±0,499 e 1,336±1,035 x 10^6 protoplastos / g PF, respectivamente). Constatou-se também que, para o mesmo tratamento, o número de protoplastos obtidos para a linha TT foi sempre inferior ao da linha TD.

Além disso, os tratamentos entre si não interferiram significativamente na viabilidade dos protoplastos das linhas TD (Fig. 16B). No entanto, para a linha TT a

viabilidade dos protoplastos isolados no tratamento 1C foi significativamente superior do à do tratamento 1D.

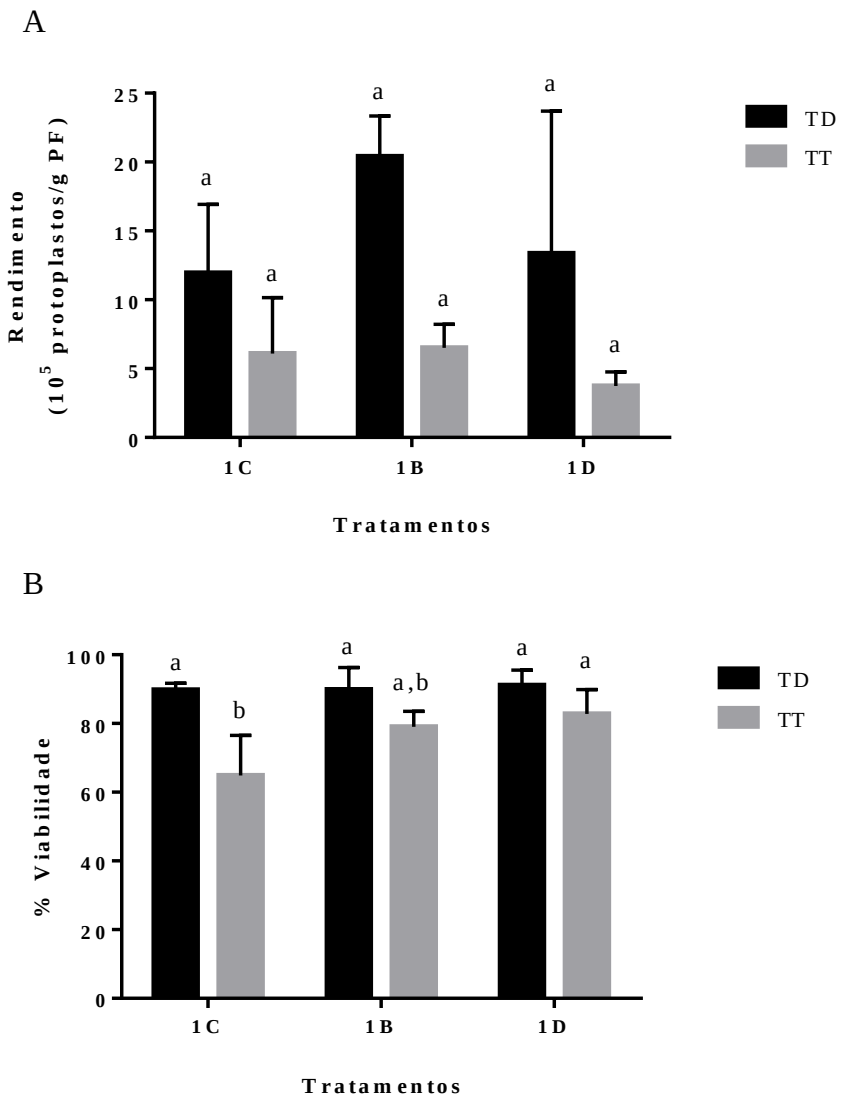


Figura 16. Influência das diferentes combinações enzimáticas (tratamentos 1B a 1D no rendimento (A) e viabilidade (B) dos protoplastos obtidos a partir de explantes foliares de TD e TT. Os valores apresentados são relativos à média ± desvio padrão de 3 réplicas. Os valores com a mesma letra, para a mesma linha, não são significativamente diferentes (segundo o teste LSD, $p < 0,05$).

Nos tratamentos em que se testaram as combinações enzimáticas com celulase a 1,5% (w/v) e se variou a concentração de macerozima (0,25; 0,5; 0,75% w/v), verificou-se que, apesar de as células observadas ao microscópio óptico já apresentarem uma forma esférica característica dos protoplastos, ainda se observava uma birrefringência em certas porções da célula indicativa de que a digestão enzimática da parede celular havia sido incompleta. Deste modo, não se inferiu nem o rendimento nem a viabilidade dos protoplastos relativamente aos tratamentos 1E a 1G (Tabela 2).

No que respeita à combinação temperatura/duração da digestão enzimática realizada em condições de escuridão, três tratamentos foram avaliados. Para as digestões enzimáticas sujeitas a 30 ºC e a uma agitação orbital de 40 rpm, observou-se a tonalidade da solução enzimática (acastanhado translúcido) ao fim de 4, 5, 6 e 7 h. Apenas a partir da 6ª h de incubação enzimática é que se verificou que esta solução apresentava uma tonalidade esverdeada, indicativa da libertação dos protoplastos. Deste modo, os tratamentos (Tabela 2) consistiram na combinação 30 ºC / 6 h / 40 rpm (1H) e 30 ºC /7 h/ 40 rpm (1I), os quais foram comparados entre si e com o tratamento 1B já obtido anteriormente (27 ºC / *overnight* / 30 rpm).

Nas linhas TD, o tratamento 1B foi significativamente diferente dos tratamentos 1H e 1I (Fig. 17A). Pelo contrário, para a linha TT o tratamento 1H proporcionou um rendimento maior do que o 1I, não se registando diferenças significativas entre estes e o tratamento *overnight* 1B. Relativamente à viabilidade em cada tratamento (Fig. 17B), quer para TD, quer para TT, não foram registadas diferenças significativas.

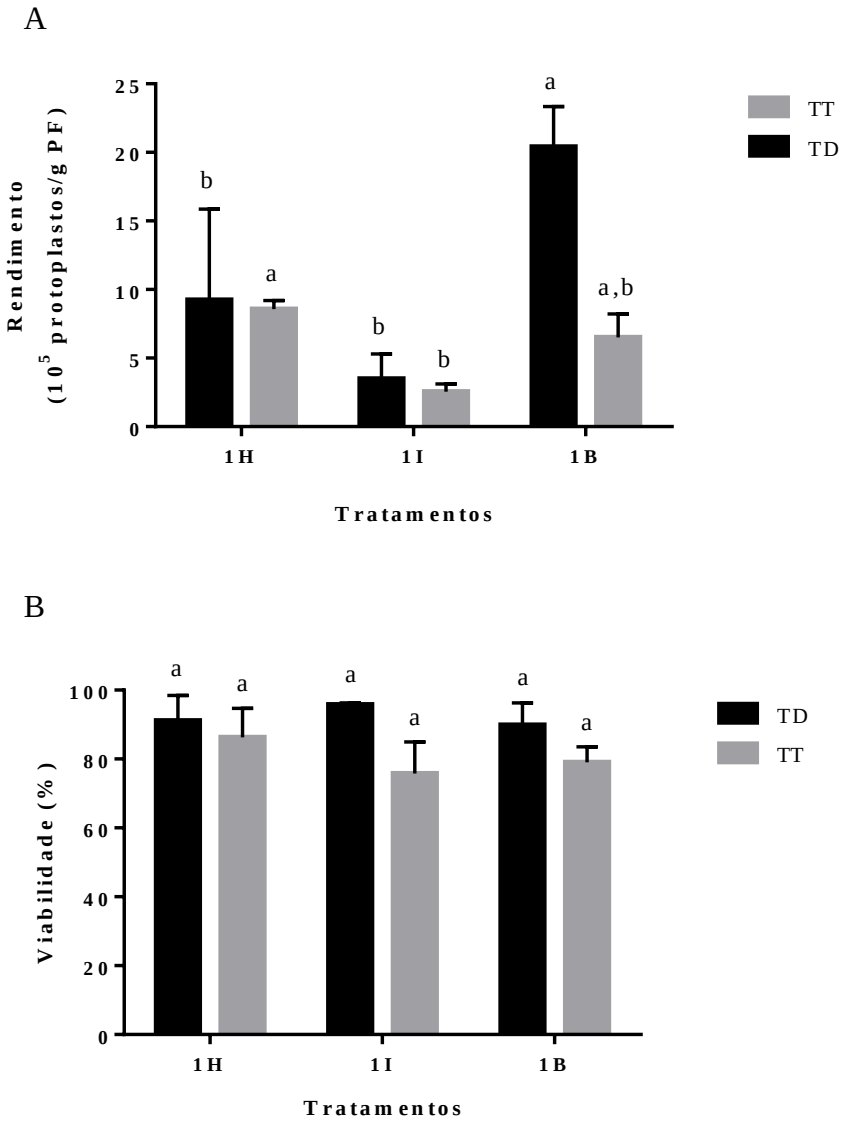


Figura 17. Efeito das diferentes combinações temperatura / duração de incubação enzimática (tratamentos 1H, 1I e 1B) no rendimento (A) e viabilidade (B) dos protoplastos obtidos a partir de folhas das linhas TD e TT. Os valores apresentados são relativos à média ± desvio padrão de, pelo menos, 2 réplicas. Letras diferentes, para a mesma linha, representam diferenças significativas (segundo teste LSD, $p < 0,05$).

Averiguou-se o efeito do método de purificação em termos de rendimento de protoplastos isolados a partir de folhas das linhas TD (Fig. 18). O método de purificação associado à obtenção de banda interfásica (Figs. 19A e 19B) foi mais eficiente do que o

método que leva à sedimentação dos protoplastos num *pellet* e passagem por filtro de 40 μm (respectivamente, tratamentos 1B e 1J – Tabela 2).

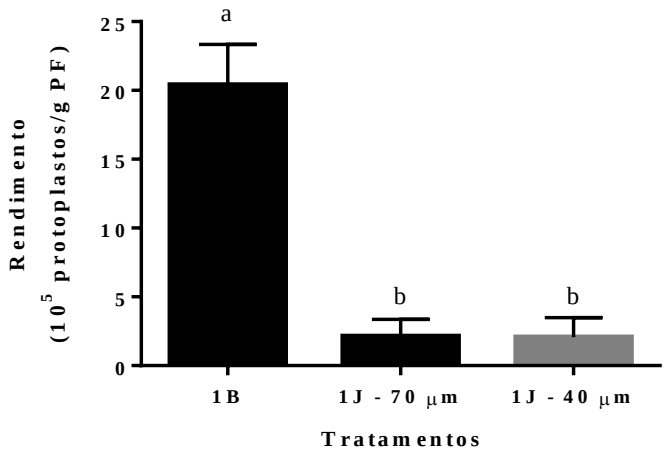


Figura 18. Influência do método de purificação (tratamentos 1B e 1J) na quantidade de protoplastos obtidos por grama de peso fresco, a partir de explantes foliares das linhas TD. Os valores correspondem à média ± desvio padrão de 3 réplicas. Os valores com letras diferentes são significativamente diferentes (segundo teste LSD, $p < 0,05$).

Tendo em conta que o protocolo a partir do qual se adaptou o método de purificação envolve centrifugações / lavagens, testou-se igualmente uma sequência de centrifugações a 300 *g*, 5 min (tratamento 1K – Tabela 2). Os protoplastos plasmolisaram a esta velocidade de centrifugação, pelo que não foi possível determinar o respectivo rendimento.

Na Tabela 4, encontram-se sumarizados os valores de rendimento e viabilidade dos protoplastos isolados a partir das folhas.

Para distinguir protoplastos viáveis dos não viáveis (Fig. 19C), recorreu-se ao corante de exclusão Evans blue, o qual permitiu inferir a sua viabilidade. A determinação do rendimento dos protoplastos das linhas TD e TT foi realizada através da sua contagem num hemocitómetro (Figs. 20A e 20B). De acordo com a medição da dimensão dos protoplastos das linhas diplóides, foi possível verificar que se situam entre os 18 e os 47 μm (34,6±8,780 μm).

Tabela 4. Quadro – resumo relativo ao rendimento e % de viabilidade (valores médios ± desvio padrão, de acordo com 3 réplicas para cada tratamento) obtidos nos respectivos tratamentos, a partir de explantes foliares das linhas TD e TT após 4 – 6 semanas de cultura em meio MS. Letras diferentes, para a mesma linha, correspondem a diferenças significativas, segundo o teste LSD ($p < 0,05$).

Tratamentos	Rendimento (10^5 protoplastos / g PF)		Viabilidade (%)	
	TD	TT	TD	TT
1A	3,666±0,276 ^{c,b}	---	---	---
1B	20,410±2,933 ^{a}	6,507±1,718 ^{a,b}	89,91±6,38 ^{a}	79,04±4,51 ^{a}
1C	11,938±4,982 ^{a,b}	6,086±4,070 ^{a,b,c}	89,78±1,94 ^{a}	64,88±11,62 ^{a}
1D	13,360±10,349 ^{a}	3,745±1,008 ^{b,c}	91,11±4,44 ^{a}	82,75±7,14 ^{a}
1H	9,239±6,634 ^{1}	8,572±0,630 ^{a}	91,15±7,28 ^{1}	86,27±8,42 ^{a}
1I	3,488±1,810 ^{1}	2,552±0,567 ^{c}	95,77±0,51 ^{1}	75,79±9,20 ^{a}
1J	2,125±1,237 ^{c}	---	---	---

[1] Não foi possível realizar análise estatística.

