



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Rita Neves Puga

**INICIAÇÃO DE CULTURAS CELULARES A PARTIR
DE PROTOPLASTOS DE TAMARILHO
(*SOLANUM BETACEUM* CAV.)**

Dissertação no âmbito do Mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia vegetal, orientada pela Doutora Sandra Isabel Marques Correia e Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

“Segue o teu destino, rega as
tuas plantas, ama as tuas
rosas. O resto é a sombra de
árvores alheias.”

Fernando Pessoa

Project “RENATURE - Valorization of the Natural Endogenous Resources of the Centro Region” (CENTRO-01-0145-FEDER-000007), funded by the Comissão de Coordenação da Região Centro (CCDR-C) and subsidized by the European Regional Development Fund (FEDER).

Project PTDC/BAA-AGR/32265/2017 "Tamarillo breeding: better plants for better products".



AGRADECIMENTOS

Chegando ao fim desta etapa tão importante não poderia deixar de agradecer a todos os que me acompanharam durante este percurso e contribuíram para que a realização deste projeto fosse possível.

Em primeiro lugar, um agradecimento especial aos meus orientadores, pelo tempo que dispensaram e por todo o conhecimento que me transmitiram. Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, pela orientação, pela confiança depositada, pelo apoio científico e pelas oportunidades que me proporcionou. À Doutora Sandra Correia, por ter sido uma excelente orientadora, pela disponibilidade, pela motivação e pela paciência.

Aos meus colegas de laboratório, João, Mariana, Daniela, Inês e Cátia pela companhia, pela amizade e pelo esclarecimento de dúvidas durante a execução do trabalho.

À Elsita, pela boa disposição, pelas conversas nas horas de almoço, pelo incentivo e pelos bons conselhos.

Aos meus amigos, Miguel, Tércia, Mariana e Patrícia, por estarem sempre presentes, por todas as gargalhadas, por me confortarem sempre com as palavras certas nos momentos de desmotivação e por terem partilhado comigo momentos inesquecíveis. Sem dúvida que vocês vão fazer parte das minhas melhores memórias de Coimbra.

À minha família, a quem devo todo o meu percurso académico, por terem tornado tudo isto possível, pelo apoio incondicional, pela força, pelo incentivo que me transmitiram e por se orgulharem tanto de mim.

A todos os que nunca deixaram de acreditar em mim.

ÍNDICE

RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Considerações gerais.....	3
1.2. Tamarilho	4
1.2.1. Caracterização, distribuição geográfica e importância económica	4
1.3. Propagação e cultura <i>in vitro</i>	8
1.4. Protoplastos	9
1.5. Objetivos	17
2. Material e Métodos.....	19
2.1. Material Vegetal	21
2.2. Métodos	21
2.2.1. Cultura e pré - condicionamento do material vegetal.....	21
a) Explantes foliares	21
b) <i>Calli</i> embriogénicos	22
2.2.2. Isolamento e purificação de protoplastos a partir de explantes foliares	23
2.2.3. Isolamento e purificação de protoplastos a partir de suspensões celulares de <i>calli</i> embriogénicos.	28
2.3. Contagem e determinação da viabilidade dos protoplastos.....	31
2.4. Cultura de protoplastos	33
3. Resultados.....	37
3.1. Isolamento e purificação de protoplastos.....	39
3.1.1. A partir de explantes foliares.....	39
3.1.2. A partir de suspensões celulares de <i>calli</i> embriogénicos.....	44

3.2. Cultura de protoplastos	47
3.2.1. Obtidos a partir de explantes foliares	47
3.2.1. Obtidos a partir de suspensões celulares de <i>calli</i> embriogénicos	55
4. Discussão.....	59
4.1. Isolamento e purificação de protoplastos	61
4.2. Cultura de protoplastos	64
5. Conclusão e perspetivas futuras	69
6. Referências bibliográficas	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Solanum betaceum</i> . (A) Exemplar de tamarilho vermelho existente no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. (B) Flores em diferentes estádios de desenvolvimento. (C) Conjunto de frutos. (D) Frutos com diferentes tonalidades, amarelo, laranja e vermelho. (E) Polpa dos frutos	5
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>S. betaceum</i>	7
Figura 3 - Esquema representativo do isolamento e purificação de protoplastos, com subsequente regeneração de plantas.....	12
Figura 4 - Protoplastos isolados a partir do mesófilo foliar de <i>Arabidopsis thaliana</i> (A) de <i>Nicotiana tabacum</i> (B) e de <i>S. betaceum</i> (C)	16
Figura 5 – Material utilizado para o isolamento de protoplastos. (A) Rebentos caulinares de tamarilho	23
Figura 6 - Representação esquemática do isolamento de protoplastos a partir de explantes foliares.	25
Figura 7 - Representação esquemática dos dois métodos de purificação de protoplastos a partir de explantes foliares.....	27
Figura 8 - Representação esquemática do isolamento e purificação de protoplastos a partir de suspensões celulares de <i>calli</i> embriogénicos.....	29
Figura 9 – Isolamento e purificação de protoplastos do mesófilo foliar de tamarilho e tabaco e de <i>calli</i> embriogénicos de tamarilho.....	30
Figura 10 – (A) Câmara de contagem do hemocitómetro; (B) metodologia adotada na contagem dos protoplastos; (C) Limites de exclusão e inclusão dos protoplastos na contagem.	31
Figura 11 – Representação esquemática da cultura de protoplastos.....	34
Figura 12 – Resultados obtidos a partir do primeiro método de purificação e lavagem com solução W5	40
Figura 13 – Banda interfásica obtida após a centrifugação de gradiente de densidade (A) Protoplastos de tabaco (B) e tamarilho (C) da banda interfásica obtidos a partir de explantes foliares.....	41

Figura 14 – (A) Rendimento médio dos protoplastos obtidos a partir de explantes foliares de tabaco e tamarilho; (B) Viabilidade dos protoplastos de tabaco e tamarilho obtidos a partir de explantes foliares	42
Figura 15 - Protoplastos de tabaco (A) e tamarilho (B) obtidos a partir de explantes foliares corados com Evans blue	43
Figura 16 – Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de <i>calli</i> embriogénicos CE1 (A) e CE2 (B).....	45
Figura 17 - Rendimento dos protoplastos obtidos a partir suspensões celulares de calo embriogénico 1 (CE1) e calo embriogénico 2 (CE2).....	46
Figura 18 – Protoplastos de CE2 corados com Evans blue.	46
Figura 19 - Protoplastos de tabaco após 7 dias em diferentes meios de cultura	48
Figura 20 - Protoplastos de tamarilho após 7 dias em diferentes meios de cultura	49
Figura 21 – Protoplastos de tamarilho (A) e tabaco (B) após dois dias em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP.	50
Figura 22 – Protoplastos de tamarilho em <i>droplets</i> em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP.....	51
Figura 23 – Protoplastos de tabaco marcados com calcofluor white após 7 dias em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP.....	52
Figura 24 - Protoplastos de tamarilho marcados com calcofluor white após 7 dias em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP.....	53
Figura 25 – Evolução dos protoplastos de tamarilho em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP.....	54
Figura 26 - Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de CE2 marcados com calcofluor white após 2 dias em meio de cultura MS 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP (A) e B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP (B)	55
Figura 27 – Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de CE2 marcados com calcofluor white após 7 dias em meio MS + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP.	57
Figura 28 - Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de CE2 marcados com calcofluor white após 7 dias em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP	58

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

B5 – Meio de cultura Gamborg (1968)

cm - Centímetro

g – Grama

h – Hora

l – Litro

m – Metro

M – Molar

MES – Ácido 2-(N-morfolino)
etanossulfônico monohidratado

mg – Miligrama

min – Minuto

ml – Mililitro

mm – Milímetro

BAP – 6-benzilaminopurina

BSA – Albumina de soro bovino

mM – Milimolar

MS – Meio de cultura Murashige e

Skoog (1962)

NAA – Ácido 1-naftaleno acético

nm – Nanómetro

°C – Grau Celsius

p/v – Peso/volume

PF – Peso fresco

Rpm – Rotações por minuto

s – Segundo

TDZ – Tidiázurão

μ – Micro

RESUMO

Solanum betaceum (Cav.), vulgarmente conhecido como tamarilho ou tomate de árvore, é uma *Solanaceae* que produz frutos comestíveis com interesse económico. A baixa variabilidade genética observada em populações naturais desta espécie, devido à endogamia natural, impõe limitações aos programas de melhoramento, que podem ser superadas pela combinação de abordagens clássicas e biotecnológicas.

Os protoplastos têm um grande potencial no melhoramento de plantas, uma vez que podem ser usados para transformação genética, hibridização somática e regeneração a partir de uma única célula. Poucos dados estão disponíveis sobre o isolamento, cultura e regeneração de protoplastos de tamarilho. Trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório permitiram o isolamento de protoplastos, mas sem que ocorressem divisões. Apresentam-se agora os primeiros resultados mostrando a divisão celular em protoplastos de tamarilho em cultura a partir de folhas de rebentos *in vitro* e linhas celulares embriogénicas.

O isolamento de protoplastos foi conseguido utilizando uma combinação de 2 % (p/v) de celulase "Onozuka" R-10 e 0,5 % (p/v) de macerozima R-10 em solução de isolamento (0,4 M manitol, 20 mM MES-KOH, 20 KCl mM, BSA a 0,1 % e CaCl₂ 10 mM), durante a noite a 27 °C, no escuro, com agitação. Após a digestão da parede celular, os protoplastos foram purificados sob centrifugação a 100 g durante 5 min. Os protoplastos depositados numa banda de interfase foram removidos para meio fresco da mesma composição da solução de isolamento, mas sem as enzimas. Os rendimentos médios, avaliados por contagem direta em hemocitómetro, deram um rendimento de $7,75 \pm 6,74 \times 10^5$ protoplastos g⁻¹ PF. Os ensaios de viabilidade, utilizando calcofluor white, bem como a coloração com Evans blue, mostraram que as células viáveis alcançaram valores de $56,78 \pm 19,97$ %.

Os protoplastos isolados foram cultivados em várias condições para testar variáveis tais como meios basais, aditivos dos meios de cultura, reguladores de crescimento de plantas e incorporação de agarose *versus* cultura em meio líquido. O meio B5 basal, suplementado com 0,1 mg/l de 2,4-D, 1,0 mg/l de NAA e 1,0 mg/l de BAP apresentou os melhores resultados, observando-se a formação da parede celular e divisões celulares após sete dias de cultura. Ao fim de 15 dias de cultura era já visível a formação de microcolónias.

Palavras-chave: divisão celular; isolamento de protoplastos; microcolónias; *Nicotiana tabacum*; parede celular.

ABSTRACT

Solanum betaceum (Cav.), commonly known as tamarillo or tree tomato, is a *Solanaceae* that produces edible fruits with economic interest. The low genetic variability observed in natural populations of this species, due to natural inbreeding, imposes limitations to breeding programs, that can be overcome through the combination of classical and biotechnological approaches.

Protoplasts have a large potential for plant breeding since they can be used for genetic transformation, somatic hybridization and single cell regeneration. Few data are available over the isolation, culture and regeneration from protoplasts of tamarillo. Previous work carried out in our lab allowed the isolation of protoplasts but without further division. Now results showing cell division in cultured protoplasts of tamarillo from *in vitro* established shoots and embryogenic cell lines are presented for the first time.

Protoplast isolation was achieved using a combination of 2 % (w/v) cellulase “Onozuka” R-10 and 0.5 % (w/v) macerozyme R-10 on isolation solution buffer (0,4 M manitol, 20 mM MES–KOH, 20 mM KCl, 0.1% BSA e 10 mM CaCl₂), overnight at 27 °C, in the dark with agitation. Following digestion of the cell wall protoplasts were purified under centrifugation at 100 *g* for 5 min. Protoplasts settled in an interphase band being removed to fresh medium of the same composition of the isolation solution but without the enzymes. Average yields, evaluated by direct counting in a hemocytometer, gave a number of $7.75 \pm 6.74 \times 10^5$ protoplasts *g*⁻¹ FW. Viability assays, using calcofluor white as well as blue Evans staining, showed that viable cells reached values of 56.78 ± 19.97 %.

Isolated protoplasts were cultured in several conditions to test variables such as basal media, culture media additives, plant growth regulators and agarose embedding versus liquid culture. B5 basal medium, supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D, 1.0 mg/l NAA and 1.0 mg/l BAP, showed the best results, with cell wall formation and cell divisions being observed after 7 days of culture. After 15 days of culture the formation of microcolonies was already visible.

Keywords: cell division; cell wall; protoplasts isolation; microcolonies, *Nicotiana tabacum*.

1. Introdução



1.1. Considerações gerais

A Biotecnologia tem sido considerada, nas últimas décadas, a área tecnológica com maior potencial para a solução de vários problemas da sociedade, entre eles, os do setor agrícola. Com o contínuo aumento da população mundial, a diminuição da área de solos agrícolas e os elevados padrões de vida em alguns países em desenvolvimento, acentuam-se as preocupações em relação 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 (Chrispeels e Gepts, 2018).

Para que as necessidades alimentares globais sejam satisfeitas, é importante a combinação das tecnologias convencionais com a biotecnologia (Borlaug e Dowsell, 2003), sendo necessário recorrer a métodos mais eficazes de melhoramento de plantas capazes de permitir a manipulação mais eficaz do genoma de forma a conseguir variedades cada vez mais produtivas e com um valor acrescentado em termos ambientais (Chrispeels e Gepts, 2018).

No decorrer dos anos têm vindo a ser desenvolvidas diversas metodologias com vista ao avanço científico na área da biologia de plantas, cuja exploração tem contribuído para o melhoramento das colheitas (Chawla, 2010). Estas metodologias estão integradas na Biotecnologia Vegetal, que é definida como um conjunto de técnicas que envolve a manipulação de plantas (Canhoto, 2010) e que tem como objetivo a obtenção de novas características ou produtos para a realização de determinadas funções, com base nas potencialidades dos organismos, das suas células ou mesmo organitos, para fins práticos ou industriais (Chawla, 2010).

Pelo seu potencial de utilização e otimização dos recursos vegetais, a Biotecnologia Vegetal é crucial para o aumento da produção agrícola mundial. O aperfeiçoamento destas novas tecnologias, e a sua aplicação ao desenvolvimento de sistemas de propagação de plantas, apresenta-se como uma área com inúmeras potencialidades e possibilidades de exploração científica e socioeconómica (Canhoto, 2010).

A cultura *in vitro* está integrada na vasta área da Biotecnologia Vegetal e consiste no estabelecimento e manutenção de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células em condições laboratoriais (Chawla, 2010). Tem como principais objetivos a clonagem de plantas, a produção de metabólitos secundários, a transformação genética, a fusão de protoplastos ou a obtenção de plantas haploides (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006).

No Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra têm sido realizados vários trabalhos na área da Biotecnologia Vegetal, nomeadamente no âmbito do melhoramento e micropropagação de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.). Os resultados obtidos confirmam o potencial desta espécie não apenas na aplicação de processos eficazes de micropropagação, mas também como modelo experimental relevante no estudo dos mecanismos básicos que regem esses mesmos processos. É nesse contexto, que surge a necessidade do desenvolvimento de mais uma importante ferramenta biotecnológica para utilização com o tamarilho, nomeadamente a obtenção de protoplastos e a regeneração de plantas a partir destas células. Uma manipulação eficaz de protoplastos de tamarilho com origem em diferentes tecidos permitirá novas abordagens em estudos de biologia funcional na espécie, assim como também ampliará as potencialidades do melhoramento de cultivares com interesse agroeconómico. Para além disso, pode permitir seguir todo o processo de regeneração a partir de uma única célula, ao contrário daquilo que se verifica quando a regeneração ocorre a partir de um tecido cultivado onde estão presentes milhares de células, o que torna difícil seguir os primeiros passos da expressão da totipotência.

1.2. Tamarilho

1.2.1. Caracterização, distribuição geográfica e importância económica

A espécie *Solanum betaceum* é vulgarmente conhecida como tamarilho, “tree tomato” ou “tomate de la paz” (Bois, 1927). A denominação tamarilho surgiu na Nova Zelândia, após um rápido aumento da produção e consumo deste fruto em 1967, o que levou à necessidade da existência de um nome comercialmente apelativo que não fosse confundido com o tomate - *Solanum lycopersicum* (Morton, 1987). É uma planta que pertence à família Solanaceae, uma das famílias economicamente mais importantes e que inclui o tomateiro, a batateira, os pimenteiros, a beringela e o tabaco, entre muitas outras espécies (Heiser e Anderson, 1999).

Em termos botânicos, o tamarilho é um pequeno arbusto subtropical, semi-lenhoso e de rápido crescimento que pode atingir cerca de 5 m de altura (Fig.1A) (Canhoto *et al.*, 2005). As flores (Fig.1B) têm uma cor rosa-esbranquiçada e surgem agrupadas, resultando de meristemas axilares que envolvem para meristemas inflorescenciais. Geralmente a floração ocorre na transição do Verão para o Outono, mas podem surgir noutras alturas do ano (Correia *et al.*, 2009).

A polinização pode ser cruzada, sendo mediada por vetores bióticos, como insetos (Morton, 1987) e por vetores abióticos, como o vento (Schotsmans *et al.*, 2011) ou autogâmica. A baixa variabilidade encontrada em populações naturais deve-se à polinização ser principalmente deste último tipo (Barghchi, 1986).

Os frutos são caracterizados pela sua forma oval pontiaguda em ambas as extremidades, surgindo isolados ou em conjuntos de 3-12 unidades (Fig.1C), entre outubro a abril (Correia e Canhoto, 2012) cuja tonalidade pode ser vermelha, laranja ou amarela (Fig.1D), dependendo da variedade. No entanto, os frutos vermelhos são os mais apreciados pelo seu sabor e aroma mais intensos (Hooker, 1899; Atkinson and Gardner, 1993). A polpa (Fig. 1E) tem uma coloração que varia entre o vermelho alaranjado e o amarelado (Correia e Canhoto, 2012), é consistente e succulenta, um pouco ácida (pH varia entre 3,7 e 3,8) e apresenta um sabor agradável (Guimarães *et al.*, 1996).

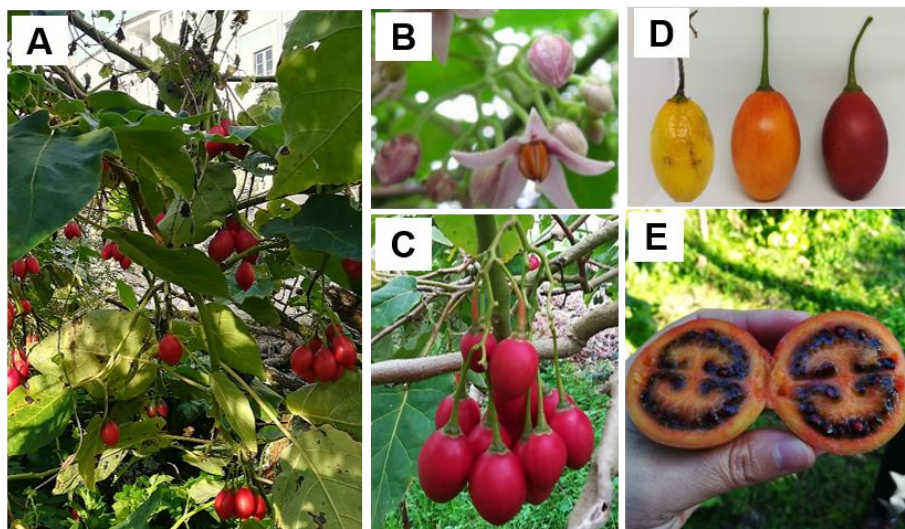


Figura 1 - *Solanum betaceum*. (A) Exemplar de tamarilho vermelho existente no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. (B) Flores em diferentes estádios de desenvolvimento. (C) Conjunto de frutos. (D) Frutos com diferentes tonalidades, amarelo, laranja e vermelho. (E) Polpa dos frutos, onde é visível o elevado número de sementes

Trata-se de uma espécie de fácil cultivo que apresenta um ciclo de reprodução curto e tem um tempo médio de vida de 8 anos. Normalmente, a primeira frutificação ocorre 2 anos após o cultivo e o clímax de produção é atingido em 5 anos. Após 6 anos de cultivo começa a verificar-se um declínio da produção devendo as árvores ser substituídas (Meadows, 2002).

Tendo em conta a ecologia e fitogeografia de *S. betaceum*, esta espécie apresenta fatores limitantes para o seu desenvolvimento, sendo caracterizadas como regiões ideais aquelas com temperaturas entre 18 e 22 °C, precipitações anuais de 600 a 800 milímetros e altitudes entre 1.500 e 3.000 m (Bohs, 1989). Assim, as principais limitações ao cultivo desta espécie são impostas essencialmente pela temperatura (temperaturas elevadas e seca prolongada), ventos fortes, solos inundados e geada (Guimarães *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Prohens *et al.*, 2004; Azurduy, 2009).

A origem precisa da espécie não é clara (Popenoe *et al.*, 1989), mas é amplamente encontrada na região dos Andes que inclui o Perú, Chile, Equador e Bolívia, (Atkinson e Gardner, 1993; Correia *et al.*, 2011) o que parece indicar que o seu centro de origem está localizado nessa área (Bohs, 1989). Daí dispersou-se para a América central, incluindo as Antilhas, e mais tarde, para as ilhas Portuguesas dos Açores e Madeira e para o sul da Europa (Canhoto *et al.*, 2005) conquistando com os seus frutos o paladar das diferentes culturas.

Atualmente, o tamarilho é maioritariamente cultivado no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador, E.U.A. (Califórnia), Portugal, Quênia, Índia, Indonésia e Austrália (Mertz *et al.*, 2009). Em Portugal, é utilizado sobretudo como planta ornamental, apesar de já terem sido feitas algumas tentativas de exploração comercial dado os elevados preços (10 – 15 €/Kg) que os frutos atingem no mercado (Guimarães *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2000).

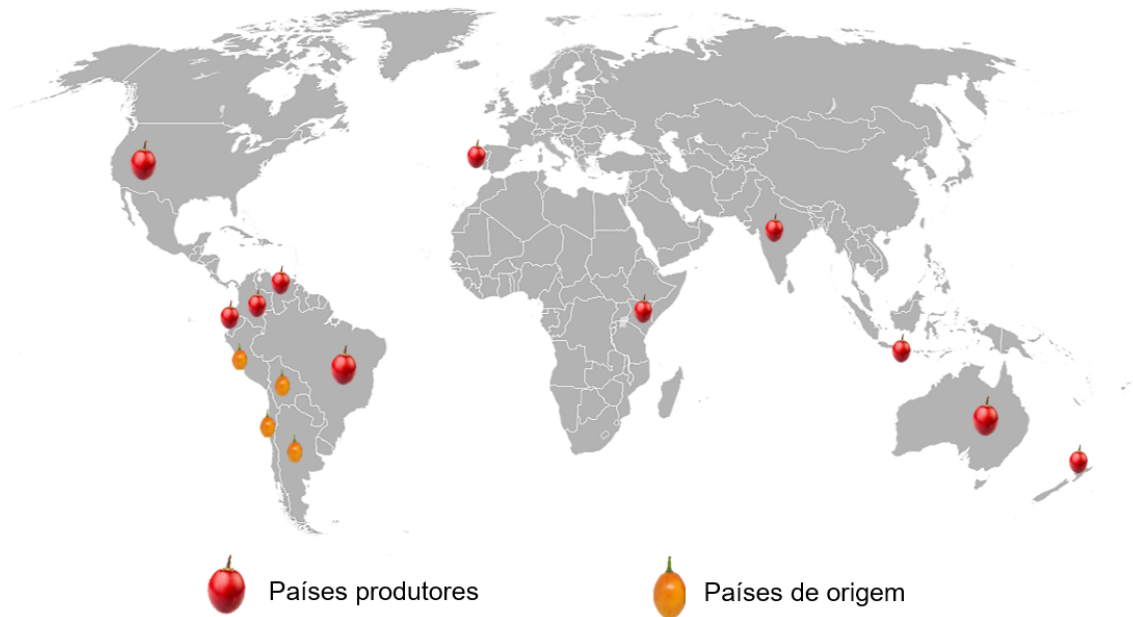


Figura 2 - Distribuição geográfica de *S. betaceum*. Encontram-se destacados os países de origem e os países produtores.