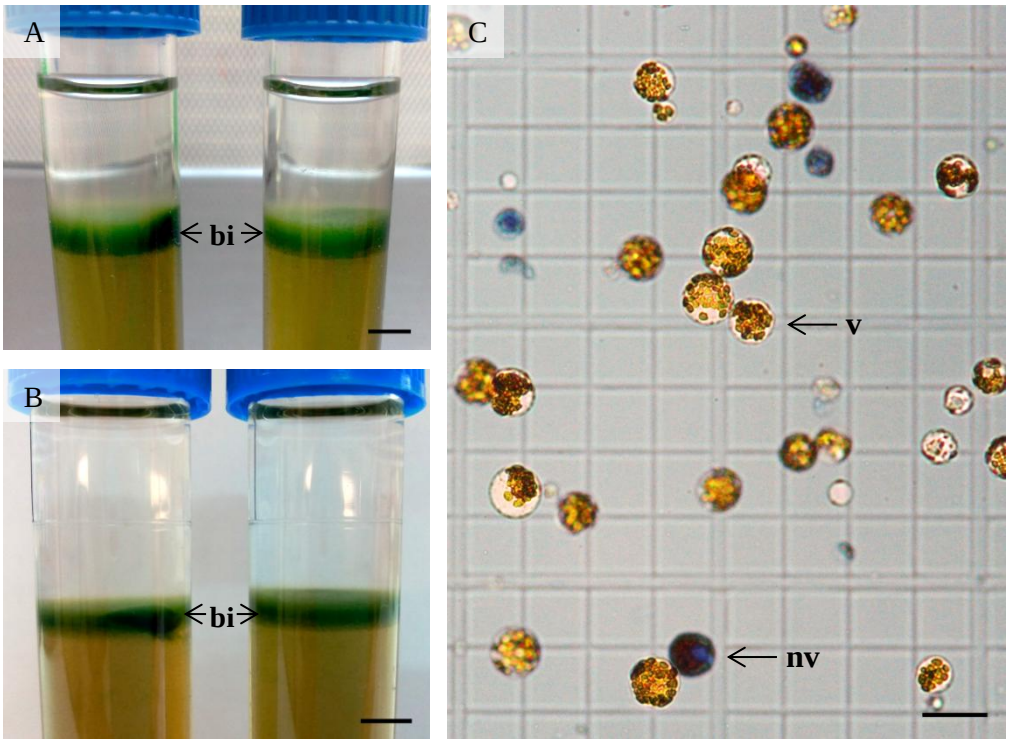


Figura 19. Purificação dos protoplastos através de gradiente de densidade. Bandas interfásicas obtidas após a centrifugação, para as linhas TD (A) e TT (B). Protoplastos da banda interfásica, corados com Evans blue (x 100). As barras correspondem a 5 mm (A e B) e a 50 µm (C). Legenda: bi – banda interfásica, v – viável, nv – não viável.

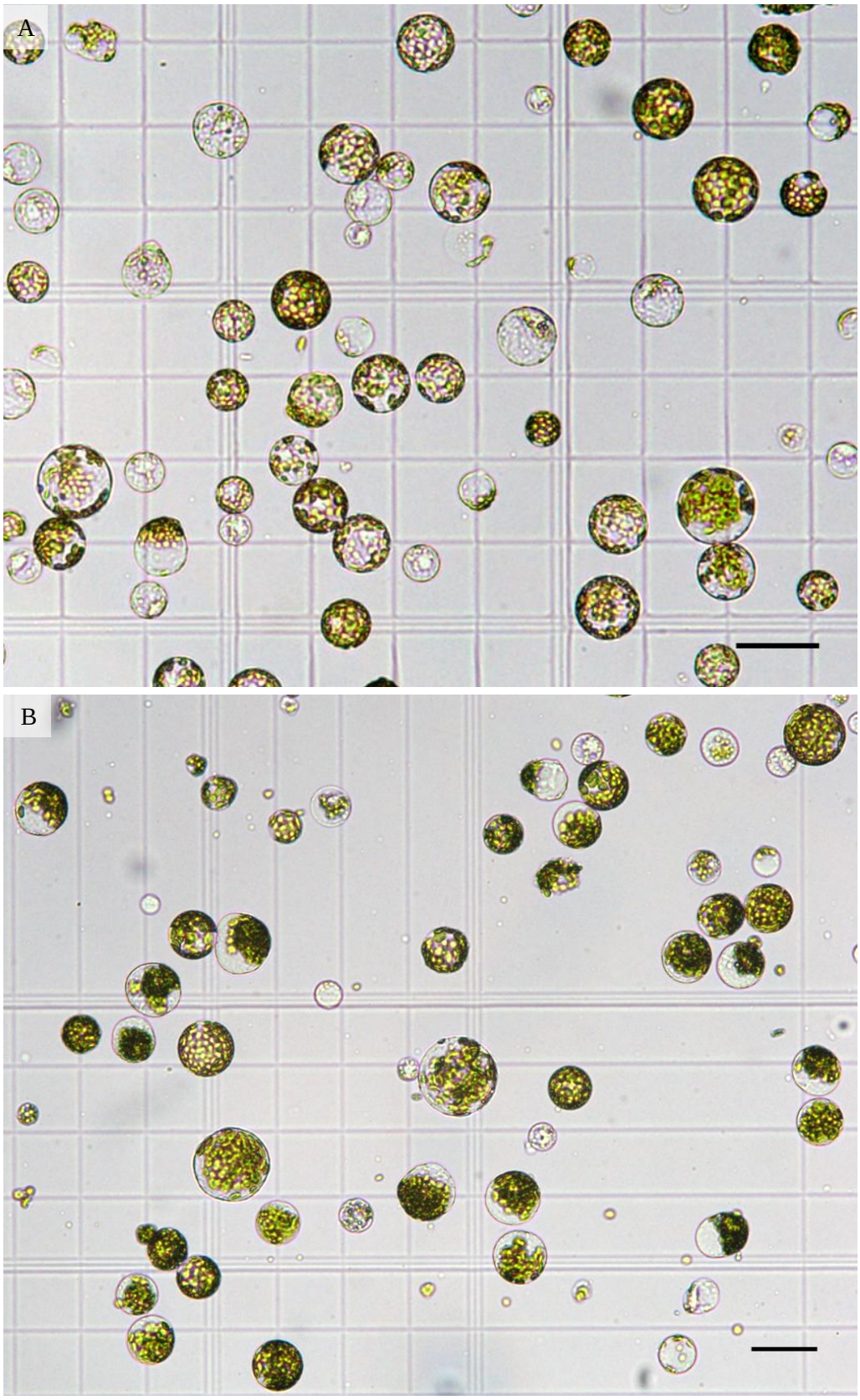


Figura 20. Protoplastos isolados e purificados a partir de explantes foliares das linhas TD (A) e TT (B) (x100). As barras correspondem a 50 µm.

b) A partir de *calli* e explantes embriogenicamente induzidos

Com o intuito de averiguar a influência da composição enzimática no rendimento dos protoplastos obtidos a partir do calo CE, efectuaram-se 4 tratamentos (Fig. 21) que se encontram discriminados na Tabela 3. Em cada composição enzimática, utilizou-se celulase a 1% (w/v), juntamente com i) pectinase a 0,1 ou a ii) 0,2% (w/v), iii) macerozima a 1% (w/v), ou iv) driselase 0,2% (w/v) e pectinase a 0,02% (w/v) (tratamentos 2A a 2B, respectivamente). Apesar de entre os tratamentos 2A e 2B não haver diferenças significativas em termos de rendimento (Fig. 21; Tabela 5), o aumento para o dobro da concentração de pectinase no tratamento 2B, levou à duplicação da quantidade de protoplastos obtida.

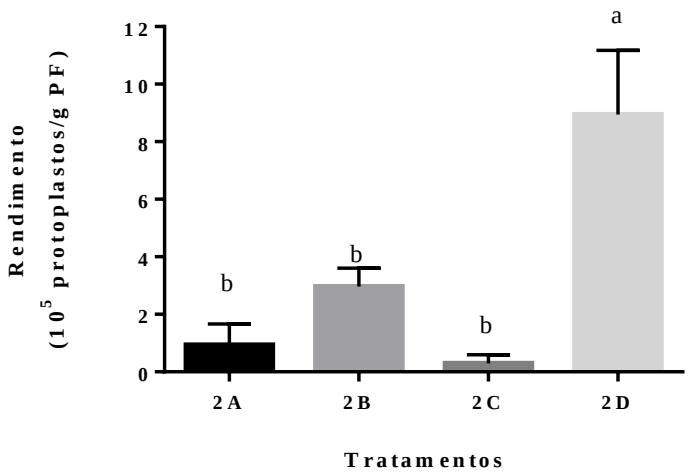


Figura 21. Influência das diferentes composições enzimáticas (tratamentos 2A a 2D) no rendimento dos protoplastos obtidos a partir de calos da linha CE. Os valores apresentados são relativos à média ± desvio padrão de 2 réplicas. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes, segundo teste LSD ($p < 0,05$).

É importante salientar que o tratamento 2D (Tabela 3) foi aquele que auferiu um rendimento significativamente superior (8,947±2,225 x 10^5 protoplastos / g PF – Tabela 5), pelo que a respectiva solução enzimática foi utilizada nos tratamentos efectuados posteriormente.

Pretendeu-se ainda verificar se um incremento em massa inicial (de 0,5 g para 1,0 g PF) de calo CE influenciaria o rendimento de protoplastos, quando aplicado o mesmo tratamento 2D (Tabela 3); contudo, não se observou diferenças significativas entre ambos os rendimentos (Fig. 22; Tabela 5).

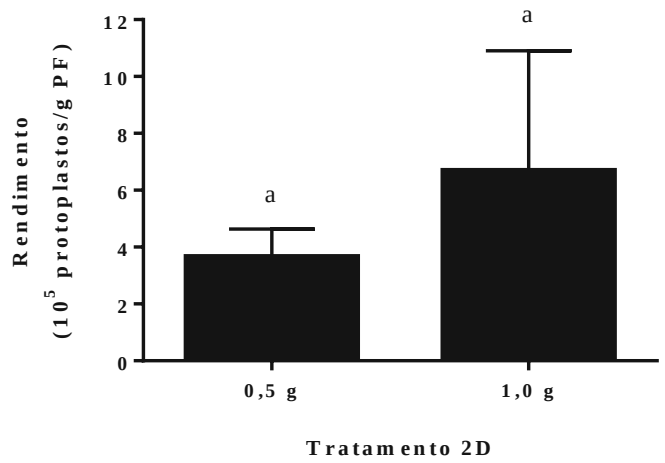


Figura 22. Efeito do incremento em massa de calo da linha CE no rendimento dos protoplastos. Os valores correspondem à média ± desvio padrão de 3 réplicas. Letras iguais não representam diferenças significativas (segundo o teste paramétrico t de *Student* bicaudal, $p < 0,05$).

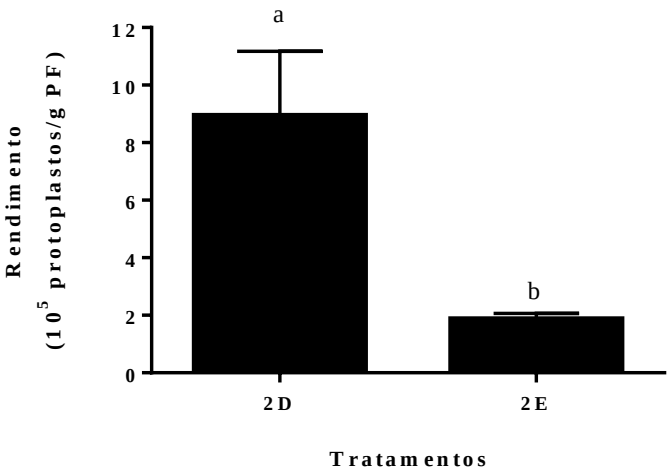


Figura 23. Efeito das diferentes sequências de centrifugação utilizadas nos tratamentos 2D e 2E no rendimento dos protoplastos derivados de calo da linha CE. Os valores correspondem à média ± desvio padrão de 2 réplicas. Letras diferentes representam diferenças significativas, segundo o teste paramétrico t de *Student* bicaudal ($p < 0,05$).

Tendo em conta a sequência de centrifugações indicada no protocolo seguido, testou-se a 300 *g*, 5 min. (tratamento 2E – Tabela 3). Consequentemente, o rendimento de obtenção de protoplastos teve uma redução significativa comparativamente à sequência de centrifugações aplicada no tratamento 2D (Fig. 23).

Analisou-se igualmente a influência da temperatura / duração da digestão enzimática no rendimento dos protoplastos obtidos a partir do calo da linha CE. Como se pode ver na Fig. 24, apesar de não haver diferenças significativas no rendimento obtido entre os tratamentos 2D e 2F, o número de protoplastos obtidos em 1 grama de peso fresco para o tratamento 2D foi superior ao do tratamento 2F (Tabela 3). As comparações dos tratamentos foram feitas entre as contagens realizadas antes da filtragem com filtro de 40 μm.

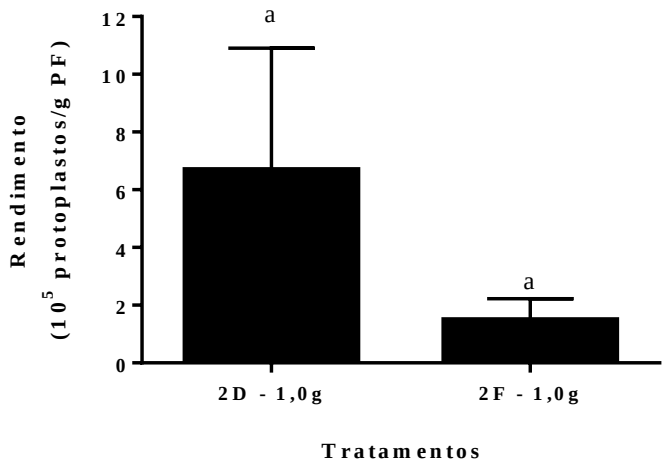


Figura 24. Efeito das diferentes combinações temperatura / duração de incubação enzimática (tratamentos 2D e 2F) no rendimento dos protoplastos obtidos a partir de 1 grama PF de calo CE. Os valores apresentados são relativos à média ± desvio padrão de, pelo menos, 3 réplicas. Letras iguais não representam diferenças significativas (segundo o teste paramétrico t de *Student* bicaudal, $p < 0,05$).