O valor nutricional dos seus frutos reflete-se no potencial económico desta espécie (Canhoto *et al.*, 2005) existindo um amplo espectro de potenciais aplicações (Guimarães *et al.*, 1996). Os frutos apresentam um reduzido valor calórico (cerca de 28 cal/100 g) e em hidratos de carbono (7,7 g / 100 g) e 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 o que faz com que seja reconhecida como uma espécie frutífera (McCane e Widdowson, 1992).

Foram também realizados vários estudos com o intuito de avaliar o conteúdo em antocianinas e carotenóides presentes nos frutos do tamarilho (Hurtado *et al.*, 2009; Kou *et al.*, 2009). Os resultados mostraram a possibilidade de alguns destes componentes poderem ter propriedades antioxidantes, terapêuticas e preventivas importantes, tornando os frutos uma fonte de alimento que merece uma melhor exploração (Hurtado *et al.*, 2009; Kou *et al.*, 2009).

Desta forma, torna-se importante aumentar, tanto em termos quantitativos como qualitativos, a produção desta espécie fruteira. Por reunir condições para ser uma espécie competitiva em algumas zonas de Portugal, o tamarilho pode vir a tornar-se uma espécie bastante interessante para os agricultores portugueses (Correia e Canhoto, 2012).

1.3. Propagação e cultura *in vitro*

A propagação do tamarilho pode ser conseguida a partir de sementes ou estacas (Prohens e Nuez, 2000). As sementes germinam com facilidade, no entanto a propagação seminal dá origem a árvores geneticamente diferentes que não asseguram uma produção consistente de frutos. Os métodos de propagação vegetativa permitem obter plantas uniformes (Correia e Canhoto, 2012), sendo para isto necessários métodos eficazes de reprodução assexuada.

O tamarilho surge também como um importante sistema de referência para a otimização de protocolos de cultura *in vitro* e para estudos de biologia do desenvolvimento de espécies lenhosas (Correia *et al.*, 2019), tratando-se de uma espécie que responde facilmente ao cultivo *in vitro* (Correia e Canhoto, 2012) através de técnicas de propagação clonal. Estas técnicas de micropropagação são ferramentas biotecnológicas valiosas que têm sido aplicadas ao melhoramento do tamarilho, e que incluem a proliferação de meristemas axilares (Cohen e Elliot, 1979; Barghchi, 1998; Obando *et al.*, 1992), a indução de organogénese (Guimarães *et al.*, 1996; Obando e Jordan, 2001) e a embriogénese somática (Guimarães *et al.*, 1988, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011, 2012; Correia e Canhoto, 2018).

A micropropagação pela proliferação de meristemas axilares (Barghchi 1986; Cohen e Elliot 1979) é uma técnica rápida e de alta reprodutibilidade, que permite assegurar a propagação de plantas em larga escala e a uniformidade genética das plântulas obtidas. Esta técnica permite o desenvolvimento da parte aérea da planta onde a proliferação dos meristemas axilares pode ocorrer em meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento. No entanto, na presença de uma citocinina, como a 6-benzilaminopurina (BAP) no meio de cultura, obtêm-se melhores resultados. Todavia, a utilização desta citocinina no meio origina, com frequência, a formação de um tecido caloso indiferenciado na base da planta que impede o desenvolvimento do sistema radicular, e desta forma, é necessário transferir posteriormente as plantas para um novo meio de cultura sem BAP de forma a promover o enraizamento (Correia *et al.*, 2011).

A organogénese é um método de formação de novos órgãos, sob condições químicas e físicas específicas (Thorpe, 1980), que funcionam como estímulo para o surgimento de novos meristemas caulinares (Moura *et al.*, 2001). Desta forma, a formação de plantas por organogénese pode ser alcançada através de dois processos distintos. No processo direto, ocorre o desenvolvimento de meristemas adventícios, que se desenvolvem em meristemas axilares e acabam por formar uma planta, após o enraizamento e o processo indireto difere particularmente do primeiro, especificamente

na formação de calos, a partir dos quais se formam as gemas, seguidas do enraizamento (Tonon *et al.*, 2001; Canhoto, 2010; Alam *et al.*, 2017).

A embriogénese somática (ES) é um processo pelo qual as células somáticas, sob determinados estímulos, passam por uma desdiferenciação e uma diferenciação, formando células embriogénicas (Rose *et al.*, 2010; Yang e Zhang, 2010) que sofrem uma série de alterações morfológicas e bioquímicas resultando na formação de embriões e, por fim de plantas (Solis Ramos *et al.*, 2012).

A indução de ES é alcançada num meio de cultura suplementado com auxinas como o picloram (ácido 4-Amino-3,5,6-tricloro-2-piridinocarboxílico) ou ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) que têm um efeito indutor no processo (Canhoto *et al.*, 2005; Correia, 2011). Quando uma dessas auxinas é usada para induzir a embriogénese a partir de folhas jovens ou embriões zigóticos maduros, ocorre um processo em “two step” no qual as células somáticas produzem um tecido embriogénico (ou calo embriogénico) que prolifera através de subculturas sucessivas em meios com essa mesma hormona (Alves *et al.*, 2017), até formar embriões e subsequentemente plantas, quando transferido para um meio desprovido de auxinas (Canhoto *et al.*, 2005; Correia e Canhoto, 2018; Fehér, 2019).

A capacidade de as células vegetais diferenciadas passarem por um processo embriogénico é um processo de desenvolvimento único e uma demonstração da totipotência das células vegetais (Zimmerman, 1993; Yang e Zhang, 2010). Além disso, a ES serve como modelo para entender os mecanismos citológicos, fisiológicos e genéticos subjacentes à formação do embrião, bem como o seu desenvolvimento e maturação (Rose *et al.*, 2010; Yang e Zhang, 2010; Correia, 2011).

A embriogénese somática é de particular interesse devido ao seu potencial para a melhoria de espécies de árvores e para a rápida propagação clonal em grande escala, transformação genética e criopreservação de linhas selecionadas desejáveis (Park, 2002; Von Arnold, 2008).

1.4. Protoplastos

As células vegetais possuem uma parede celular que é responsável pela sua forma, proteção contra choques osmóticos e manutenção da rigidez. A remoção da parede celular a uma célula vegetal, desde que realizada em condições que evitem o seu rebentamento, conduz à obtenção de células esféricas, designadas por protoplastos (Canhoto, 2010).

A parede das células vegetais é uma estrutura química complexa que varia em composição em função dos diferentes tipos celulares que existem nos tecidos das plantas (Cosgrove, 2015). É constituída pela lamela média, parede primária e, em alguns tipos celulares, parede secundária (Chawla, 2010) e consiste numa complexa mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Os polissacarídeos representam cerca de 90 % do peso seco da parede e consistem em celulose, que constitui 20 - 40 % da parede celular, hemiceluloses (15 - 25 %) e pectinas (cerca de 30 %). Essa matriz é ordenada e dinâmica e pode tornar-se mais rígida ou mais flexível conforme as necessidades da planta (Buckeridge, 2010). A parede celular secundária possui ainda grandes quantidades de lenhina, um polímero aromático que confere rigidez à célula e à planta (Farinas, 2011). Os componentes da parede celular podem ser digeridos por diferentes tipos de enzimas, sendo as pectinases responsáveis pela digestão da lamela média e da matriz da parede primária, possuindo atividade poligalacturonásica enquanto as celulases catalisam a reação de degradação da celulose e das hemiceluloses, estas últimas também presentes na matriz (Chawla, 2010).

As enzimas mais frequentemente usadas no isolamento de protoplastos 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*) apresenta simultaneamente atividade celulásica e pectinásica e é usada no isolamento de protoplastos a partir de células em cultura (Chawla, 2010).

Os protoplastos são células vegetais nuas, ou seja, desprovidas de parede celular, onde a superfície celular (membrana plasmática) está totalmente exposta e acessível e, portanto, fornece o ponto de partida a várias técnicas de manipulação genética ou de hibridação somática (Giri e Giri, 2007; Rezazadeh e Niedz, 2015) de células vegetais para o melhoramento das culturas (Ling *et al.*, 2010; Ayeleso, 2015). Desta forma, do ponto de vista da aplicação prática, a remoção da parede celular apresenta vantagens uma vez que a inserção de moléculas, como por exemplo ácidos nucleicos, pode ser facilitada em células às quais a parede foi removida, permitindo a sua transformação genética. Para além disso, as células desprovidas de parede podem ser estimuladas a fundir abrindo a possibilidade de fusões entre células de espécies filogeneticamente distantes contornando as barreiras naturais de incompatibilidade sexual e possibilitando a obtenção de novas combinações genéticas, os chamados híbridos somáticos (Davey *et al.*, 2005; Canhoto, 2010).

A primeira vez que se isolaram protoplastos a partir de tecidos vegetais foi ainda no século XIX, por Klercker, em 1892, em *Allium cepa* e em *Stratiotes aloides* utilizando métodos mecânicos. Só no início da década de 60, Cocking (1960) obteve protoplastos a partir de raízes de tomateiro com base em métodos enzimáticos, usando enzimas hidrolíticas as quais degradam os componentes da parede celular. Desde então, o isolamento de protoplastos tem sido registrado em diversas culturas seguindo uma diversidade de métodos (revisto por Ling *et al.*, 2010).

O isolamento de protoplastos é aplicado regularmente numa ampla variedade de espécies (Pais, 2003) e uma vez que protoplastos viáveis são potencialmente totipotentes (Cunha, 2001) a cultura de protoplastos com regeneração de plantas é também uma tecnologia relevante para um vasto conjunto de plantas (Maćkowska *et al.*, 2014). Portanto, quando são fornecidos os estímulos químicos e físicos corretos, cada protoplasto é capaz, teoricamente, de regenerar uma nova parede e sofrer divisão mitótica repetida para produzir células filhas das quais podem ser regeneradas plantas férteis através do processo de cultura de tecidos. Os procedimentos básicos para o seu isolamento sofreram poucas mudanças desde as primeiras referências, no entanto, houve um progresso notável no número de espécies para as quais existem sistemas de obtenção de protoplastos. Além disso, as últimas décadas do século XX testemunharam grandes desenvolvimentos na manipulação genética de plantas através da fusão e transformação de protoplastos (Davey *et al.*, 2005; Tripathi, 2010).

Existem vários parâmetros que influenciam a capacidade de os protoplastos expressarem a sua totipotência e se desenvolverem em plantas férteis, particularmente o tecido de origem, o meio de cultura e os fatores ambientais. Apesar de pelo menos quatro décadas de esforços conjuntos e transferência de tecnologia entre laboratórios em todo o mundo, muitas espécies ainda permanecem recalcitrantes na cultura. (Davey *et al.*, 2005).

A tecnologia de utilização de protoplastos inclui o isolamento, purificação, cultura (Fig. 3) e, por vezes, a fusão de protoplastos vegetais, resultando na produção de plantas completas (Pati *et al.*, 2008). O isolamento dos protoplastos pode ser feito a partir de diferentes órgãos da planta, no entanto os explantes foliares são uma das fontes mais eficientes (Yoo *et al.*, 2007; Mukhtar *et al.*, 2012) devido à facilidade de acesso das enzimas à parede celular das células do mesófilo pela sua organização celular (Chawla, 2010) e para além disso garantem um maior rendimento de protoplastos viáveis e relativamente uniformes (Liu, 2005).

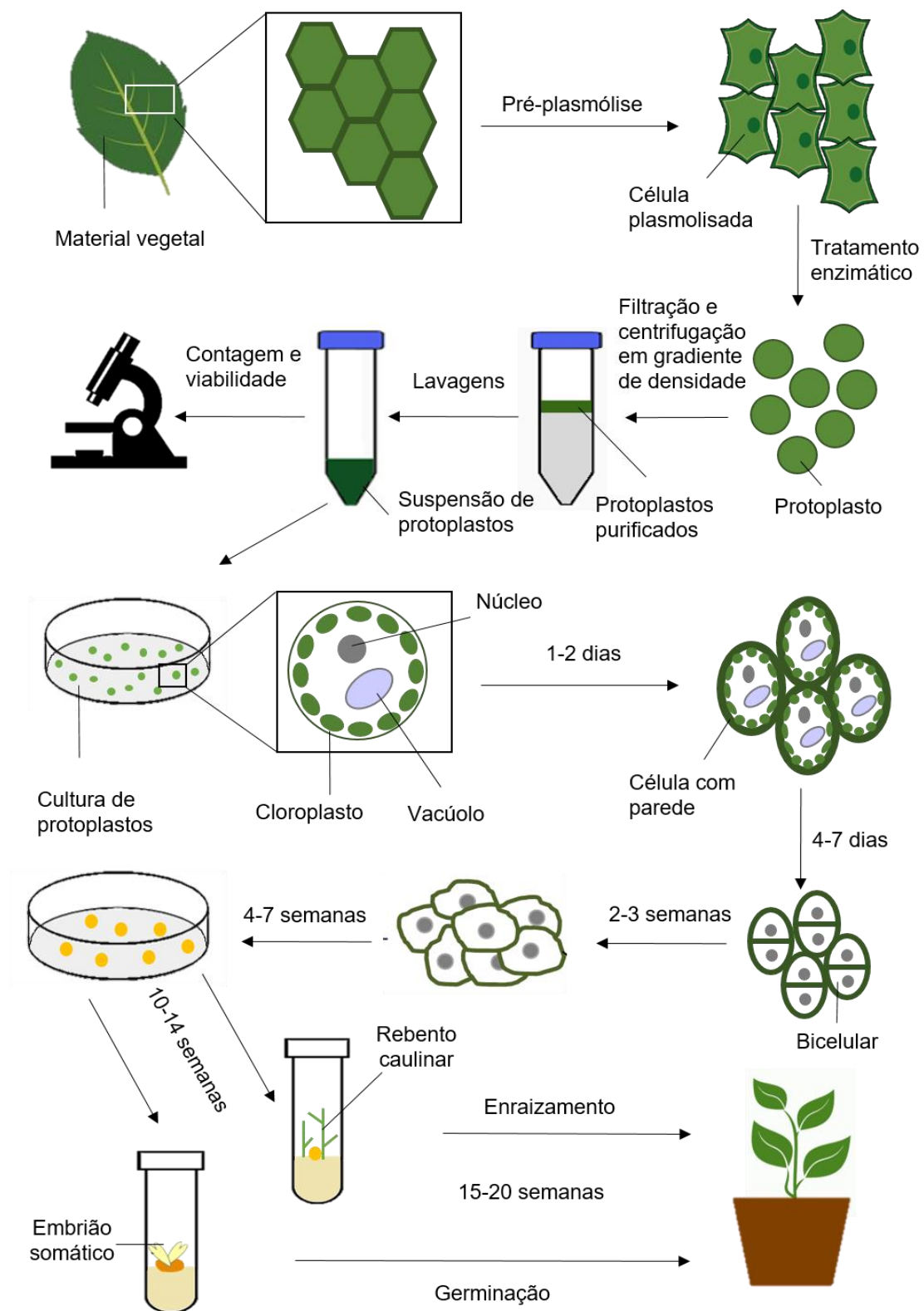


Figura 3 - Esquema representativo do isolamento e purificação de protoplastos, com subsequente regeneração de plantas.

Antes de serem submetidos à ação das enzimas hidrolíticas, os tecidos dadores passam por um tratamento inicial denominado pré-plasmólise onde são submetidos a um potencial osmótico baixo que leva à plasmólise das células (Canhoto, 2010) e à separação da membrana plasmática da parede celular (Ferrando e Spiess, 2001; Estavillo *et al.*, 2014). Desta forma, a pré-plasmólise vai reduzir o impacto do choque osmótico aplicado durante o isolamento e impedir a entrada de substâncias exógenas prejudiciais para as células. Esta etapa pode ser conseguida através da adição de estabilizadores osmóticos como os compostos iônicos de que são exemplo o CaCl_2 e o KCl ou os hidratos de carbono tais como o manitol e o sorbitol, (George, 2008) sendo estes dois últimos os mais usados no isolamento de protoplastos do mesófilo foliar (Navratilova, 2004).

Após a pré-plasmólise os explantes são sujeitos a combinações enzimáticas eficientes e de alto rendimento, tais como celulasas e pectinases (Tomé, 1991; Bhojwani e Razdan, 1996) com concentrações e período de incubação variáveis (celulase 0,2 – 2 %; pectinase 0,1 – 1 %). A temperatura a que os tecidos são colocados em contacto com a solução enzimática é também um fator importante (Canhoto, 2010) sendo que a temperatura adequada para o isolamento dos protoplastos ronda os 25 a 30 °C (Chawla, 2010).

A solução de isolamento de protoplastos, para além das enzimas e de um estabilizador osmótico, deve ainda conter um tampão (e.g., 2-N-morfino-etano sulfonato [MES]) de forma a minimizar as variações de pH e cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) para a estabilização do plasmalema (Liu, 2005).

Na sequência do tratamento enzimático obtém-se uma mistura de protoplastos com tecido não digerido, células rebentadas, cloroplastos e outros organitos citoplasmáticos (Canhoto, 2010). Assim, torna-se necessário purificar os protoplastos com o objetivo de os separar dos restantes constituintes. Este processo envolve a combinação de três etapas: filtração, centrifugação e lavagem (Giri e Giri, 2007).

Numa fase inicial, a mistura resultante da digestão dos tecidos pela solução enzimática é passada através de um filtro (40 - 100 μm) metálico ou de *nylon* de forma a reter as células não digeridas e os agregados celulares de maiores dimensões (Grønlund *et al.*, 2012; Canhoto, 2010). A purificação da solução filtrada pode ser alcançada a partir de diferentes vias: i) pela exploração da densidade diferencial de flutuação dos protoplastos em gradientes de açúcar como a sacarose e/ou o manitol (Tomé, 1991; Estavillo *et al.*, 2014); ii) repetida ressuspensão/centrifugação dos

protoplastos em meio de lavagem de modo a que os protoplastos constituam o *pellet* e no sobrenadante fiquem os fragmentos celulares em suspensão e iii) passagem dos tecidos digeridos após incubação, através de uma malha de poro adequado a deixar passar apenas os protoplastos (Grønlund *et al.*, 2012).

Depois de os protoplastos purificados serem recolhidos, devem ocorrer uma série de centrifugações de forma a garantir a sedimentação dos protoplastos (*pellet*) e a remoção completa da solução enzimática uma vez que se o objetivo é a cultura de protoplastos, é possível que as enzimas inibam a regeneração da parede celular e a consequente divisão celular (George, 2008).

Após a purificação dos protoplastos, devem ser analisados dois parâmetros: o rendimento do processo, isto é a quantidade de protoplastos obtida a partir do material inicial e a viabilidade (Tomé, 1991).

A contagem (avaliação do rendimento) pode ser facilmente realizada utilizando um hemocítmetro, extrapolando-se os valores obtidos para o volume total de meio onde se encontram os protoplastos. Este passo visa verificar se a quantidade de protoplastos é adequada para a fase de cultura uma vez que esta implica que os protoplastos sejam cultivados a determinadas densidades (Tomé, 1991; Mota-Narváez *et al.*, 2018). Se a quantidade de protoplastos obtida for reduzida é necessário otimizar os processos de digestão e purificação de protoplastos de forma a aumentar os rendimentos. Se, pelo contrário, a quantidade de protoplastos obtida for muito elevada deve-se diminuir a sua densidade pela adição de meio de cultura (Canhoto, 2010; Costa *et al.*, 2002).

Antes de se proceder à cultura deve ser determinada a viabilidade dos protoplastos obtidos. Um indicador fiável da viabilidade dos protoplastos está relacionado com a forma como os cloroplastos estão distribuídos na célula. Em protoplastos viáveis, os cloroplastos distribuem-se uniformemente na célula enquanto em células mortas estes têm tendência a depositar por ação da gravidade (Taiz *et al.*, 2015). No entanto, podem ser efetuadas avaliações mais precisas e objetivas 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).

Para além destes indicadores existem outros métodos que se baseiam na capacidade que os protoplastos possuem de pouco tempo depois de removida a parede celular começarem a edificar uma nova parede de que é exemplo o método da coloração com calcofluor white (Canhoto, 2010).

O “calcofluor white” é um composto que se liga às moléculas de celulose que constituem a parede celular e vai permitir visualizar a síntese de uma nova parede (Canhoto, 2010). Esse composto é misturado com a suspensão de protoplastos e é feita a observação num microscópio de fluorescência com filtro de excitação UV que permite detetar os protoplastos viáveis pela formação de um anel de fluorescência branco azulada que envolve as células (Hervé *et al.*, 2011). Em células não viáveis em que a síntese de parede não ocorre, não se verifica emissão de fluorescência (Canhoto, 2010).

Os meios utilizados para a cultura de protoplastos geralmente são semelhantes aos usados em sistemas de cultura *in vitro* como os meios MS (Murashige e Skoog, 1962) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), embora com alguma frequência, sejam mais ricos em vitaminas e aminoácidos aos quais se deve adicionar um estabilizador osmótico de forma a prevenir o seu rebentamento (Giri e Giri, 2007; Kärkönen *et al.*, 2011).

Os reguladores de crescimento tais como auxinas e citocininas também fazem parte da composição dos meios de cultura de protoplastos, uma vez que são essenciais para o fornecimento de estímulos para a divisão celular e na obtenção de calos a partir dos quais ocorre a regeneração de plantas (Dovzhenko *et al.*, 2003; Canhoto, 2010).

O meio de cultura deve ser otimizado para cada situação. A densidade dos protoplastos é um fator que pode condicionar o sucesso da cultura (Canhoto, 2010). De acordo com o seu potencial de divisão, a densidade de cultura ótima situa-se entre 5×10^3 e 10^6 protoplastos/ml (Chawla, 2010).

O cultivo dos protoplastos isolados pode ocorrer em meio de cultura líquido, ou embebidos em meio semi-sólido ou sólido contendo agar, agarose ou alginato (Tomar e Dantu, 2009; Ayala *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2015).

Vários têm sido os estudos de isolamento de protoplastos em diversas espécies como *Nicotiana tabacum* (Nagata e Takebe, 1971), *Arabidopsis thaliana* (Fig.4A) (Chupeau *et al.*, 2013), *Arbutus unedo* (Choury *et al.*, 2017), *Rubus glaucus* (Arturo *et al.*, 2016). A planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*; Fig. 4B), em particular é uma solanácea com diversos protocolos de regeneração através de protoplastos a partir dos quais têm sido desenvolvidas técnicas de otimização do processo (Lei *et al.*, 2015).

Em tamarilho o isolamento de protoplastos (Fig. 4C) já foi conseguido em trabalhos anteriores (Augusto, 2015), a partir dos quais foi possível definir um protocolo otimizado para o isolamento e purificação de protoplastos derivados de diferentes explantes. No entanto a divisão dos protoplastos em cultura é ainda um fator limitante, tendo sido feitos alguns avanços, apesar da dificuldade encontrada para a colocação em cultura dos protoplastos derivados de explantes foliares e das limitações temporais resultantes da otimização dos protocolos de isolamento e purificação, não tendo havido portanto sucesso na etapa de divisão celular dos protoplastos isolados.

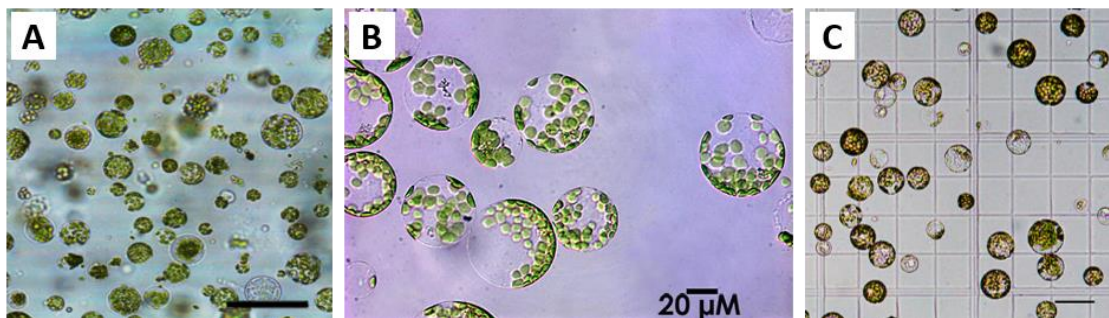


Figura 4 - Protoplastos isolados a partir do mesófilo foliar de *Arabidopsis thaliana* (A) (<https://www.autom8.com/port-patch-planar-patch-clamping/port-patch-applications/>, acessado a 20/07/2019); de *Nicotiana tabacum* (B) (Chupeau *et al.*, 2013) e de *S. betaceum* (C) (Augusto, 2015).