Também não se verificaram diferenças significativas na quantidade de protoplastos obtidos em 500 miligramas de peso fresco do mesmo calo entre os tratamentos 2D e 2G (Tabela 3; Fig. 25). Neste caso, as comparações foram feitas entre as contagens realizadas após a filtragem com filtro de 40 μm.

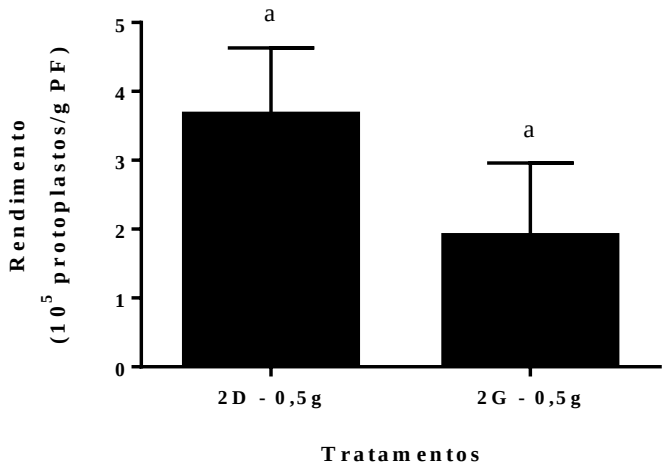


Figura 25. Efeito das diferentes combinações temperatura / duração de incubação enzimática (Tratamentos 2D e 2G) no rendimento dos protoplastos obtidos a partir de 0,5 gramas PF de calo CE. Os valores apresentados são relativos à média ± desvio padrão de, pelo menos, 3 réplicas. Letras iguais não representam diferenças significativas, segundo o teste paramétrico t de *Student* bicaudal ($p < 0,05$).

Tabela 5. Rendimento dos tratamentos detalhados na Tabela 3 (valores médios ± desvio padrão), a partir de calo CE após 3 – 4 semanas de proliferação em meio TP líquido. Letras diferentes entre os tratamentos 2D, 2F e 2G (3 réplicas para cada tratamento) representam diferenças significativas (segundo teste LSD, $p < 0,05$).

Tratamentos	Calo CE
	Rendimento (10^5 protoplastos / g PF)
2A	0,9361±0,7254 [1]
2B	2,965±0,6364 [1]
2C	0,2996±0,2910 [1]
2D – 1,0 g	6,692±4,2110 [a]
2D – 0,5 g	3,668±0,9631 [a,b]
2E	1,880±0,1810 [1]
2F – 1,0 g	1,498±0,7324 [b]
2G – 0,5 g	1,907±1,0550 [b]

[1] Não foi possível realizar análise estatística.

Depois de estipulado qual o tratamento - padrão na linha CE (tratamento 2F – Tabela 3), aplicaram-se os mesmos parâmetros ao calo CNE (Fig. 29) e aos explantes embriogenicamente induzidos (tratamento 2H e 2I, respectivamente – Tabela 3). Também se conseguiu obter protoplastos de uma réplica (0,5 g PF) de CNE, quando sujeita a 30 ºC durante 6h30, e cujo rendimento foi 2,070 x 105 protoplastos / g PF.

No tratamento 2H, uma vez que após a contagem dos protoplastos se verificou que a preparação não apresentava células não digeridas e outros detritos, não foi necessário proceder a filtragem com filtro de malha 40 μm. O mesmo não se verificou para o calo CE, explantes foliares e embriogenicamente induzidos, em que houve necessidade de purificar a suspensão de protoplastos de modo a prosseguir com os passos seguintes do método de extracção de RNA total.

Para o tecido embriogenicamente induzido, dada a sua condição de transição de explante foliar para tecido caloso, testou-se 2 tratamentos cuja variação consistiu na composição enzimática. Assim, analisou-se os rendimentos obtidos a partir da combinação enzimática estabelecida para calo e para explantes foliares (tratamentos 2I e 2J – Tabela 3). O tratamento 2I permitiu isolar uma quantidade de protoplastos mais significativa do que o tratamento 2J (Fig. 26; Tabela 6).

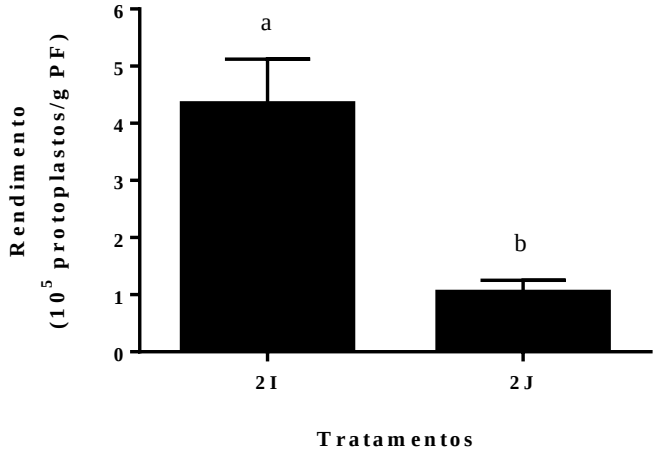


Figura 26. Influência das diferentes composições enzimáticas (tratamentos 2I e 2J) no rendimento dos protoplastos obtidos a partir de explantes embriogenicamente induzidos. Os valores apresentados são relativos à média ± desvio padrão de 3 réplicas. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (segundo o teste paramétrico t de *Student* bicaudal, $p < 0,05$).

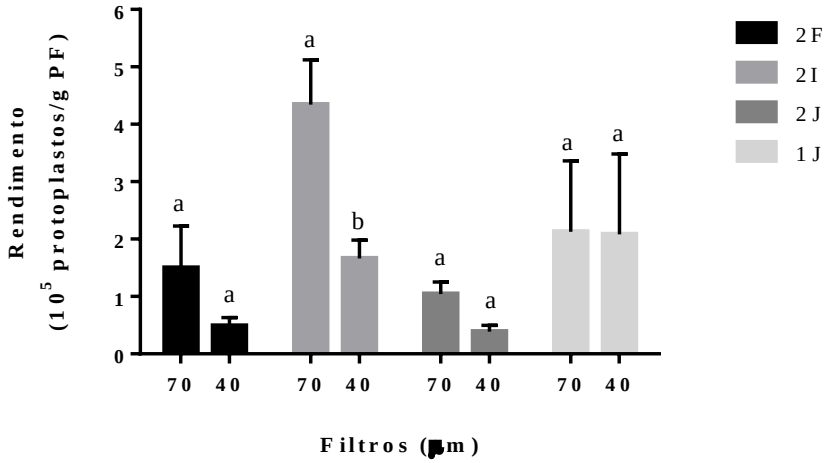


Figura 27. Influência das diferentes filtragens no rendimento dos protoplastos obtidos a partir de calo de CE (2F) e CNE (2I), de explantes embriogenicamente induzidos (2J) e foliares (IJ). Os valores apresentados são relativos à média ± desvio padrão de 3 réplicas. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas, segundo teste LSD ($p < 0,05$).

Além disso, verificou-se se havia discrepâncias em termos de rendimentos determinados a partir de contagens efectuadas após a filtragem com o filtro de 70 μm e após o de 40 μm (tratamentos 1J e 2F a 2J – Tabelas 2 e 3; Fig. 27). Só no tratamento 2I houve uma redução estatisticamente considerável do rendimento (Tabela 6).

A viabilidade dos protoplastos de CE (Fig. 28A) foi analisada em 3 réplicas (com 3 contagens de protoplastos de cada uma) de acordo com as condições optimizadas (tratamento 2D – Tabela 3), sendo a respectiva percentagem de 86,76±2,75%.

Os protoplastos purificados a partir dos calos embriogénico e não embriogénico, e de explantes embriogenicamente induzidos estão representados, respectivamente, nas figuras 28, 29 e 30. As suas dimensões também foram estimadas: 35±7,417 (CE), 36,11±7,764 (CNE), e 29,33±6,890 μm (tecido embriogenicamente induzido).

Tabela 6. Rendimentos de protoplastos derivados de diferentes explantes (valores médios ± desvio padrão) para os diferentes tratamentos, antes e após a filtragem com filtro de 40 μm. Letras iguais, para o mesmo tratamento, corresponde a diferenças não significativas, segundo teste LSD ($p < 0,05$).

		Rendimento (10^5 protoplastos / gPF)	
		Filtragem	
Explantes	Tratamentos	70 μm	40 μm
Calo (CE)	2F	1,497±0,732 [a]	0,487±0,148 [a]
Calo (CNE)	2H	0,524±0,473	---
T. embriogenicamente induzido	2I	4,343±0,780 [a]	1,661±0,323 [b]
	2J	1,043±0,209 [a]	0,390±0,108 [a]
Folhas (TD)	1J	2,125±1,237 [a]	2,080±1,400 [a]

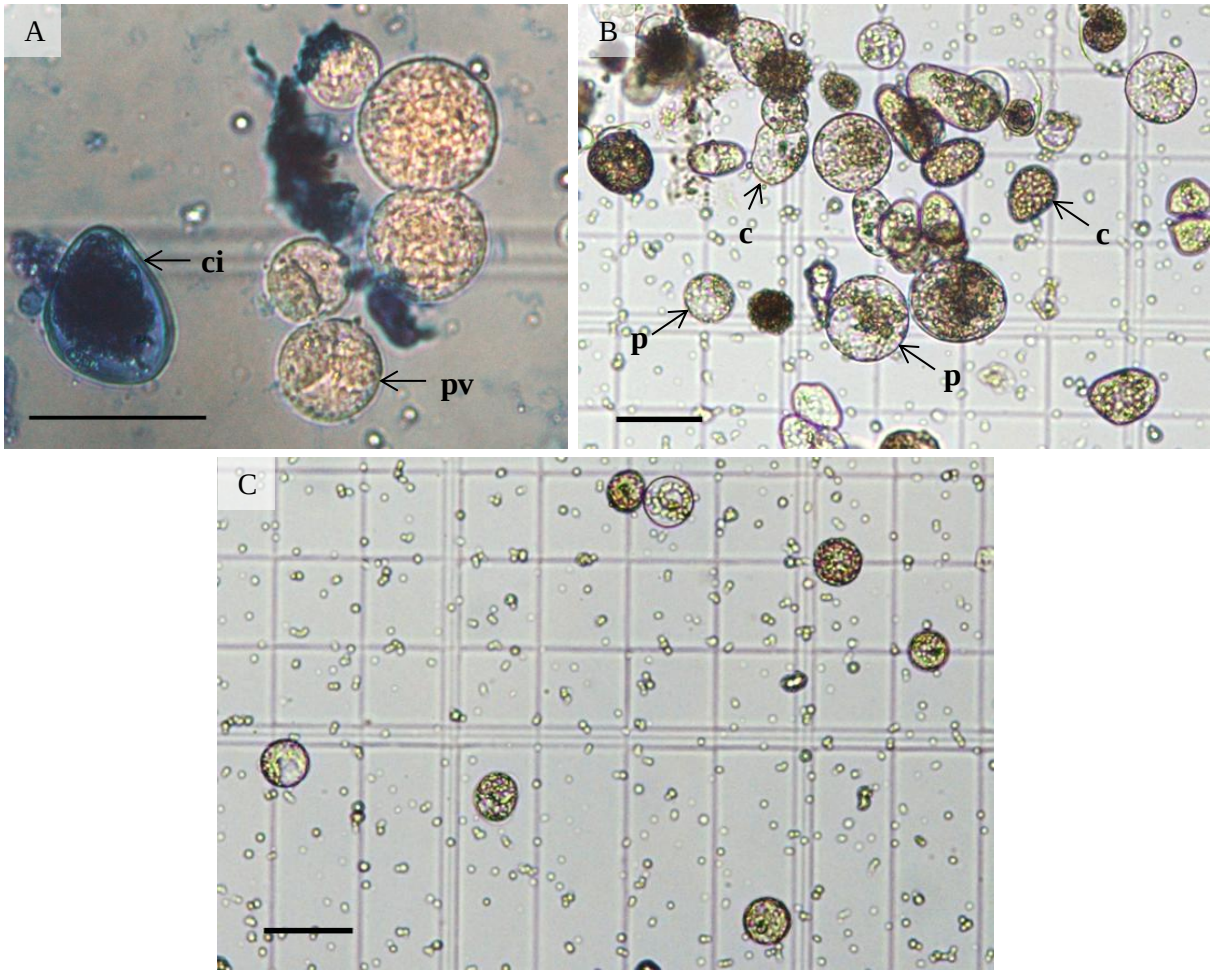


Figura 28. Protoplastos isolados a partir de *callus* CE. (A) A sua viabilidade foi verificada com o corante Evans blue (x400). A sua purificação antes (B) e após (C) a passagem pelo filtro de 40 μm (x100). As barras correspondem a 50 μm. Legenda: p – protoplasto; c – célula com parede celular não digerida; pv – protoplasto viável; ci – célula inviável com parede celular não digerida.