1.5. Objetivos

Nos últimos anos as aplicações económicas e biotecnológicas do tamarilho têm vindo a demonstrar avanços significativos. Esta solanácea tem um enorme potencial pelo valor nutricional dos seus frutos o que torna uma árvore com potencial para ser usada como fruteira. Além disso, o seu potencial biotecnológico tem sido demonstrado através de diversos estudos como sistema modelo alternativo para o estudo de aspetos chave do processo de indução de embriogénese somática.

A tecnologia de protoplastos tem importantes aplicabilidades, quer em processos de melhoramento, quer de análise molecular da espécie que irão contribuir como novas ferramentas para a cultura do tamarilho e reforçar o seu papel como sistema modelo numa perspetiva de investigação em ciência fundamental.

Tendo em conta estes pressupostos, este trabalho teve como objetivo principal o estabelecimento de um protocolo para regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de tamarilho. Para a concretização desta etapa o trabalho foi dividido em objetivos mais específicos que incluem: i) o isolamento e purificação de protoplastos viáveis; ii) promover a regeneração da parede celular; iii) estimular a divisão celular.

Para a concretização destes objetivos procedeu-se a diversos ensaios com diferentes condições e composições dos meios de cultura dos protoplastos isolados a partir de explantes foliares e suspensões celulares de *calli* embriogénico. Os ensaios foram realizados em simultâneo no tamarilho e no tabaco, tendo sido este considerado como controlo.

2. Material e Métodos



2.1. Material Vegetal

Neste trabalho experimental foi utilizado material vegetal previamente estabelecido em cultura *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, nomeadamente 5 linhas de tamarilho vermelho (C6, C8, C9, C11, C12) obtidas pela proliferação de meristemas axilares após o estabelecimento *in vitro* por via seminal. Foram também utilizados, como sistema controlo, rebentos caulinares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) estabelecidos *in vitro* por via seminal e propagados por multiplicação de segmentos nodais.

Usaram-se também *calli* embriogénicos (linhas CE1 e CE2) previamente obtidos em meio de indução de embriogénese somática a partir de explantes foliares de tamarilho vermelho.

2.2. Métodos

2.2.1. Cultura e pré-condicionamento do material vegetal

a) Explantes foliares

Os rebentos caulinares de tamarilho e tabaco (Fig. 5A e B) foram previamente estabelecidos *in vitro* e micropropagados a partir da proliferação de meristemas axilares.

A obtenção de plantas por via seminal iniciou-se pela desinfeção das sementes com uma solução de hipoclorito de cálcio a 5 % (p/v), seguida de pelo menos 3 lavagens em água esterilizada, e colocadas em caixas de Petri estéreis com algodão e papel de filtro humedecido com água desmineralizada esterilizada. Depois da germinação, as sementes foram transferidas para caixas com meio MS, suplementado com 3 % de sacarose isento de reguladores do crescimento.

Após o estabelecimento, procedeu-se à fase de multiplicação, na qual os segmentos nodais foram inoculados em meio base MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose a 3 % (p/v) e 6 - benzilaminopurina (BAP) a 0,2 mg/l, sendo o pH ajustado a 5,7 antes da autoclavagem. O meio de cultura foi solidificado com agar a 0,6 % (p/v) e autoclavado a 121 °C, durante 20 minutos.

As culturas foram colocadas numa câmara de crescimento a 24±1 °C de temperatura e um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, sendo a intensidade luminosa 15-20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Posteriormente este material foi transferido para meio de cultura MS sem hormonas, de modo a permitir uma maior expansão foliar e a contínua disponibilidade destes explantes para a realização dos ensaios de isolamento de protoplastos. Foram colocadas seis a sete plântulas em cada caixa de cultura (Microbox Combiness, 97 x 120 mm, com filtro XXL) com 100 ml do referido meio de cultura MS.

Após 4 a 6 semanas nestas condições, as plantas foram transferidas para condições de obscuridade onde permaneceram durante dois dias, a 25 °C, antes dos ensaios de isolamento de protoplastos.

b) *Calli* embriogénicos

A manutenção e proliferação *in vitro* das linhas de calo embriogénico (Fig. 5C e D) previamente estabelecidas foram feitas através de subculturas mensais sucessivas em meio de cultura sólido TP com a seguinte composição: meio base MS suplementado com 5 mg/l de picloram, 9% (p/v) de sacarose e 2,5 g/l de Phytigel (Sigma).

Previamente a cada ensaio de isolamento de protoplastos, cerca de 150 mg das massas de *callus* em proliferação foram colocadas para dispersão em 50 ml de meio TP líquido em balões Erlenmeyer de 250 ml, numa incubadora com agitação orbital (120 rpm), a 25 °C e no escuro durante 5 dias.

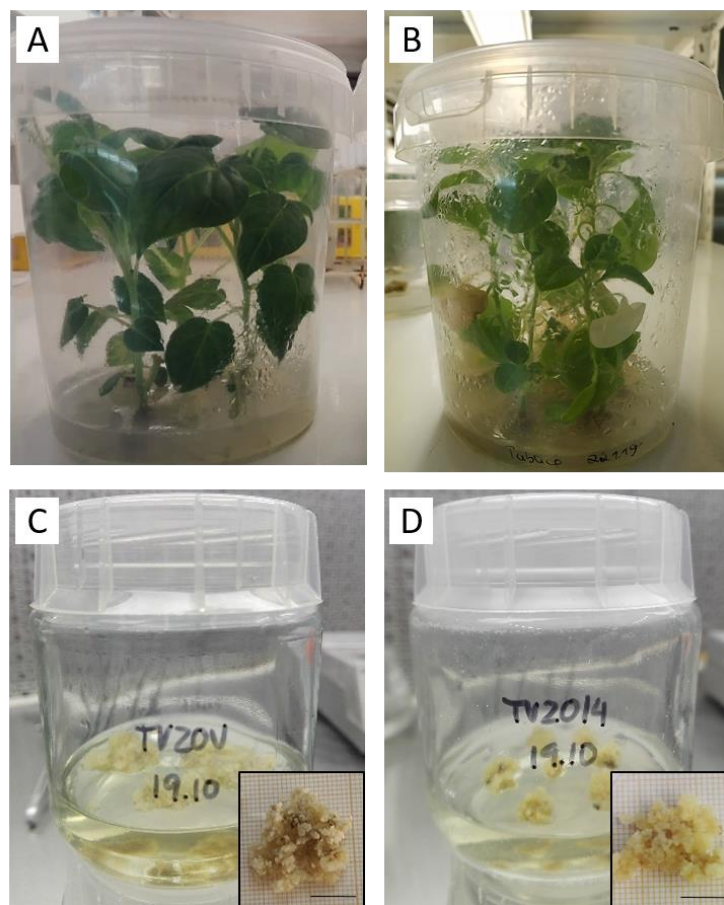


Figura 5 – Material utilizado para o isolamento de protoplastos. (A) Plântulas de tamarilho; (B); plântulas de tabaco; linha CE1 (C) e linha CE2 (D). Bar= 1 cm

2.2.2. Isolamento e purificação de protoplastos a partir de explantes foliares

Este procedimento teve como base o protocolo de isolamento e cultura de protoplastos de tamarilho (*S. betaceum*) desenvolvido por Augusto (2015).

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 membrana de malha de acetato de celulose com 0,20 μm (Ministart NML, Sartorius, Alemanha).

Inicialmente pesou-se 1 g de peso fresco de folhas de plântulas de tamarilho e de tabaco que foram colocadas numa caixa de Petri com 15 ml de uma solução pré-plasmólise com o pH ajustado a 5,8. Como solução de pré-plasmólise testaram-se duas alternativas: uma solução K3 – sacarose a 0,4 M (Tabela 2) e uma solução 0,45 M de manitol. As folhas expandidas (com aproximadamente 4 cm de comprimento) foram cortadas em segmentos com cerca de 20-60 mm² e as nervuras principais removidas. Foram testados dois tempos de incubação na solução de pré-plasmólise, 10 e 20 min a 27 °C com agitação. Após a incubação a solução de pré-plasmólise foi substituída por uma solução enzimática onde foram testadas duas composições diferentes. A primeira era constituída por celulase “Onozuka” R-10 (Yakult Pharmaceuticals, Japão) a 0,2 % e macerozima R-10 (Yakult Pharmaceuticals, Japão) a 0,5 % dissolvidas em solução K3 – sacarose a 0,4 M e a segunda era composta pelas mesmas enzimas acima mencionadas, mas dissolvidas numa solução tampão constituída por 0,45 M manitol, 20 mM MES – KOH, 20 mM KCl, 0,1% (p/v) BSA e 10 mM CaCl₂ e o pH ajustado a 5,7. A incubação enzimática ocorreu durante 16h (*overnight*) a 27 °C com agitação. Um esquema geral do procedimento adotado está representado na figura 6.

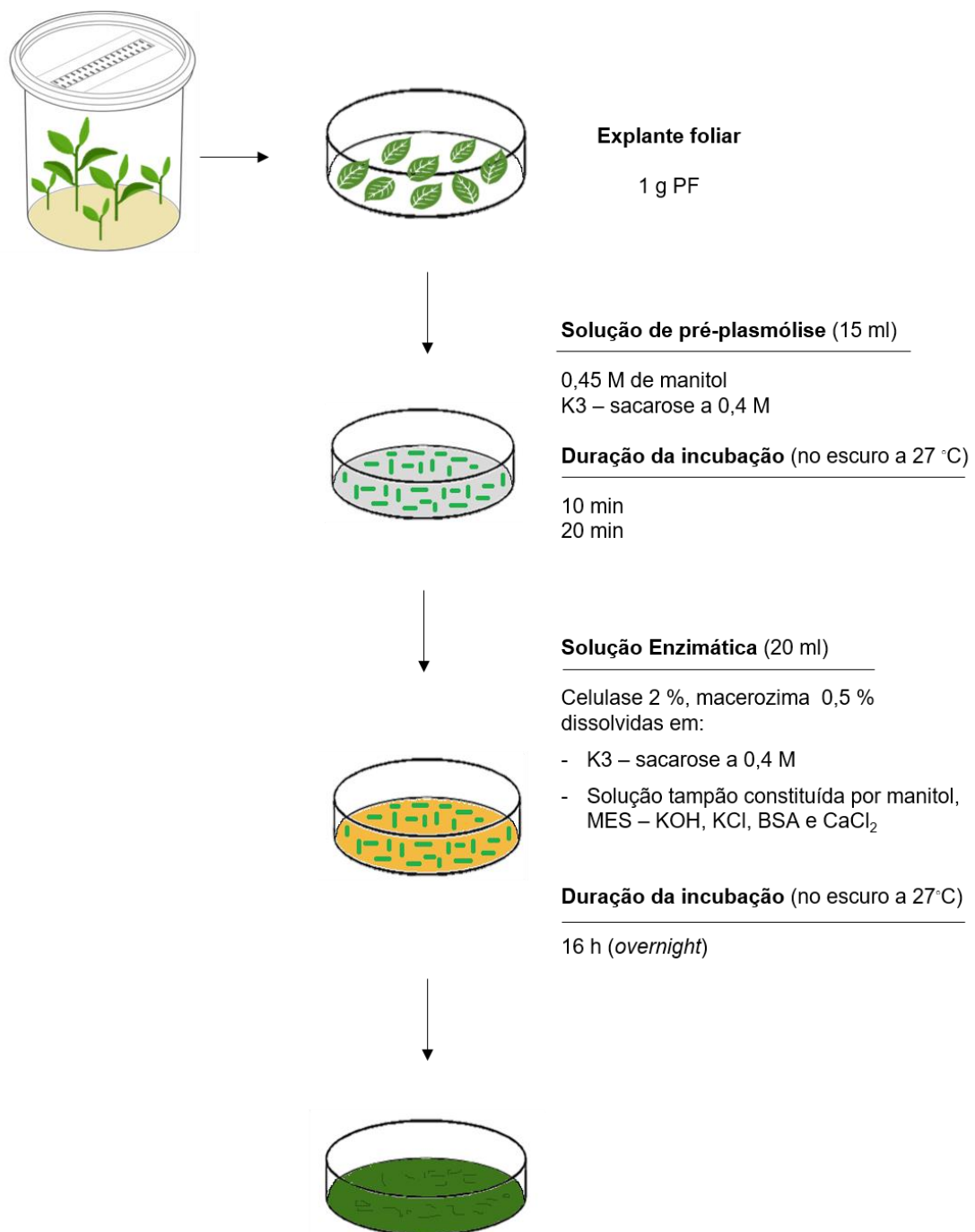


Figura 6 - Representação esquemática do isolamento de protoplastos a partir de explantes foliares.

Às soluções resultantes da incubação enzimática dos explantes foliares foram aplicados dois métodos de purificação (Fig. 7), de modo a separar os protoplastos dos restantes tecidos degradados ou não digeridos. Na primeira situação, a solução foi filtrada através de um crivo de malha metálica de 70 μm . Ao filtrado adicionou-se, cuidadosamente, 2 ml de solução W5 (9,0 g/l de NaCl, 18,4 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 durante 10 min onde os protoplastos purificados sedimentaram numa banda interfásica que se formou entre as 2 camadas líquidas, sendo recolhidos 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 100 g, durante 5 minutos da qual se obteve um *pellet* que foi ressuspendido em 5 ml de W5, repetindo-se a última centrifugação.

No segundo método, o material vegetal digerido foi filtrado através de um filtro de malha de nylon de 70 μm . Numa primeira abordagem o filtrado foi centrifugado a cerca de 100 g durante 5 min, tendo-se obtido um *pellet* que foi ressuspendido em 2 ml de uma solução de manitol a 0,45 M. Num novo tubo de centrífuga, colocaram-se 7 ml de uma solução 0,5 M de sacarose e 1 mM de MES e acima desta solução foram adicionados 2 mL constituídos pelo *pellet* obtido na primeira centrifugação com a solução 0,45 M de manitol. Na sequência da centrifugação em gradiente de densidade a 145 g durante 10 min, os protoplastos formaram uma banda na zona de transição entre a solução de sacarose e o meio de suspensão dos protoplastos. Na fase seguinte, os protoplastos foram transferidos para um novo tubo e ressuspendidos numa solução de lavagem constituída por uma solução 0,4 M manitol, 20 mM MES – KOH, 20 mM KCl, 0,1% (p/v) BSA e 10 Mm CaCl_2 seguido-se uma centrifugação a 100 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* ressuspendido em 2 ml da solução de lavagem repetindo-se a última centrifugação nas mesmas condições.

Depois da última centrifugação, estimou-se o volume de suspensão de protoplastos e recorrendo a um hemocítmetro procedeu-se à contagem dos protoplastos bem como à determinação da sua viabilidade através da utilização do corante Evans blue.

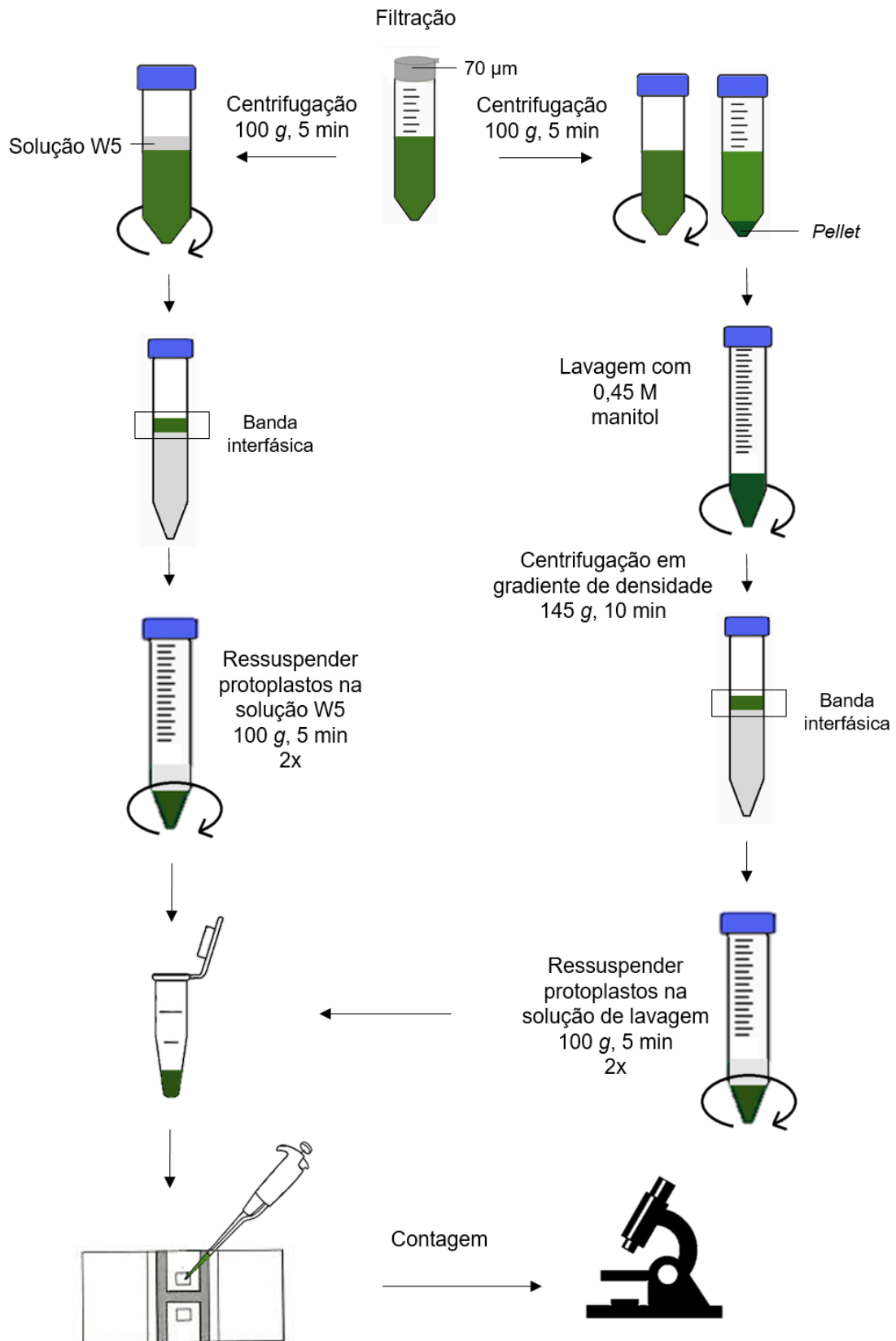


Figura 7 - Representação esquemática dos dois métodos de purificação de protoplastos a partir de explantes foliares.

2.2.3. Isolamento e purificação de protoplastos a partir de suspensões celulares de *calli* embriogénicos.

Após 5 dias em meio TP líquido, no escuro e com agitação orbital (pré-condicionamento), as massas celulares juntamente com o meio de cultura foram submetidas a uma filtração a vácuo (Fig. 8) usando um filtro 0,22 µm e após esta filtração realizaram-se duas lavagens com uma solução 0,45 M de manitol.

Colocou-se o filtro usado na filtração dentro de um falcon onde se adicionou 15 ml de solução enzimática composta por celulase “Onozuka” R-10 (Yakult Pharmaceuticals, Japão) a 1 % (p/v), pectinase (Sigma-Aldrich) a 0,04 % e driselase (Fluka AG, Buchs SG, Suíça) a 0,4 %. As enzimas foram solubilizadas numa solução tampão (0,4 M manitol, 20 mM MES – KOH, 20 mM KCl, 0,1% (p/v) BSA e 10 Mm CaCl₂) e o pH da solução ajustado a 5,7. Foram testados dois tempos de duração da incubação enzimática 1 h e 2 h a 27 °C, com agitação.

Numa fase seguinte a mistura resultante da digestão dos tecidos pela solução enzimática foi passada através de um filtro de 70 µm e foi centrifugada durante 5 minutos a 100 *g*. Obteve-se um *pellet* que foi ressuscitado em 2 ml de solução de lavagem procedeu-se à centrifugação a 100 *g*, durante 5 minutos.

Na figura 9 estão representados os procedimentos experimentais e o material vegetal utilizados para o isolamento de protoplastos a partir de explantes foliares e suspensões de *calli* embriogénicos.

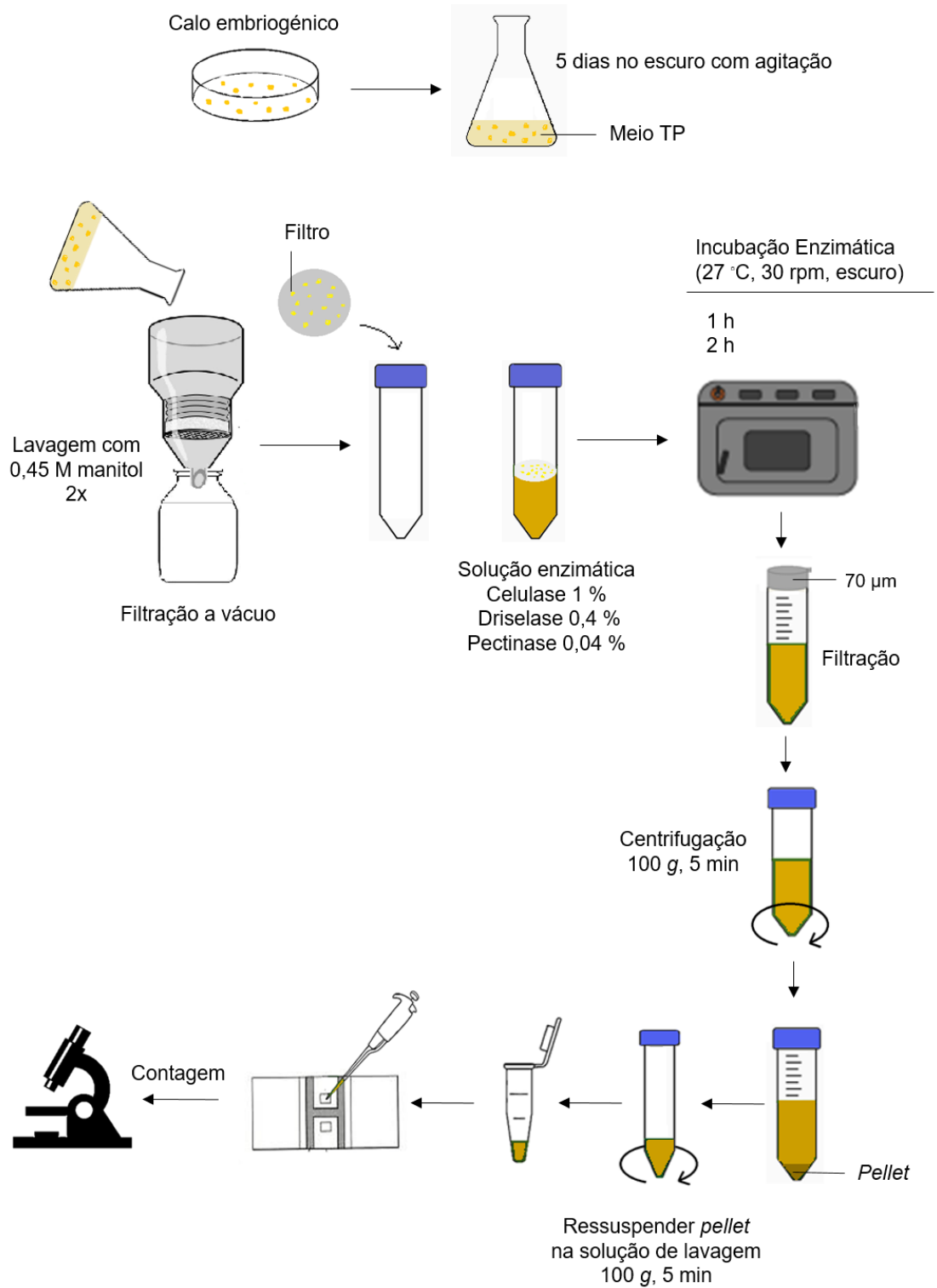


Figura 8 - Representação esquemática do isolamento e purificação de protoplastos a partir de suspensões celulares de *calli* embriogênicos.