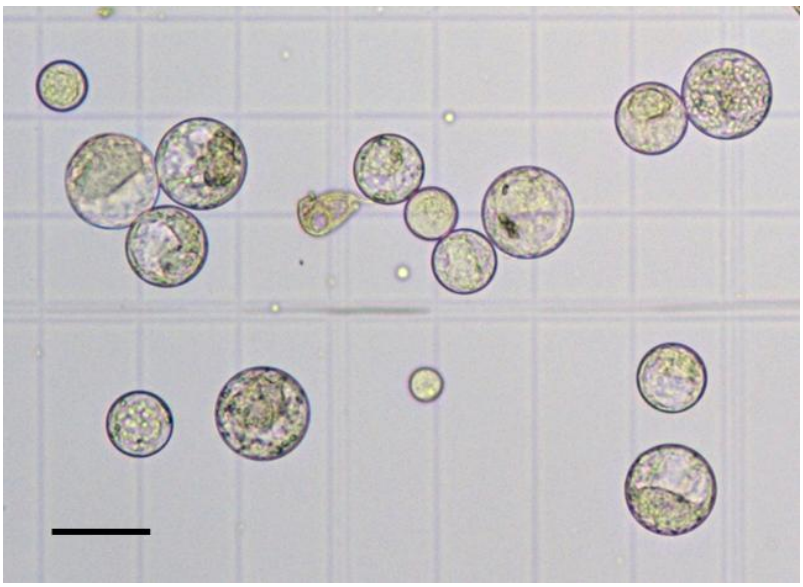


Figura 29. Protoplastos isolados a partir de *callus* CNE.

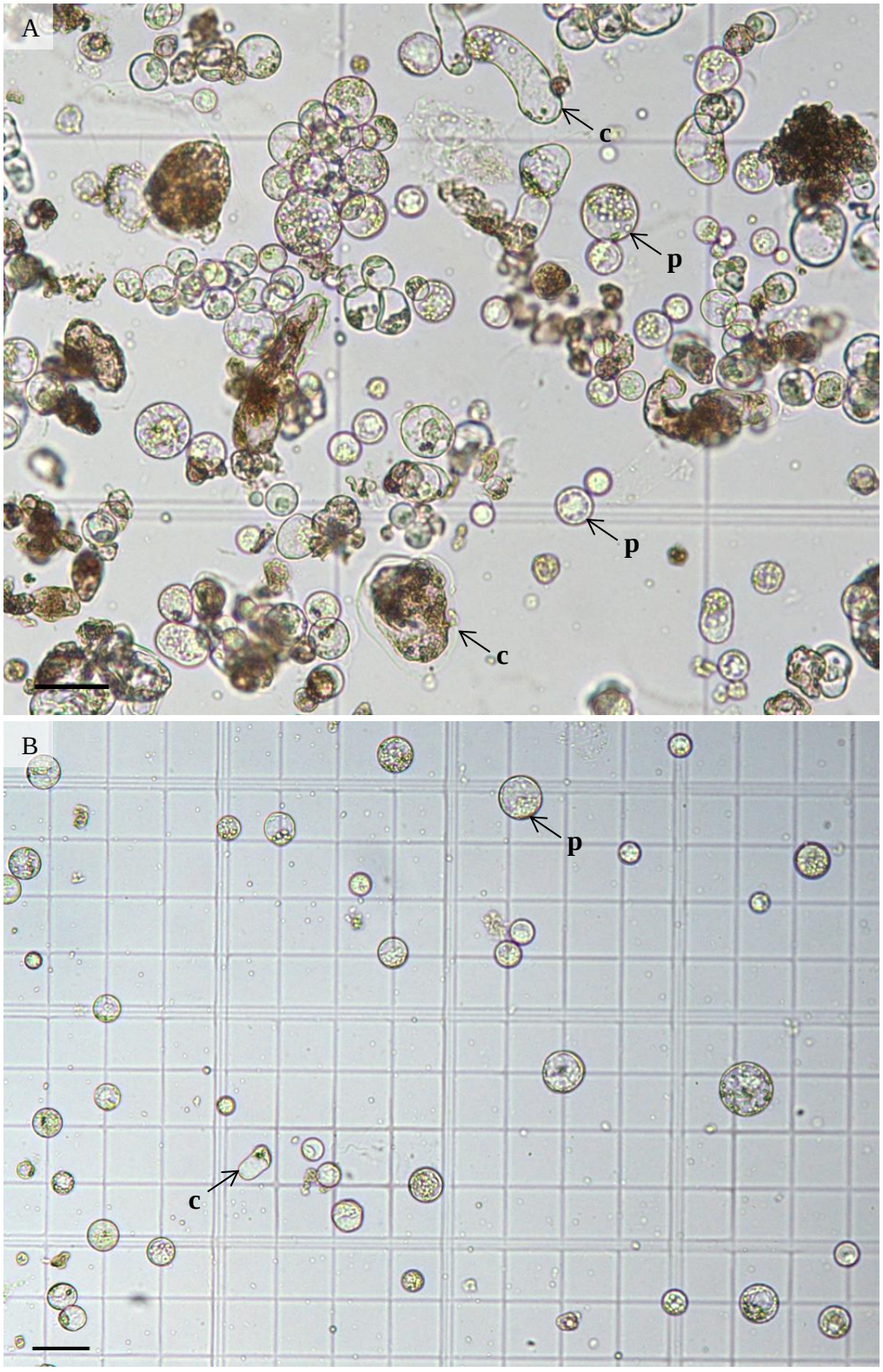


Figura 30. Protoplastos obtidos a partir de explantes em indução do genótipo TD1, antes (A) e após (B) a passagem pelo filtro de 40 µm (x100). As barras correspondem a 50 µm. Legenda: p – protoplasto; c – célula com parede celular não digerida.

3.2. Cultura de protoplastos

Os protoplastos obtidos a partir dos explantes foliares das linhas TD e TT foram inicialmente colocados em meio de cultura líquido MS e B5, cujas composições estão indicadas na Tabela 1. No entanto, observou-se uma agregação dos protoplastos e após uma semana em cultura ainda não se tinha verificado a formação da parede celular e, consequentemente, o início da divisão celular.

Posteriormente testou-se o meio de cultura semi-sólido Mprot, suplementado com sacarose a 10% (w/v) e gelificado com agarose a 1,2% (w/v) (Tabela 1, Fig. 31A). Após 17 dias em cultura, foram observadas células derivadas dos protoplastos já com sinais de presença de parede celular (birrefringência observada ao microscópio de platina invertida) e a iniciarem a divisão celular (Figs. 31B e 31C).

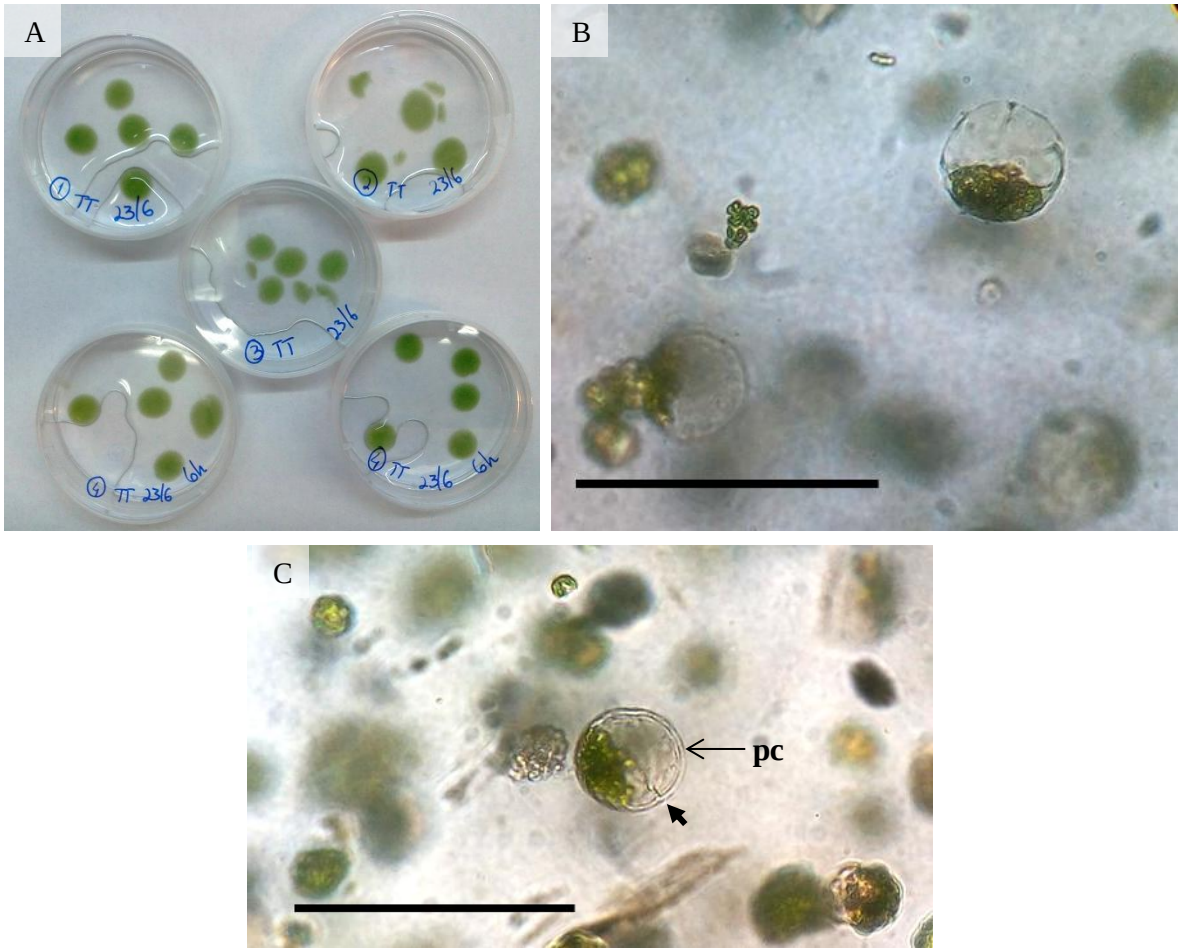


Figura 31. Protoplastos da linha TT em meio de cultura semi-sólido Mprot (A), suplementado com sacarose a 10% (w/v). Observação da primeira divisão celular (B, C) (x200). As barras correspondem a 200 µm. Legenda: pc – parede celular.

Testou-se também o meio de cultura semi-sólido Mprot, gelificado com agarose tipo VII a 1,2% (w/v) (Tabela 1; Fig. 32A). Após 8 dias em cultura, foram observadas células derivadas dos protoplastos já com sinais de parede celular (birrefringência observada; Figs. 32B a 32D).

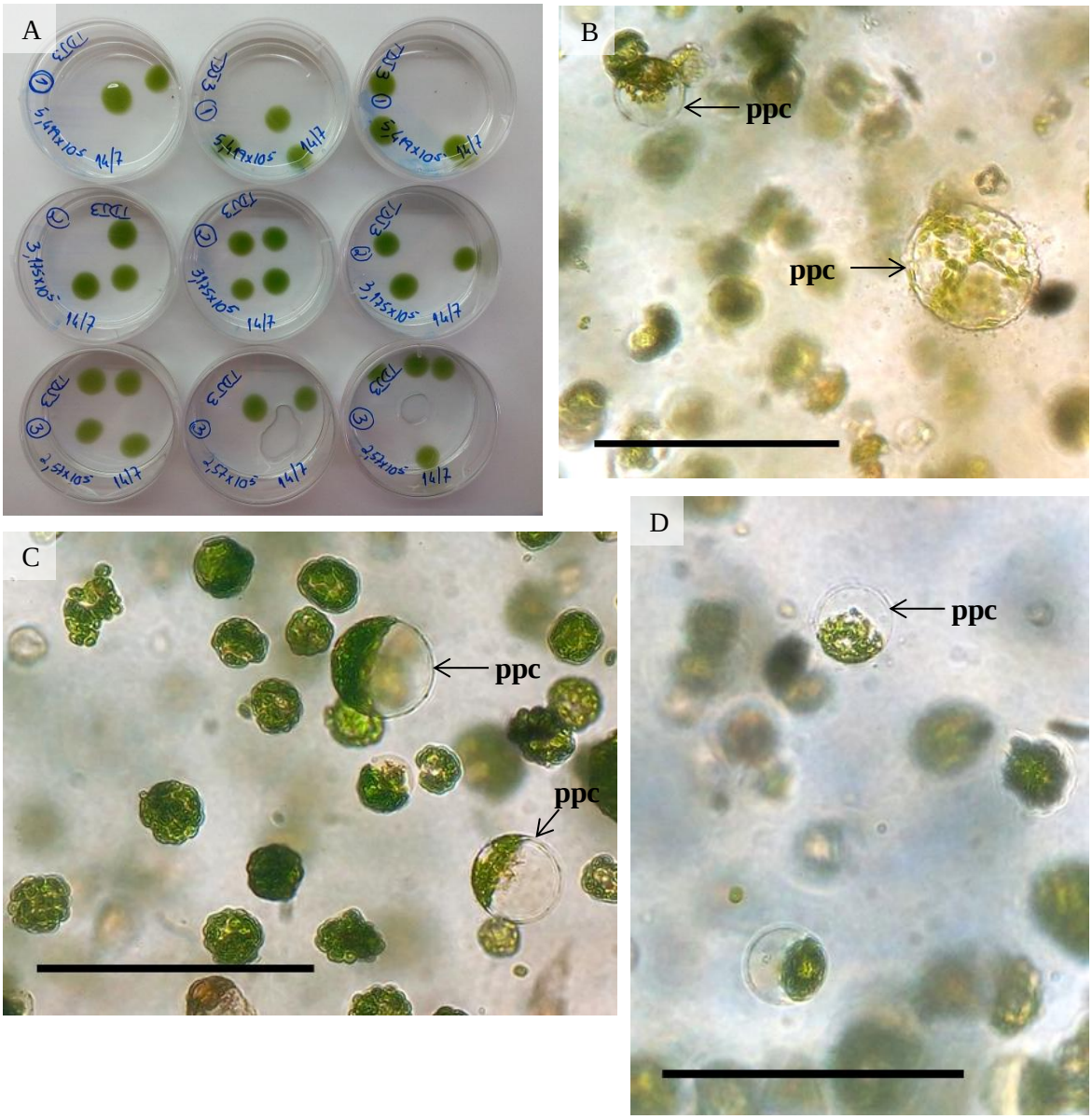


Figura 32. Protoplastos da linha TD em meio de cultura semi-sólido Mprot (A). Observação de sinais da formação de parede celular nas 3 culturas com densidades de plaqueamento diferentes mostradas em A (B – 5,419 x 10^5 protoplastos/ml; C – 3,175 x 10^5 protoplastos/ml; D – 2,570 x 10^5 protoplastos/ml) (x200). As barras correspondem a 200 μm. Legenda: ppc – potencial parede celular.

3.3. Extracção e análise da qualidade de RNA total dos protoplastos

a) Extracção e quantificação de RNA total dos protoplastos

Os dados relativos à quantidade de RNA total extraída dos protoplastos dos diferentes materiais vegetais e que foi avaliada por espectrofotometria em Nanodrop 2000c estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores das médias ± desvios padrão dos parâmetros relativos à extracção de RNA total de protoplastos dos diferentes explantes analisados. Para cada explante, foram utilizadas 3 réplicas.

Explantes – Tratamentos	Concentração de RNA total (ng/μL)	A260/A280	A260/A230	Rendimento (10^5 protoplastos / g PF)	Quantidade de RNA total obtida no tratamento (μg)
CNE[1] – 2H	202,567±70,121	2,133±0,021	2,27±0,012	0,524±0,473	101,283±35,060
CE[2] – 2F	54,000±5,011	2,077±0,086	1,887±0,403	0,487±0,148	27,000±2,505
ID[3] – 2I	273,767±63,846	2,110±0,036	2,247±0,179	1,661±0,323	136,883±31,923
IM[4] – 2J	74,833±34,232	2,010±0,135	1,850±0,173	0,390±0,108	37,417±17,116
TD[5] – 1J	136,300±74,896	2,15±0,010	2,160±0,288	2,080±1,400	68,150±37,448

[1] calo CNE; [2] calo CE; [3] tecido embriogenicamente induzido sujeito ao tratamento 2I; [4] tecido embriogenicamente induzido sujeito ao tratamento 2J; [5] folhas da linha TD.

b) Avaliação da qualidade do RNA por electroforese

Para a confirmação da qualidade de RNA, procedeu-se a uma electroforese em gel de agarose (Fig. 33). Averiguou-se as 3 réplicas de cada explante, excepto para o explante IM em que só se aplicou uma das réplicas.

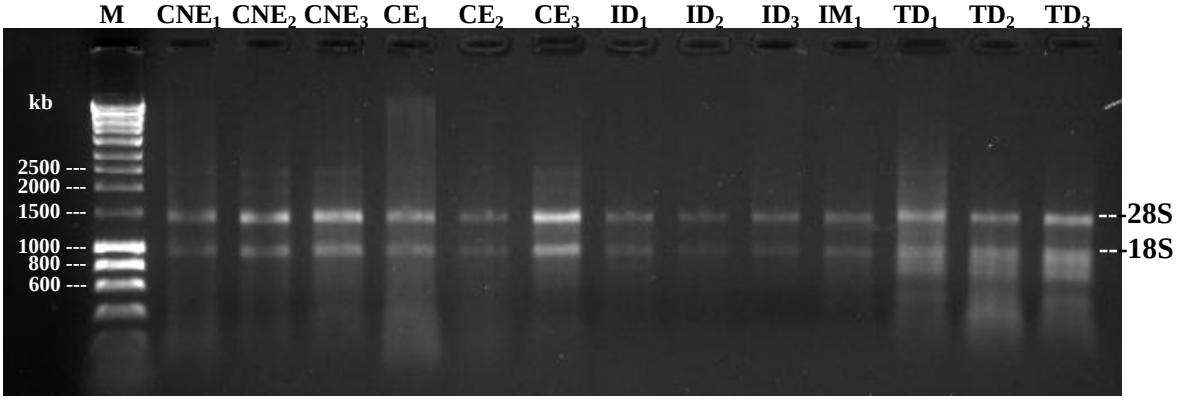
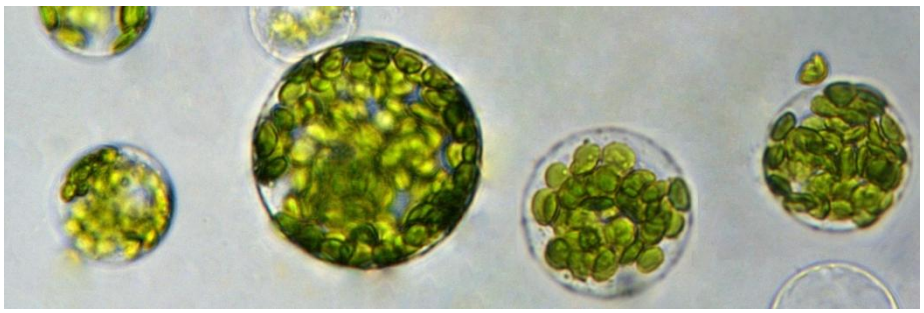


Figura 33. Análise de RNA total de protoplastos por electroforese em gel de agarose. As bandas mais intensas correspondem ao rRNA das plantas 28S e 18S. Não se observou contaminação com DNA. Legenda: M – marcador HyperLadder^{TM} I (Bioline).

4. DISCUSSÃO



A eficiência da formação de protoplastos, isto é, o seu rendimento e viabilidade, podem ser fortemente influenciados por vários factores: a osmolaridade das soluções enzimática e de cultura, o tipo e concentração das enzimas, a incubação enzimática (temperatura e duração), métodos de purificação, densidade de plaqueamento e suplemento dos meios de cultura (nomeadamente o tipo de auxinas e citocininas) (Kikuta *et al.*, 1986; Pongchawee *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Tudses *et al.*, 2015). Para além disso, é um processo que varia amplamente em diferentes espécies, pelo que se torna necessário estudar os factores críticos que afectam o rendimento e viabilidade dos protoplastos obtidos. Para tal, é frequente recorrer-se a métodos de *design* experimental, tal como o método *One factor at a time* (OFAT) (Castelblanque *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010). Este sistema avalia os principais efeitos dos factores, variando um de cada vez enquanto mantém as outras variáveis fixas. Foi assim utilizado como primeira abordagem para o estabelecimento de um protocolo de isolamento e purificação de protoplastos obtidos a partir de diferentes tecidos em cultura *in vitro* de tamarilho com características de interesse: i) folhas jovens, ii) *calli* embriogénico e não embriogénico e iii) explantes embriogenicamente induzidos.

4.1. Isolamento e purificação de protoplastos

a) A partir de explantes foliares

Em algumas espécies, nomeadamente em *Arabidopsis thaliana*, a elevada acumulação de amido nos cloroplastos contribui para a diminuição da quantidade de protoplastos obtidos. Deste modo, as plantas são sujeitas a um período de escuridão, pelo menos 24 horas antes da realização do ensaio, uma vez que a ausência de luz leva à redução dos processos metabólicos destinados à acumulação de nutrientes, nomeadamente de amido (Siemens e Sacristán, 1994; Yoo *et al.*, 2007). No procedimento seguido para os explantes foliares de tamarilho, apesar de não se ter realizado nenhum tratamento

estatístico, não ficou clara a influência deste pré-tratamento das plantas na maior ou menor obtenção de protoplastos.

A osmolaridade deve ser considerada como o primeiro indicador para a obtenção de elevados rendimento e viabilidade de protoplastos, independentemente do tipo de estabilizador osmótico escolhido (Rezazadeh e Niedz, 2015). Um pré-tratamento por plasmólise dos explantes foliares é essencial, na medida em que leva à separação da parede do restante conteúdo celular, facilitando a sua digestão enzimática (Shiba e Mii, 2005). Uma pré-plasmólise com o mesmo agente osmótico da solução enzimática é considerada benéfica na manutenção da viabilidade dos protoplastos e redução da fusão espontânea durante o tratamento enzimático (Davey *et al.*, 2005). No protocolo inicialmente adoptado (Horváth, 2009) a sacarose (0,4 M) foi utilizada como estabilizador osmótico de protoplastos. Ao longo dos vários ensaios realizados, a sacarose a esta osmolaridade não interferiu com a integridade membranar dos protoplastos de tamarilho, facto que foi confirmado não só pelo elevado rendimento, como também pela viabilidade dos protoplastos. Deste modo, não se testou outra concentração nem outro agente osmótico.

O tipo e concentração de enzimas presentes nas soluções enzimáticas são factores-chave no isolamento de protoplastos. Apesar de os extractos enzimáticos a que se recorre para a digestão dos componentes da parede celular poderem apresentar contaminantes na sua composição, nomeadamente nucleases, proteases, lipases, fenóis e sais, alguns destes poderão ter um efeito benéfico no processo de isolamento de protoplastos, na medida em que enzimas muito purificadas dão por vezes rendimentos inferiores relativamente a enzimas com um grau menor de purificação (Canhoto, 2010). Contudo, o facto de algumas destas impurezas serem igualmente enzimas, pode interferir com a viabilidade da membrana plasmática dos protoplastos isolados (Bengochea e Dodds, 1986). Assim, é frequente colocar a solução enzimática em preparação num banho-maria a 55ºC durante 10 minutos, de modo a permitir não só uma maior solubilidade das enzimas em solução como também inativar DNases e proteases contaminantes (Yoo *et al.*, 2007).

Tendo em consideração o protocolo de referência (Horváth, 2009), as enzimas celulase "Onozuka" R-10 e macerozima R-10 foram as usadas para a digestão da parede celular, essencialmente por possuírem, no seu conjunto, capacidade para degradar efectivamente os principais constituintes desta (celulose, hemiceluloses e pectinas). Diferentes combinações entre as duas enzimas anteriormente mencionadas foram testadas para avaliar a sua influência, quer no rendimento, quer na viabilidade dos protoplastos

provenientes dos explantes foliares das linhas TD e TT. Deste modo, variou-se a concentração de celulase em 1,5 e 2% (w/v), combinando com macerozima a 0,25, 0,5 e 0,75% (w/v).

Quando se estabeleceu a concentração de celulase a 1,5% (w/v), independentemente da concentração de macerozima aplicada, obtiveram-se protoplastos, mas porções residuais de parede celular ainda eram evidentes. Deste modo, dada a digestão incompleta da parede celular, não se procedeu à determinação do rendimento.

Relativamente à celulase a 2% (w/v), conjugada com qualquer uma das variações de macerozima, não se verificaram diferenças significativas entre os rendimentos para os diferentes genótipos. No entanto, para as linhas diplóides (TD) foi possível constatar que o tratamento 1B (celulase a 2% w/v e macerozima a 0,5% w/v) permitiu mesmo assim isolar quase mais 1 milhão de protoplastos relativamente ao tratamento 1C (celulase a 2% w/v e macerozima a 0,25% w/v), a partir da mesma massa inicial de tecido foliar (1 g PF). Comparando os tratamentos 1B e 1D (celulase a 2% w/v e macerozima a 0,75% w/v), se não foram registadas diferenças entre ambos, quer em termos de rendimento, quer em termos de viabilidade, não houve necessidade de despender uma maior quantidade de macerozima, tendo em linha de conta o preço considerável das enzimas.

Para a linha tetraplóide (TT), embora os rendimentos fossem estatisticamente iguais entre si, o tratamento 1C proporcionou uma quantidade de células viáveis significativamente menor que o tratamento 1D, daí se ter escolhido, tal como para as linhas TD, igualmente a mistura celulase a 2% (w/v) e macerozima a 0,5% (w/v) para prosseguir com a inferência dos passos seguintes. Globalmente, verificou-se que a viabilidade ficou acima dos 50% para a linha TT e dos 80% para as TD.

Por norma, quanto maior a temperatura e a concentração de enzimas, menor deverá ser o tempo de exposição dos explantes ao processo digestivo. Assim, foram testadas diferentes combinações entre a temperatura e a duração da incubação enzimática; de acordo com as condições referidas na literatura testou-se o efeito da incubação enzimática a 27 ºC, *overnight* (Horváth, 2009). Em contraste, foi possível isolar protoplastos num só dia, aumentando a temperatura para 30 ºC, mas diminuindo o tempo de incubação para 6 - 7 horas (Huang, 2005). Para as linhas TD verificou-se uma maior dificuldade na obtenção de protoplastos no procedimento de um dia, sendo o rendimento *overnight* significativamente superior aos obtidos no próprio dia.

Verificou-se assim que os protoplastos obtidos a partir de folhas das linhas TD necessitam de um maior período de isolamento, enquanto os da linha TT são eficientemente obtidos logo após 6 horas de incubação (tratamento 1H), uma vez que não se registam diferenças significativas relativamente ao período *overnight*. Em termos de viabilidade, estes tratamentos conferem percentagens acima dos 80% (linhas TD) e 65% (linha TT).

Para as linhas TD e TT, a digestão enzimática a 30 ºC durante 7 horas (tratamento 1I) afectou tanto o rendimento como a viabilidade dos protoplastos, embora não sejam valores significativamente diferentes em relação ao período *overnight* (tratamento 1B). No entanto, para a mesma temperatura de 30ºC, 1 hora a mais de digestão enzimática ao nível dos explantes foliares da linha TT afectou significativamente o seu rendimento. A correlação entre a elevação da temperatura e a redução do tempo em incubação com a solução enzimática pode estar na origem desta diferença significativa entre os rendimentos do tratamento 1H relativamente ao 1I.