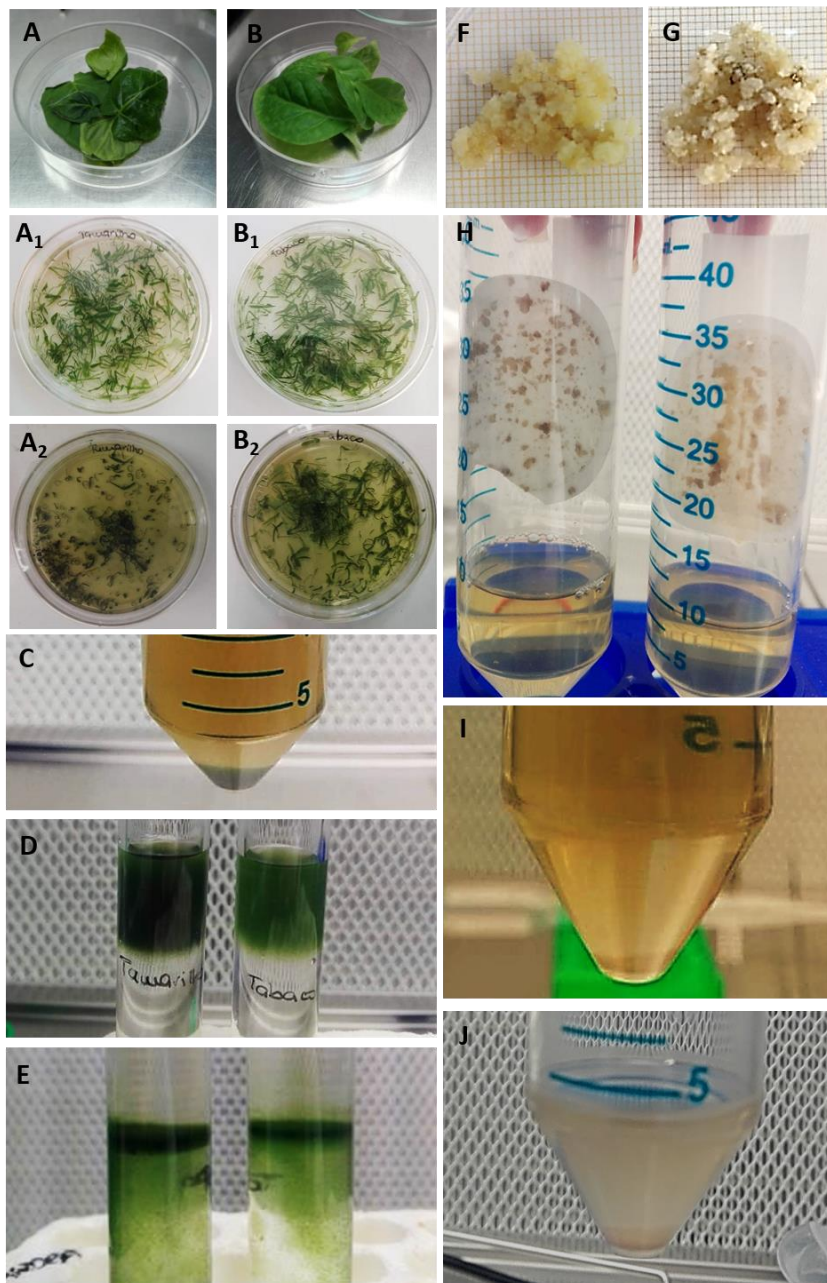


Figura 9 – Isolamento e purificação de protoplastos do mesófilo foliar de tamarilho e tabaco e de *calli* embriogénicos de tamarilho. Explantes foliares utilizados no isolamento de protoplastos de tamarilho (A) e tabaco (B) após recolha a partir das plantas micropropagadas; e subsequentemente em solução de pré-plasmólise (A₁ e B₁) e durante a incubação enzimática (A₂ e B₂); *Pellet* obtido após a primeira centrifugação (C) e sobreposição da solução com protoplastos em camada de sacarose 0,5 M (D) para centrifugação em gradiente de densidade, da qual resulta a purificação dos protoplastos em banda interfásica (E). Massas de 150 mg de *calli* embriogénico CE1 (F) e CE2 (G) submetidos a incubação com solução enzimática em tubos falcon (H); *Pellet* obtido após primeira centrifugação (I) para a purificação de protoplastos em *pellet* (J).

2.3. Contagem e determinação da viabilidade dos protoplastos

A densidade dos protoplastos em suspensão foi determinada recorrendo a um hemocitômetro (câmara de Neubauer) com 2 câmaras de contagem de 0,10 mm de profundidade. Procedeu-se à contagem das células nos 5 quadrados de cada uma das câmaras (Fig. 9A) e no interior de cada quadrado, fez-se uma contagem em *zig-zag* (Fig. 9B). Os protoplastos situados nos limites inferior e direito de cada quadrado, não foram contabilizados (Fig. 9C).

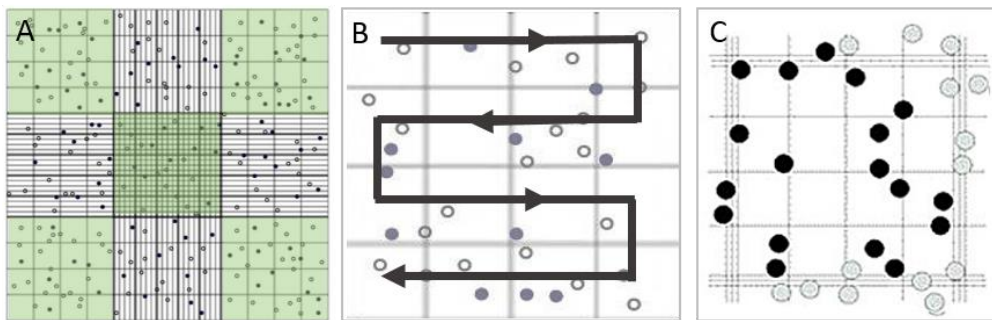


Figura 10 – (A) Câmara de contagem do hemocitômetro; (B) metodologia adotada na contagem dos protoplastos; (C) limites de exclusão e inclusão dos protoplastos na contagem.

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

Antes de proceder à cultura dos protoplastos verificou-se se os protoplastos obtidos eram viáveis. A viabilidade permite verificar se as condições de isolamento e purificação dos protoplastos são as ideais e foi determinada usando o corante Evans blue (Sigma-Aldrich) a 1 % (p/v). Assim, ressuspendeu-se suavemente 1 μ l da solução de Evans blue com 25 μ l da suspensão de protoplastos. Posteriormente aplicou-se 10 μ l em cada uma das câmaras de contagem do hemocitômetro.

Após a contagem dos protoplastos totais e viáveis calcularam-se os seguintes parâmetros: densidade (d); rendimento (η) e viabilidade.

A densidade é expressa em protoplastos/ml e traduz-se na seguinte fórmula:

$$d = \frac{\Sigma(\text{protoplastos em 5 quadrados da câmara de contagem}) \times 10^4}{5 \times \text{fator de diluição} \times 1/2}$$

O cálculo do número total de protoplastos é dado pela seguinte fórmula:

$$\#protoplastos = d \times \text{volume inicial da suspensão de protoplastos (ml)}$$

O rendimento do processo de isolamento e purificação de protoplastos é expresso em protoplastos/g PF⁻¹ e foi calculado para os protoplastos viáveis e totais de acordo com a seguinte fórmula:

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

A viabilidade dos protoplastos foi estimada como a percentagem do número de protoplastos viáveis relativamente ao número total de protoplastos observados no mesmo campo, recorrendo à seguinte fórmula:

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

2.4. Cultura de protoplastos

No fim da contagem procedeu-se à diluição da suspensão com meio de cultura de forma a obter uma concentração de plaqueamento de $5 - 7 \times 10^5$ protoplastos.ml⁻¹. O volume de protoplastos obtido foi dividido de modo a ser distribuído por placas *multiwell* para cultura sob a forma de *droplets* de agarose ou em meio líquido (Fig. 10).

Após as diluições, a 500 µl da suspensão de protoplastos adicionou-se igual volume do meio de cultura a testar gelificado com agarose “low melting” (Duchefa Biochimie) a 1,2 % (p/v), previamente aquecido a 40 °C. Posteriormente em cada poço colocou-se 1 ml do respetivo meio de cultura (Fig. 11).

Na cultura de protoplastos obtidos a partir de explantes foliares foram testados 6 meios base (Tabela 1) com diferentes combinações de reguladores do crescimento (Tabela 2): Em todos os meios foi testada apenas uma combinação à exceção dos meios base B5 e MS a partir dos quais se testaram duas combinações diferentes de reguladores de crescimento.

Para os protoplastos obtidos a partir de *calli* foram testados dois meios B5 e MS ambos suplementados com 0,1 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de NAA e 1 mg/l de BAP.

Após dois dias em cultura verificou-se a capacidade de os protoplastos começarem a produzir uma nova parede celular, através da utilização de calcofluor white a 0,1 % (p/v). Para isso, ressuspendeu-se 2,5 µl da solução de calcofluor white com 50 µl da suspensão de protoplastos em cultura, colocou-se numa lâmina e observou-se ao microscópio de fluorescência Leica DM4000B (comprimento de onda de excitação 380; comprimento de onda de emissão 500-520) de forma a verificar a regeneração da parede celular. As imagens foram captadas com a câmara Leica DFC295.

Passados 10 dias em cultura refrescou-se as culturas com o meio de cultura inicial, mas sem manitol, e após a formação de possíveis microcalos estes foram transferidos para o meio sólido respetivo e colocados sobre um papel de filtro dentro de placas *multiwell* e foram feitas observações diárias de forma a detetar a formação de calos.

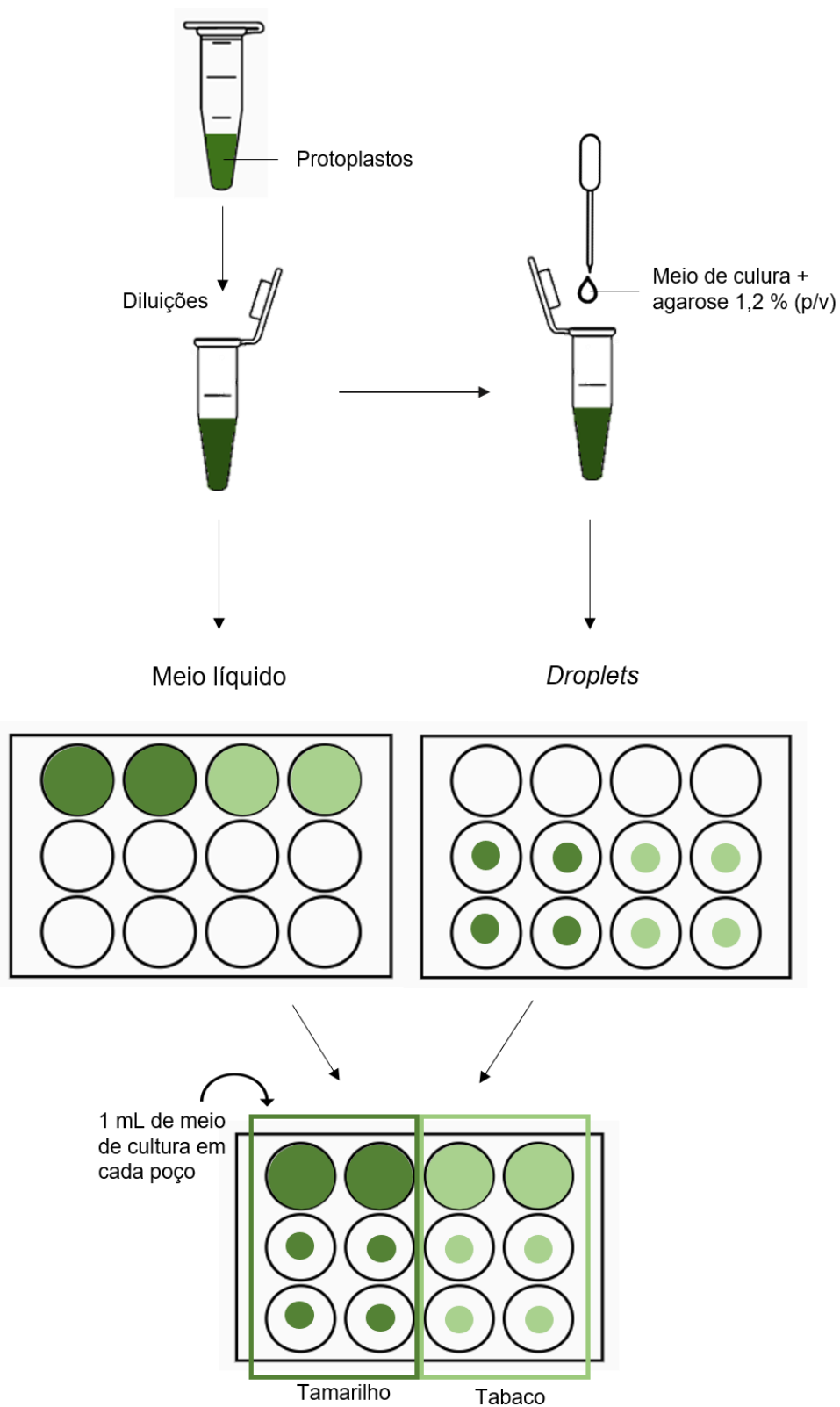


Figura 11 – Representação esquemática da cultura de protoplastos.