A poliploidia está directamente ligada a mudanças na anatomia e morfologia das plantas. A duplicação do genoma de um organismo tende a aumentar o volume das suas células (Comai, 2005); porém, os autopoliplóides mantêm o mesmo número de células dos diplóides correspondentes (Song *et al.*, 2012). As folhas apresentam geralmente uma maior largura e espessura, sendo caracterizadas por um aumento da sua massa por unidade de área (Acquaah, 2007; Song *et al.*, 2012). Portanto, se a área foliar aumenta e o número de células se mantém constante, significa que o espaço lacunoso entre as células do mesófilo é maior, o qual está preenchido por ar; este facto, aliado à maior espessura foliar, contribui para um maior peso foliar. Assim, os menores rendimentos registados na linha TT em qualquer tratamento podem ser devido ao menor número de células do mesófilo foliar que lhes deu origem em 1 grama de peso fresco, quando comparado com a mesma massa de material vegetal proveniente das linhas diplóides. Apesar de não se ter estabelecido uma correlação entre o número de folhas necessárias para obter 1 grama de folhas de peso fresco TD e TT para realizar cada ensaio, foi evidente a necessidade de um maior número de folhas das plantas diplóides do que nas tetraplóides.

São vários os métodos que podem ser utilizados para a purificação dos protoplastos. A optimização do método de purificação neste trabalho, foi feita por comparação entre tratamentos aplicados apenas às linhas TD. No método usado por Horváth (2009) há uma separação dos protoplastos dos restantes detritos celulares resultantes da digestão

enzimática, que não ficaram retidos no filtro de 70 μm usado previamente. Esta purificação baseia-se num gradiente de densidade que se estabelece entre a solução enzimática e a solução de lavagem. Devido à menor densidade que os protoplastos apresentam perante a solução enzimática, onde se encontram em suspensão, e a maior densidade relativamente à solução de lavagem, após a primeira centrifugação constituem uma banda interfásica entre ambas as soluções.

Um outro método de purificação implica também a passagem por um filtro de 70 μm e 2 centrifugações, intercaladas com ressuspensão dos protoplastos em meio de lavagem, por forma a sedimentar os protoplastos num *pellet* (Grønlund *et al.*, 2012). Para os explantes foliares de tamarilho, a passagem da suspensão final de protoplastos por um filtro de 40 μm (tratamento 1J) garantiu uma maior purificação e não afectou significativamente o rendimento do procedimento. Este tratamento permitiu assim reduzir o tempo de manipulação do filtrado, sendo indicado para a extracção de RNA total dos protoplastos (Grønlund *et al.*, 2012). No entanto, para uma cultura de protoplastos mais eficiente, dado ao baixo rendimento verificado, pode não ser o melhor método a adoptar em detrimento do tratamento 1B (purificação com obtenção de banda interfásica), visto serem requeridas densidades mínimas de plaqueamento (ainda não determinadas para os protoplastos obtidos neste trabalho). De acordo com a medição da dimensão dos protoplastos das linhas diplóides, foi possível verificar que se situam entre os 18 e os 47 μm (34,6±8,780 μm). Deste modo, o facto de na passagem pelo filtro de 40 μm não haver perda significativa da quantidade de protoplastos pode ser explicado pelo tamanho apresentado pelos protoplastos que lhes permite atravessar a malha de 40 μm.

Sendo assim, esta discrepância significativa entre os rendimentos dos 2 métodos de purificação de protoplastos pode ser devida: i) ao material retido nas filtragens e ii) à perda de protoplastos nas duas lavagens efectuadas para sedimentação dos protoplastos num *pellet*, contrastante com a constituição de banda interfásica (que permitiu a purificação logo após a primeira centrifugação, servindo a seguinte centrifugação apenas para lavagem dos protoplastos). No entanto, a vantagem do segundo método de purificação é o menor tempo de manuseamento requerido, o que pode ser vantajoso para análises de transcritos e técnicas de manipulação genética (como expressão transiente de genes) a aplicar no futuro e cujo menor rendimento não interfira tanto como pode influenciar a transferência para meio de cultura com vista à regeneração de plantas.

As velocidades de centrifugação aplicadas na purificação e lavagem dos protoplastos obtidos a partir de explantes de plantas lenhosas são frequentemente baixas (30 – 100 *g*), bem como a sua duração (5 – 6 min.) (Liu, 2005). Em contrapartida, os protoplastos de *A. thaliana* são capazes de manter a sua integridade celular mesmo a 200 ou a 300 *g* (Yoo *et al.*, 2007; Grønlund *et al.*, 2012). Nos ensaios realizados, verificou-se que os protoplastos obtidos a partir de explantes foliares de tamarilho são mais sensíveis a velocidades de centrifugação de 300 *g*, plasmolisando a esta velocidade. No entanto, foi necessário aumentar a duração da primeira centrifugação a 100 *g* de 5 para 10 min., por forma a permitir mais tempo aos protoplastos em suspensão na solução enzimática filtrada para se estabelecerem na camada que se forma na interface entre esta solução e o meio de lavagem dos protoplastos, resultando no aumento significativo do seu rendimento.

É de salientar ainda o corante Evans blue por ter sido o utilizado nos ensaios de viabilidade deste trabalho. Baseia-se no facto de o corante penetrar nas células não viáveis, corando-as de azul, enquanto as células viáveis não se encontram coradas (Ling *et al.*, 2010). Possibilitou assim verificar a viabilidade dos protoplastos, de modo a inferir se o método precisa de alterações para uma maior optimização.

b) A partir de *calli* e explantes embriogenicamente induzidos

Na cultura de plantas *in vitro* é frequente a formação de calo que pode ter a capacidade de regeneração de plantas por organogénese ou embriogénese somática (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006). Quando o calo é colocado em cultura em meio sólido, as suas células ao dividirem tendem a ficar agrupadas, formando pequenos aglomerados. No entanto, se estes calos forem transferidos para um meio de cultura líquido, as células tendem a separar-se umas das outras, ficando livres ou formando pequenas massas celulares (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006). É a esta população de células isoladas, ou em pequenos aglomerados, que se denomina suspensão celular, uma forma mais conveniente para a extracção em grande escala de metabolitos e para estudos a nível celular e molecular (Mustafa *et al.*, 2011). Nestas condições, as células são crescidas em agitação, permitindo uma melhor oxigenação, o que evita a agregação celular (Chawla, 2010), e permite um melhor contacto com o meio, facilitando a absorção dos nutrientes

(Canhoto, 2010). Uma suspensão celular vegetal apresenta uma dinâmica de crescimento semelhante ao crescimento de outras populações celulares, como por exemplo uma população bacteriana, diferindo no tempo de duplicação, sendo este muito maior no caso das plantas (Robledo-Paz *et al.*, 2006). Trabalhos anteriores com calo embriogénico e não embriogénico de tamarilho determinaram as condições de crescimento destas células em suspensão celular (Alves, 2012). Culturas de células em suspensão que se encontrem numa fase estacionária de crescimento não devem ser utilizadas para a obtenção de protoplastos, uma vez que tendem a formar agregados celulares densos, cujas células de maiores dimensões possuem uma parede espessa de difícil digestão enzimática (Bhojwani e Razdan, 1996). Devem estar no início da fase exponencial do seu ciclo de crescimento, pelo que se efectua normalmente um pré-tratamento que corresponde a inocular este material vegetal em meio de cultura fresco antes do ensaio (3 a 7 dias).

Todas as composições enzimáticas testadas (adaptadas de Latif *et al.*, 1993; Anjum, 1998; Rákosy-Tican e Menczel, 1998; Guzzo *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2010) permitiram isolar protoplastos de calo embriogénico CE de tamarilho. No entanto, o tratamento 2D (celulase a 1%, driselase a 0,2% e pectinase a 0,02% w/v) permitiu obter um rendimento significativamente maior quando comparado com os restantes tratamentos (2A a 2C). Para o mesmo calo e composição da solução enzimática, também se testou a influência da massa inicial (0,5 e 1 g PF) no rendimento. Apesar de a quantidade de protoplastos obtida com 0,5 g PF não ser significativamente diferente da conseguida com 1 g PF, o incremento do rendimento foi de 54,81±22,87%. Mesmo assim, em tratamentos posteriores, a massa de 0,5 g foi usada para ensaios de 6 – 7 horas, enquanto 1 g para ensaios *overnight*.

Tal como para os explantes foliares, também se testou uma velocidade de centrifugação de 300 *g*, 5 min para a purificação de protoplastos a partir de calo CE. Ao contrário do que se verificou com os protoplastos do mesófilo foliar, e embora esta velocidade de centrifugação não seja óptima comparativamente a 100 *g*, 10 min, os protoplastos de CE mantiveram a sua integridade celular.

Além disso, os rendimentos observados com a combinação 25 ºC, 20 – 22 h (tratamento 1D) ou 27 ºC, *overnight* (tratamento 2F) não foram significativamente diferentes. Pelo facto de a 27 ºC ser necessário um menor tempo de digestão enzimática, esta temperatura foi a utilizada para os restantes ensaios subsequentes.

A aplicação de vácuo durante a incubação enzimática dos calos CE possibilitou a obtenção de protoplastos após 6h30 (tratamento 2G) de incubação enzimática, embora com rendimentos significativamente inferiores ao tratamento *overnight*.

Nos explantes foliares de tamarilho, após indução em meio MS suplementado com picloram, distinguem-se dois tipos de proliferação celular com base na sua morfologia e cor – massas embriogénicas e não embriogénicas (Correia, 2011). Estas massas vão-se diferenciando ao longo do tempo de cultura, à medida que as células dos tecidos foliares se vão desdiferenciando sob acção dos estímulos do meio de cultura. A composição enzimática estabelecida para os calos CE e CNE (celulase a 1% w/v, driselase a 0,2% w/v e pectinase a 0,02% w/v) permitiu isolar uma quantidade de protoplastos a partir dos tecidos embriogenicamente induzidos significativamente superior do que a composição enzimática estabelecida para os explantes foliares (celulase a 2% w/v e macerozima a 0,5% w/v). Esta diferença pode ser devido ao facto de estes explantes se encontrarem com 6 semanas de indução, pelo que se observaram protoplastos com características mais de *calli* do que de células ainda diferenciadas dos tecidos foliares (não se observou protoplastos com cloroplastos).

No tratamento 2H, após a contagem dos protoplastos, verificou-se que a preparação não apresentava células de CNE não digeridas e outros detritos, pelo que não foi necessário proceder a filtragem com filtro de 40 μm. O mesmo não se verificou para o *callus* CE e para os explantes foliares induzidos, nos quais houve necessidade de purificar a suspensão de protoplastos. A dimensão dos protoplastos de CE, CNE e tecidos embriogenicamente induzidos foi de 35±7,417, 36,11±7,764, e 29,33±6,890 μm de diâmetro, respectivamente, pelo que o decréscimo do rendimento de protoplastos na passagem do filtro de 70 para o de 40 μm pode dever-se à variação das dimensões dos protoplastos. No entanto, a agregação celular que se observou aquando da ressuspensão dos protoplastos em meio de lavagem W5 e que provocou alguma retenção de material na passagem pelo filtro de 40 μm pode ser um outro factor a considerar para esta redução da quantidade de protoplastos. Os protoplastos não se agregam facilmente porque a superfície das suas membranas está carregada negativamente o que garante uma repulsão entre as células. No entanto, foi observado que iões carregados positivamente reduzem as cargas negativas globais das membranas, reduzindo consideravelmente a repulsão entre as células (Tomar e Dantu, 2009). O cloreto de cálcio di-hidratado, embora usado como estabilizador membranar dos protoplastos, também pode ser usado na fusão induzida de protoplastos a 50mM (Giri e

Giri, 2007); na solução de lavagem, este sal encontra-se a 125 mM. Em fungos, o cloreto de sódio e de potássio são usados como agentes osmóticos, mas constata-se que potenciam a agregação dos protoplastos (Wubie *et al.*, 2014). Assim, a composição desta solução de lavagem pode estar na origem desta agregação dos protoplastos e indirectamente contribuir para uma redução do rendimento, aspecto que merece futura optimização.

4.2. Cultura de protoplastos

A etapa de cultura dos protoplastos encontra-se ainda em progresso, tendo sido feitos alguns avanços avanços, apesar da dificuldade encontrada para a colocação em cultura dos protoplastos derivados de explantes foliares dos genótipos TD e TT e das limitações temporais resultantes da optimização dos protocolos de isolamento e purificação.

No entanto, foi possível observar que os meios líquidos B5 e MS não mostraram evidências de favorecer a formação de parede celular e, consequentemente, a proliferação celular.

O meio Mprot, em relação aos meios MS e B5, possui uma maior concentração de sais de cálcio, o que tem efeitos positivos principalmente na reposição da parede celular (Kim *et al.*, 2001). Tentou-se potenciar a cultura de protoplastos com este facto associando ainda o seu suplemento com agarose, o que lhes confere suporte. Meios de cultura que contenham um agente gelificante (e.g., agarose) devem estar a 35 – 40 ºC quando ressuspendidos (por inversão suave) com a suspensão de protoplastos e depois colocados em caixas de Petri adequadas. Este procedimento deve ser feito rapidamente mas cuidadosamente antes do meio se tornar semi-sólido. Temperaturas acima dos 40 ºC devem ser evitadas (Davey e Anthony, 2010).

Os cloroplastos nos protoplastos derivados do mesófilo foliar perdem a sua integridade e desaparecem à medida que a formação do *microcallus* prossegue (George, 2008). Assistiu-se, contudo, após uma semana de transferência dos protoplastos para o meio de cultura Mprot, à localização dos cloroplastos em massa na periferia celular e à

possível formação de parede celular, uma vez que se observou uma birrefringência que não era verificada aquando do seu isolamento e purificação.

Ainda não foi conclusivo qual das melhores composições de Mprot permite assegurar uma eficiente regeneração de *microcallus* a partir protoplastos derivados de explantes foliares das linhas TT e TD.

4.3. Extracção e análise da qualidade de RNA total dos protoplastos

Como referido anteriormente, são várias as aplicações que podem advir da obtenção eficiente de protoplastos. Em estudos de expressão transiente de genes, os protoplastos isolados a partir de explantes foliares que expressam *GFP* podem ser separados em diferentes populações através de *fluorescence activated cell sorting* (FACS; Grønlund *et al.*, 2012). Esta conjugação entre a expressão de *GFP* e FACS é usada para demonstrar a regulação transcricional célula-específica. Deste modo, é possível analisar a quantidade bem como a qualidade do RNA total de cada população de protoplastos. O RNA é extremamente susceptível à degradação por RNases presentes no meio ambiente, o que implica não só um manuseamento cuidadoso durante a sua extracção, como também a selecção dos métodos de quantificação apropriados que possibilitem a sua análise com sucesso (Wieczorek *et al.*, 2012).

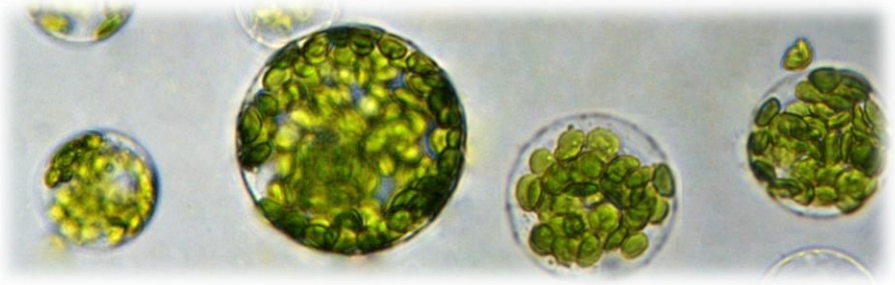
A pureza do RNA total extraído foi examinada por Nanodrop 2000c, monitorizando os rácios de absorção – OD_{260}/OD_{280} e OD_{260}/OD_{230} – para estimar a quantidade de RNA total e os níveis de proteínas e sais nas amostras, respectivamente.

A presença das subunidades de rRNA das amostras dos diferentes explantes de tamarilho foram igualmente analisadas, através de electroforese em gel de agarose, como um indicador do grau de degradação de RNA. Foram detectadas duas bandas intactas no gel, correspondentes a 28S e 18S, o que suporta o facto de haver pouca ou nenhuma degradação do RNA extraído. Estas bandas foram mais evidentes nas amostras de CNE e CE do que para o tecido embriogenicamente induzido. Porém, nas amostras de RNA extraído de explantes foliares (TD_1 a TD_3) verificou-se a fragmentação de RNA pelo arrastamento das bandas. A observação em gel de agarose realizada foi meramente

indicativa da qualidade do RNA e o marcador HyperLadder^{TM} I (Bioline) foi apenas usado como controlo da electroforese e não para medição, uma vez que as amostras não foram desnaturadas, pelo que a sua translocação no gel foi influenciada, sendo futuramente realizadas análises do RNA obtido através de gel virtual e electroferograma.

O método de extracção utilizado (adaptado de Grønlund *et al.*, 2012) demonstrou assim ser possível de aplicar na obtenção de RNA em quantidade e qualidade a partir de populações de protoplastos. Foi também importante averiguar o rendimento obtido por número de células de cada um dos tipos celulares em estudo de forma a estimar a quantidade de células necessária para se obter um determinado rendimento de RNA passível de ser utilizado em técnicas subsequentes como a síntese de cDNA ou a sequenciação de RNA.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS



O conjunto de resultados obtidos neste trabalho permitiu definir protocolos optimizados para o isolamento e purificação de protoplastos a partir de diferentes explantes de tamarilho. Através da comparação entre todos os tratamentos aplicados aos explantes foliares, definiu-se como tratamento mais eficiente o que envolveu: i) isolamento de protoplastos em solução enzimática constituída por celulase a 2% (w/v) e macerozima a 0,5% (w/v), em solução K3 com sacarose a 0,4 M (a pH 5,7); ii) incubação enzimática *overnight* a 27 ºC e 30 rpm, e iii) centrifugação por gradiente de densidade a 100 *g* durante 10 minutos, com obtenção de protoplastos em banda interfásica. Este procedimento permitiu obter rendimentos de 2,0410±0,2933 x 10^6 protoplastos / g PF nas linhas diplóides e 8,572±0,630 x 10^5 protoplastos / g PF na linha tetraplóide.

No entanto, não foi possível estabelecer um protocolo eficiente de obtenção e cultura de protoplastos com vista à regeneração de plantas de tamarilho, uma vez que as condições necessárias para a cultura dos protoplastos isolados a partir de folhas, quer das linhas diplóides quer tetraplóide, carece ainda de investigação futura.

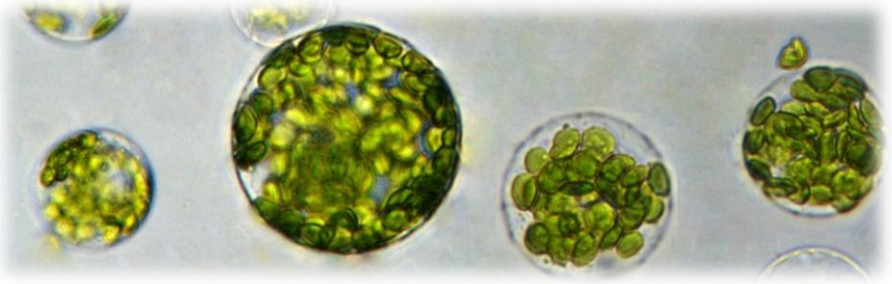
Com base nos rendimentos mais elevados obtidos para o isolamento e purificação de protoplastos derivados do calo embriogénico (6,692±4,2110 x 10^5 protoplastos / g PF) definiu-se igualmente o procedimento mais eficiente como sendo o que envolveu: i) digestão enzimática em solução enzimática constituída por celulase a 1% (w/v), driselase a 0,2% (w/v) e pectinase a 0,02% (w/v), em solução K3 com sacarose a 0,4 M (a pH 5,7); ii) incubação enzimática de 20 – 22 horas a 25 ºC e 30 rpm, e iii) purificação dos protoplastos por centrifugação a 100 *g* durante 10 minutos, seguida de outra centrifugação a 50 *g*, 5 minutos, com obtenção dos protoplastos em *pellet*. Estas variáveis também foram aplicadas ao calo não embriogénico e a explantes embriogenicamente induzidos, exceptuando a digestão enzimática ter ocorrido *overnight* a 27 ºC.

O crescente interesse na obtenção de protoplastos deve-se não apenas à sua importância enquanto ferramenta biotecnológica, mas também em grande parte à sua utilidade na investigação do funcionamento dos sistemas biológicos, nomeadamente na compreensão dos mecanismos envolvidos na desdiferenciação das células vegetais. Sendo o tamarilho um sistema com fortes indicativos da sua aplicação na caracterização funcional de determinados aspectos do desenvolvimento de plantas, particularmente na aquisição de capacidade embriogénica, a optimização destes protocolos de obtenção de protoplastos é

de extrema importância para o aumento do potencial de aplicação deste sistema em análises de processos de desenvolvimento vegetal como os referidos. Processos esses que são caracterizados por alterações transcricionais massivas, pelo que a extracção de RNA total dos protoplastos provenientes dos diferentes explantes em estudo, bem como a análise da sua quantidade e qualidade, constituíram um passo inicial para abordagens futuras no estudo dos mecanismos que regem a embriogénese somática de tamarilho.

Do ponto de vista do melhoramento de *S. betaceum*, a obtenção de protoplastos dos genótipos diplóide e tetraplóide pode ter um grande potencial biotecnológico pela sua aplicação na obtenção mais eficaz de híbridos intraespecíficos que reúnam características de genótipos de interesse, bem como na formação de híbridos somáticos triplóides, caracterizados, muitas vezes, pela produção de frutos partenocárpicos e, portanto, com um elevado interesse comercial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Acquaah G. (Ed.) (2007). Principles of plant genetics and breeding (pp. 214-130). Malden: Wiley - Blackwell.

Alves A. (2012). Ensaios de embriogénese somática e transformação genética em tamarilho (*Cyphomandra betacea* [Cav.] Sendt.) Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

Anjum M.A. (1998). Effect of protoplast source and media on growth and regenerability of protoplast-derived calluses of *Solanum tuberosum* L.. Acta Physiologiae Plantarum. 20 (2): 129-133.

Antunes P. (2010). Indução de plantas tetraplóides através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betacea*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*). Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.

Ayala D., Torres M.L., Arahana V. (2011). *Nicotiana glauca* Plant Regeneration Protocol From Mesophyll Protoplasts. Journal of Crop Improvement. 25 (1): 1-10.

Barghchi M. (1986). *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR) (p. 52). New Zealand.

Barghchi M. (1998). *In vitro* regeneration, plant improvement and virus elimination of tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt)]. In: M.R. Davey, P.G. Alderson, K.C. Lowe, J.B. Power (Eds.), Tree Biotechnology – Towards the Millennium (pp. 173-185). Nothingham: Nothingham University Press.

Bengochea T., Dodds J.H. (Eds.) (1986). Plant Protoplasts: A Biotechnological Tool for Plant Improvement. The Netherlands: Springer.

Bhojwani S.S., Razdan M.K. (Eds.) (1996). Plant Tissue Culture: Theory and Practice (pp. 337-372). The Netherlands: Elsevier.

Bock R. (2001). Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J Mol Biol. 321: 425-38.

Bois D. (1927) *Les plantes alimentaires*, vol I. Paris, Ed. Paul Lechevalier.

Borlaug N.E., Dowswell C.R. (2005). Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. Proceedings of the international congress "In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution" (pp. 3-23).

Canhoto J.M. (1994). *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae): Estudos Sobre Embriogénese e Outros Tipos de Morfogénese. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra.

Canhoto J.M. (Ed.) (2010). Biotecnologia Vegetal (pp. 221-252). Imprensa da Universidade de Coimbra.

Canhoto J.M., Lopes M.L., Cruz G.S. (2005). Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: S.M. Jain, P.K. Gupta (Eds.). Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants (pp. 379-389). Dordrecht: Springer.

Castelblanque L., García-Sogo B., Pineda B., Moreno V. (2010). Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 100 (1): 107-112.

Catalogue of life http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/40edcdb4f15977d2030076c109696d6d, acedido a 1/07/2015.

Chawla H.S. (2010). Introduction to Plant Biotechnology (3rd Ed.). Enfield: Science Publishers.

Chesnokov Y.V., Meister A., Manteuffel R. (2002). A chimeric green fluorescent protein gene as an embryogenic marker in transgenic cell cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Sci. 162: 59-77.

Cocking E.C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature. 187: 927-929.

Comai L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. Nature Reviews Genetics 6: 836-846.

Correia S. (2011). Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra.

Correia S.I., Canhoto J.M. (2012). Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From *in vitro* cloning to genetic manipulation. Scientia Horticulturae. 148: 161-168.

Correia S.I., Lopes M.L., Canhoto J.M. (2009). Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. Acta Hort. 839: 157 -164.

Correia S.I., Lopes M.L., Canhoto J.M. (2011). Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). Trees. 25: 1009-1020.

Cohen D., Elliot D. (1979) Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. Comb Proc Int Plant Prop Soc. 29: 177-179.

Daniell H., Khan M.S., Allison L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. Trends Plant Sci. 7: 84-91.

Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. Biotechnol. Adv. 23 (2): 131-71.

Davey M.R., Anthony P., Patel D., Power J.B. (2010). Plant Protoplast: isolation, culture and plant regeneration. In: M.R. Davey, P. Anthony (Eds.). Plant Cell Culture Essential Methods (pp.153-173). London: Wiley-Blackwell.

De Rosso V.V., Mercadante A.Z. (2007). HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. J Agric Food Chem. 55: 9135-9141.

Dovzhenko A., Koop H.U. (2003). Sugarbeet (*Beta vulgaris* L): shoot regeneration from *callus* and *callus* protoplasts. Planta. 217: 374-381.

Eeckhaut T., Lakshmanan P.S., Deryckere D., Van Bockstaele E., Van Huylenbroeck J. (2013). Progress in plant protoplast research. Planta. 238: 991-1003.

Estavillo G.M., Verhertbruggen Y., Scheller H.V., Pogson B.J., Heazlewood J.L., Ito J. (2014). Isolation of the Plant Cytosolic Fraction for Proteomic. In: J.V. Jorrin-Novo, S. Komatsu, W. Weckwerth, S. Wienkoop (Eds.). Plant Proteomics: Methods and Protocols. 2nd Ed. Methods in Molecular Biology. Vol. 1072 (pp. 453-467). Humana Press. Springer.

FAO, http://www.fao.org/biotechnology/en/, acedido a 5/06/2015.

Ferrando M., Spiess W.E.L. (2001). Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions. Journal of Food Engineering. 49 (2–3): 115-127.

Franklin C.I., Dixon R.A. (1994). Initiation and maintenance of *callus* and cell suspension cultures. In: R.A. Dixon, R.A. Gonzales (Eds.). Plant Cell Culture – a practical approach (p. 1). 2nd Ed. New York: Oxford University Press.

Gad A.E., Rosenberg N., Altman A. (1990). Liposome-mediated gene delivery into plant cells. Physiologia Plantarum. 79: 177-183.

Galbraith D.W. (1989). Analysis of higher plants by flow cytometry and cell sorting. International Review Cytology. 116: 165-228.

Galbraith D.W. (2014). Flow Cytometry and Sorting in *Arabidopsis*. In: J.J. Sanchez-Serrano e J. Salinas (Eds.). *Arabidopsis* Protocols. 3rd Ed. (pp. 509-538). Humana Press, Springer.

Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima O. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

George E.F., Michael A.H., De Klerk G.-J. (Eds.) (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Ed. Volume 1. The Background. The Netherlands: Springer.

Giri C.C., Giri A. (Eds.) (2007). Plant Biotechnology: Practical Manual (pp.27-38). New Delhi: I K International Publishing House Pvt.

Golds T.J., Maliga P., Koop H.-U. (1993). Stable transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. Bio/Technology. 11: 95-7.

Grønlund J.T., Eyres A., Kumar S., Buchanan-Wollaston V., Gifford M.L. (2012). Cell Specific Analysis of *Arabidopsis* Leaves Using Fluorescence Activated Cell Sorting. J. Vis. Exp. (68), e4214.

Guimarães M.L., Cruz G.S., Montezuma-de-Carvalho J.M. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Plant Cell Tiss Org Cult 15: 161-167.

Guimarães M., Tomé M., Cruz G. (1996). *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). In: Y.P.S. Bajaj (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Volume 35. Trees IV. (pp. 120-137). Berlin: Springer.

Guzzo F.F., Cantamessa K.K., Portaluppi P.P., Levi M.M. (2002). Flow cytometry and sorting of protoplasts from carrot cell cultures reveal two cell subpopulations with different morphogenetic potential. Plant Cell Reports 21(3): 214-219.

Hervé C., Marcus S.E., Knox J.P. (2011). Monoclonal Antibodies, Carbohydrate-Binding Modules, and the Detection. In: Z.A. Popper (Ed.) The Plant Cell Wall: Methods and Protocols (pp.112). Humana Press. Springer Protocols.

Horváth E. (2009.) Protoplast isolation from *Solanum lycopersicum* L. leaf tissues and their response to short-term NaCl treatment. Acta Biologica Szegediensis. 53 (2): 83-86.

Huang L. (2005). High - Throughput Transient Gene Expression in Plant Cells. Tese de Mestrado. Universidade do Havai.

Hurtado N.H., Morales A.L., González-Miret M.L., Escudero-Gilete M.L., Heredia F.J. (2009). Color, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). Food Chem 117: 88-93.

Irninger M. (2003). A Evolução da Agricultura – da Idade Média à Era Pré-industrial. In: E.V. Schärer-Züblin (Ed.). Os Genes e a Alimentação (pp. 38-46). Foundation Alimentarium.

Karesch H., Bilang R., Scheid O.M., Potrykus I. (1991). Direct gene transfer to protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports. 9: 571-574.

Kärkönen A., Santanen A., Kuninori I., Fukuda H. (2011). Plant Tissue Cultures. In: Z.A. Popper (Ed.) The Plant Cell Wall: Methods and Protocols (pp.1-20), Humana Press, Springer Protocols.

Kikkawa H., Nagata T., Matsui C, Takebe I. (1982). Infection of Protoplasts from Tobacco Suspension Cultures by Tobacco Mosaic Virus. J. Gen. Virol. 63: 451-456.

Kikuta Y., Fujino K., Saito W., Masuda K., Okazawa, Y. (1986). Protoplast culture of potato: An improved procedure for isolating viable protoplasts. J. Fac. Agric. Hokkaido University. 62: 429-439.

Kim G.H., Klotchkova T.A., Kang Y.-M. (2001). Life without a cell membrane: regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the marine green alga *Bryopsis plumosa*. J. Cell Sci. 114: 2009-2014.

Koop H.-U., Steinmuller K., Wagner H., Rossler C., Eibl C., Sacher L. (1996). Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. Planta. 199: 193-201.

Kou M., Yen J., Hong J., Wang C. (2008). *Cyphomandra betacea* Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. LWT – Food Sci Technol 42: 458-463.

Landgren C.R. (1978). Preparation of Protoplasts of Plant Cells. In: D.M. Prescott (Ed.), Methods in Cell Biology. Vol. 20 (pp. 159-168). New York: Academic Press.

Latif M., Mumtaz N., Davey M.R., Power J.B. (1993). Plant regeneration from protoplasts isolated from cell suspension cultures of the wild tomato, *Lycopersicon chilense* Dun. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32 (3): 311-317.

Lei R., Qiao W., Hu F., Jiang H., Zhu S. (2015). A simple and effective method to encapsulate tobacco mesophyll protoplasts to maintain cell viability. MethodsX 2: 24-32.

Ling A.P., Phua G.A., Tee C.S., Hussein S. (2010). Optimization of protoplast isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. Journal of Medicinal Plants Research 4(17): 1778-1785.

Liu J. (2005). Protoplast Isolation and Culture of Woody Plants. In: S.M. Jain, P.K. Gupta (Eds.). Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol.77 (pp. 553-566). Dordrecht: Springer.

Lopes M.L., Ferreira M.R., Carloto J.M., Cruz G.S., Canhoto J.M. (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol.6. (pp. 433-455). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (Eds.) (2006). Plant Cell Culture Protocols. 2nd Ed. (pp 3-8). New Jersey: Humana Press.

Maliga P. (2003). Progress towards commercialisation of plastid transformation technology. Trends Biotechnol. 21: 20-8.

Maheshwari S.C., Gill R., Maheshwari N., Gharyal P.K. (1986). Isolation and Regeneration of Protoplasts from Higher Plants. In: J. Reinert, H. Binding (Eds.), Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells, Results and Problems in Cell Differentiation. Vol. 12 (pp 3-36). Berlin: Springer.

McCane J., Widdowson D.A. (1992) In: B. Holland, I. Unwin, D. Buss (Eds.). Fruit and Nuts (Suppl. to the composition of foods.). 5th Ed. (pp. 74-77). London: The Royal Society of Chemistry.

Meadows L.R. (2002). Growing tamarillo relatives. In: The New Zealand Home Garden. www.naturalhub.com., acedido a 5/06/2015.

Melchers G., Sacristán M.D., Holder A.A. (1978). Somatic Hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg Res. Commun. 43: 203-218.

Menczel L., Nagy F., Kiss Z.R., Maliga P. (1981). Streptomycin Resistant and Sensitive Somatic Hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: Correlation of Resistance to *N. tabacum* Plastids. Theor. Appl. Genet. 59: 191-195.

Mertz C., Brat P., Caris-Veyrat C., Günata Z. (2009). Impact of thermal treatment coupled with oxygen level on carotenoids and vitamin C degradations of tamarillo puree (*Solanum betaceum* Cav.). Food Chemistry.

Morton J.F. (Ed.) (1987). Fruits of Warm Climates (pp. 437-440). Miami: Florida Flair Books.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

Mustafa N.R., De Winter W., van Iren F., Verpoorte R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nat Protoc. 6 (6): 715-42.

Nagata T., Okada K., Takebe I., Matsui C. (1981). Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). Molecular and General Genetics. 184: 161-165.

Nagata T., Takebe I. (1971). Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta. 99: 12-20.

Nagy J.I., Maliga P. (1976). *Callus* induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. Z Pflanzenphysiol 78: 453-455.

Navratilova B. (2004). Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae. Hort. Sci. (Prague) 31: 140-157.

Negrutiu I., Dewulf J., Pietrzak M., Botterman J., Rietveld E., Wurzer-Figurelli E.M., Ye, De, Jacobs M. (1990). Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. II.

Transient expression vs stable transformation: analysis of parameters influencing gene expression levels and transformation efficiency. Physiologia Plantarum.79: 197-205.

Neuhaus G., Spangenberg G. (1990). Plant transformation by microinjection techniques. Physiologia Plantarum. 79: 213-217.

Noor Atiqah A.A.K., Maisarah A.M. e Asmah, R. (2014). Comparison of antioxidant properties of tamarillo (*Cyphomandra betacea*), cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). International Food Research Journal 21(6): 2355-2362.

Obando M., Goreux A., Jordan M. (1992) Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. Ciencia e Investigacion Agraria 19: 125-130.

Obando M., Jordan M. (2001) Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo) cultivated *in vitro*. Acta Hort 560: 429-432.

Oliveira M.M., Pais M.S. (1991). Plant regeneration from protoplasts of long – term *callus* cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayword (kiwifruit). Plant Cell Reports, 9: 643-646.

O'Neill C., Horváth E., Dix P.J., Medgyesy P. (1993). Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. Plant J. 3: 729-38.

Park J.K., Park S.H., Craven J.E. (2012). Protoplast Isolation and Fusion. In: R.H. Smith (Ed.). Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. 3rd Ed. (pp. 147 – 154). Elsevier.

Pongchawee K., Na-Nakorn U., Lamseejan S., Poompuang S., Phansiri S. (2006). Factors affecting protoplast isolation and culture of *Anubias nana* (Engles). International Journal of Botany 2 (2): 193-200.

Rakoczy-Trojanowska M. (2002). Alternative methods of plant transformation - a short review. Cell Mol Biol Lett.7: 849-58.

Rákosy-Tican L., Menczel L. (1998). Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Nicotiana africana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54: 93-95.

Reinert J., Yeoman M.M. (Eds.) (1982). Plant Cell and Tissue Culture – A Laboratory Manual: Isolation, Culture and Fusion of Protoplasts from Higher Plants (pp. 40-43). Berlin: Springer.

Rezazadeh R., Randall P. Niedz (2015). Protoplast isolation and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) using experiments in mixture-amount design. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). DOI 10.1007/s11240-015-0790-7

Robledo-Paz A., Vázquez-Sánchez M.N., Adame-Alvarez R.M., Jofre-Garfias A.E. (2006). *Callus* and Suspension Culture Introduction, Maintenance and Characterization. In: V.M. Loyola-Vargas, F. Vázquez-Flota (Eds.). Plant Cell Culture Protocols. 2nd Ed. (pp. 59-70). New Jersey: Humana Press.

Sheen J. (2001). Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. Plant Physiol. 127: 1466-1475.

Shen J., Fu J., Ma J., Wang X., Gao C., Zhuang C., Wan J., Jiang L. (2014). Isolation, Culture, and Transient Transformation of Plant Protoplasts. Current Protocols in Cell Biology. 63: 2.8.1-2.8.17.

Shiba T., Mii M. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of highly regenerable cell suspension cultures in *Dianthus acicularis*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 80: 393-398.

Siemens J., Sacristán M.D. (1994). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Matthiola incana* (L.). R. Br. Plant Cell Rep. 14: 446-449.

Smith, H. (Ed.) (1977). The Molecular Biology of Plant Cells. Berkeley: University of California Press (http://publishing.cdlib.org/ucpressebooks/view?docId=ft796nb4n2&chunk.id=d0e23739&toc.depth=1&toc.id=d0e23739&brand=eschol , acedido a 5/07/2015).

Song C., Liu S., Xiao J., Zhou Y., Qin Q., Zhang C., Liu Y. (2012). Polyploid organisms. Science China Life Science 55: 301-311.

Sugiyama M. (2015) Historical review of research on plant cell dedifferentiation. J Plant Res. 128(3): 349-59.

Takebe I., Labib C., Melchers G. (1971). Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften. 58: 318-320.

Thorpe T.A. (2006). History of Plant Tissue Culture. In: V. M. Loyola-Vargas, F. Vázquez-Flota (Eds.). Plant Cell Culture Protocols. 2nd Ed. (pp.9-34). New Jersey: Humana Press.

Tomar U.K., Dantu P.K. (2009). Protoplast Culture and Somatic Hybridization. In: G. Tripathi (Ed.). Cellular and Biochemical Science (pp. 876-891). New Delhi: I K Int. Publishing House Pvt.

Tomé M.A. (1991). Isolamento, Cultura e regeneração de plantas a partir de protoplastos de *Solanum tuberosum* L. cvs. Bintje e Desirée. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

Tomé M.A., Guimarães M.L., Cruz G.S. (1992). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Abstr 1st Congresso Hispano - Luso de Biotecnologia, Santiago de Compostela, Espanha.

Tudses N., Premjet S., Premjet N. (2015). Establishment of Method for Protoplast Fusion with PEG-mediated between *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* L. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research. 4(1): 50-56.

d'Utra Vaz F.B., Santos A.V., Manders G., Cocking E.C., Davey M.R., Power J.B. (1993). Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv flavicarpa Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. Plant Cell Rep. 12(4): 220–5.

Villegas-Ruiz X., Harris G.K., Bárcenas-Pozos M.E., Jordan C. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of tamarillo fruit (*Cyphomandra betacea* Sendt.) extracts on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. The FASEB Journal. 26: 823.4.

Watanabe M., Watanabe Y., Shimada N. (1992). Colorimetric estimation of leaf-protoplast potential-to-divide by use of 2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium chloride. Journal of Plant Physiology 44: 111-114.

Wieczorek D., Delauriere L., Schagat T. (2012). Methods of RNA Quality Assessment. Promega Corporation.

Wubie, A.J., Hu Y., Li W., Huang J., Guo Z., Xu S., Zhou T. (2014). Factors analysis in protoplast isolation and regeneration from a chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. Int. J. Agric. Biol. 16: 89–96.

Yadav R.K., Snipes S., Girke T., Reddy G.V. (2013). Gene Expression Analysis of Shoot Apical Meristem Cell Types. In: I. De Smet (Ed.). Plant Organogenesis: Methods and Protocols. Vol. 959 (p.238). New York: Springer.

Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat. Protoc. 2: 1565-1572.

Zhai Z., Jung H., Vatamaniuk O.K. (2009). Isolation of Protoplasts from Tissues of 14-day-old Seedlings of *Arabidopsis thaliana*. JoVE. 30.

Zhang J., Shen W., Yan P., Li X. Zhou P. (2011). Factors that influence the yield and viability of protoplasts from *Carica papaya* L.. African Journal of Biotechnology. 10 (26): 5137-5142.