Tabela 1 - Composição química da solução de pré-plasmólise (K3 – sacarose a 0,4M) e dos meios de cultura B5, MS, WPM, TB, SA e PIM utilizados no isolamento e cultura de protoplastos.

	K3 - sacarose 0,4 M	B5	MS	WPM	TB	SA	PIM
	pH 5,5	pH 5,8	pH 5,8	pH 5,2	pH 5,8	pH 5,8	pH 5,6
Macronutrientes	mg/l						
KNO ₃	2500	2500	1900	---	950	1500	505
NH ₄ NO ₃	250	---	1650	400	825	---	160
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	134	---	---	---	---	---
CaCl ₂ • 2H ₂ O	900	150	440	72,5	220	500	440
MgSO ₄ • 7H ₂ O	250	250	370	180,54	1233	750	370
NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	150	150	---	---	---	---	---
KH ₂ PO ₄	---	---	170	170	680	200	170
K ₂ SO ₄	---	---	---	990	---	---	---
Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O	---	---	---	471,26	---	---	---
Micronutrientes	mg/l						
MnSO ₄ • H ₂ O	10	10	22,3	22,3	22,3	25	0,1
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	2	2	8,6	8,6	8,6	5	1
H ₃ BO ₄	3	3	6,2	6,2	6,2	10	1
KI	0,75	0,75	0,83	---	0,83	---	0,01
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,15	---
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,25	0,025	0,015	0,03
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	---	---	---	---
CoSO ₄ • 7H ₂ O	---	---	---	---	0,03	---	---
AlCl ₃	---	---	---	---	---	---	0,03
NiCl ₂ 6H ₂ O	---	---	---	---	---	---	0,03
Fonte de Ferro	mg/l						
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	35	---
FeSO ₄ • 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	25	---
Citrato de ferro amoniacal	---	---	---	---	---	---	30
Compostos Orgânicos	mg/l						
Glicina	---	---	2	2	---	1	---
Ácido nicotínico	1	1	0,5	0,5	---	5	---
Piridoxina • HCl	1	1	0,5	0,5	---	0,5	1
Tiamina • HCl	10	10	0,1	1	1	2	1
Mio-inositol	100	100	100	100	100	1000	100

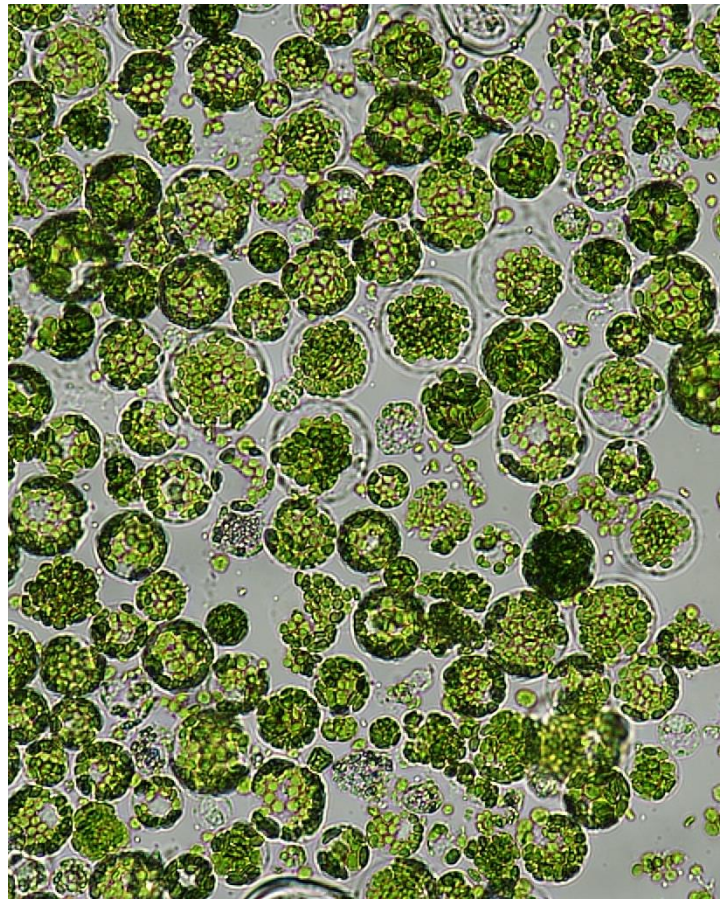
MATERIAL E MÉTODOS

Ácido fólico	---	---	---	---	---	0,5	0,2
Pantotenato de cálcio	---	---	---	---	---	---	1
Biotina	---	---	---	---	---	0,05	0,01
Niacina	---	---	---	---	---	---	1
L-glutamina	---	---	---	---	---	250	---
L-serina	---	---	---	---	---	0,1	---
Hidrolisado caseína	---	---	---	---	---	1000	---
Piruvato sódio	---	---	---	---	---	20	---
Ácido cítrico	---	---	---	---	---	40	---
Ácido málico	---	---	---	---	---	40	---
Ácido fumárico	---	---	---	---	---	53,55	---
Açúcares	g/l						
Xilose	0,25	---	---	---	---	---	---
Sacarose	136,92	10	10	20	10	0,06	---
Glucose	---	18	18	---	---	0,06	40
Manitol	---	100	100	100	127,5	0,29	60

Tabela 2 - Composição dos meios testados em termos de reguladores de crescimento

	Referência	Meio base	Reguladores de crescimento (mg/l)
Meio 1	Gamborg <i>et al.</i> , 1968	B5	0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP
Meio 2		B5	3,0 NAA + 1,0 BAP
Meio 3	Murashige e Skoog, 1962	MS	0,1 2,4-D + 1,0 NAA + 1,0 BAP
Meio 4		MS	3,0 NAA + 1,0 BAP
Meio 5	Nagata e, 1971	TB	3,0 NAA + 1,0 BAP
Meio 6	Chupeau <i>et al.</i> , 2013	PIM	1,0 2,4-D
Meio 7	Upadhya, 1975	SA	3,0 NAA + 1,0 BAP
Meio 8	Smith e McCown, 1983	WPM	4,0 NAA + 2,0 BAP

3. Resultados



3.1. Isolamento e purificação de protoplastos

3.1.1. A partir de explantes foliares

No processo de isolamento de protoplastos a partir do mesófilo foliar, as diferenças entre os diferentes tratamentos testados foram permitindo otimizar a abordagem experimental a seguir. Nomeadamente, no que diz respeito às soluções de pré-plasmólise testadas, observaram-se diferenças bastante acentuadas em relação ao número de protoplastos obtido e ao seu comportamento após o processo de isolamento.

Usando a solução de pré-plasmólise K3 – 0,4 M sacarose durante 10 min obteve-se um reduzido número de protoplastos ($1,35 \pm 0,29 \times 10^5$) e grande parte apresentavam sinais de rebentamento. Em contraste, a solução 0,45 M de manitol durante 20 min, permitiu obter um maior rendimento ($7,75 \pm 6,74 \times 10^5$ protoplastos/g PF) e menos rebentamento das células.

No que diz respeito à composição da solução enzimática, a solução com as enzimas dissolvidas em 0,45 M manitol, 20 mM MES – KOH, 20 mM KCl, 0,1% (p/v) BSA e 10 mM CaCl_2 permitiu uma digestão eficiente comprovada pela observação dos tecidos digeridos após a incubação enzimática e pelo volume de *pellet* obtido logo após a primeira centrifugação, quando comparado com a solução K3 – 0,4 M sacarose utilizada na solução enzimática.

Testou-se a purificação com adição da solução W5 antes da primeira centrifugação e a lavagem dos protoplastos com essa mesma solução. E a purificação usando uma camada de sacarose para obtenção da banda interfásica e ressuspensão dos protoplastos com solução de lavagem. No primeiro método de purificação utilizado verificou-se que após a sequência de centrifugações os protoplastos depositavam-se no fundo do tubo, não havendo separação das células de interesse do restante material não digerido, que se refletiu na ausência da formação de uma banda interfásica bem definida. No entanto, o segundo método de purificação, foi bastante eficiente observando-se uma banda de protoplastos acima da camada de sacarose (Fig. 12A). Já na fase de lavagem, a ressuspensão dos protoplastos na solução de W5 em vez da solução de lavagem levou a um menor volume final do *pellet* dos protoplastos isolados. (Fig. 12B) e a um maior rebentamento das células (Fig. 12C).

Todo o procedimento subsequente foi efetuado de acordo com os resultados positivos acima descritos, e que permitiram definir o método ideal de isolamento e purificação de protoplastos a adotar.

RESULTADOS

Após o isolamento e purificação em banda interfásica obtida em gradiente de sacarose (Fig. 13A) os protoplastos apresentavam uma forma esférica com os cloroplastos uniformemente distribuídos. Foi possível determinar o rendimento e viabilidade dos protoplastos de tabaco (sistema controle) e tamarilho obtidos a partir de 1 grama de peso fresco de folhas jovens expandidas.

A determinação do rendimento dos protoplastos de tabaco (Fig. 13B) e tamarilho (Fig.13C) foi realizada através da sua contagem em hemocitômetro.

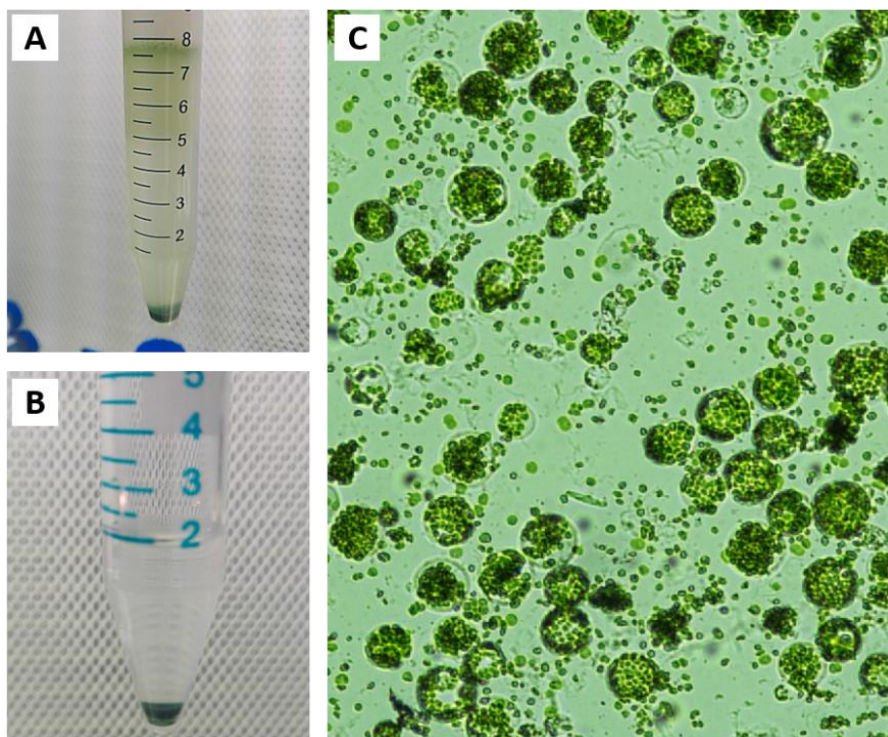


Figura 12 – Resultados obtidos a partir do primeiro método de purificação e lavagem com solução W5. (A) Banda interfásica difusa; (B) *pellet* de protoplastos obtido; (C) rebentamento de protoplastos.

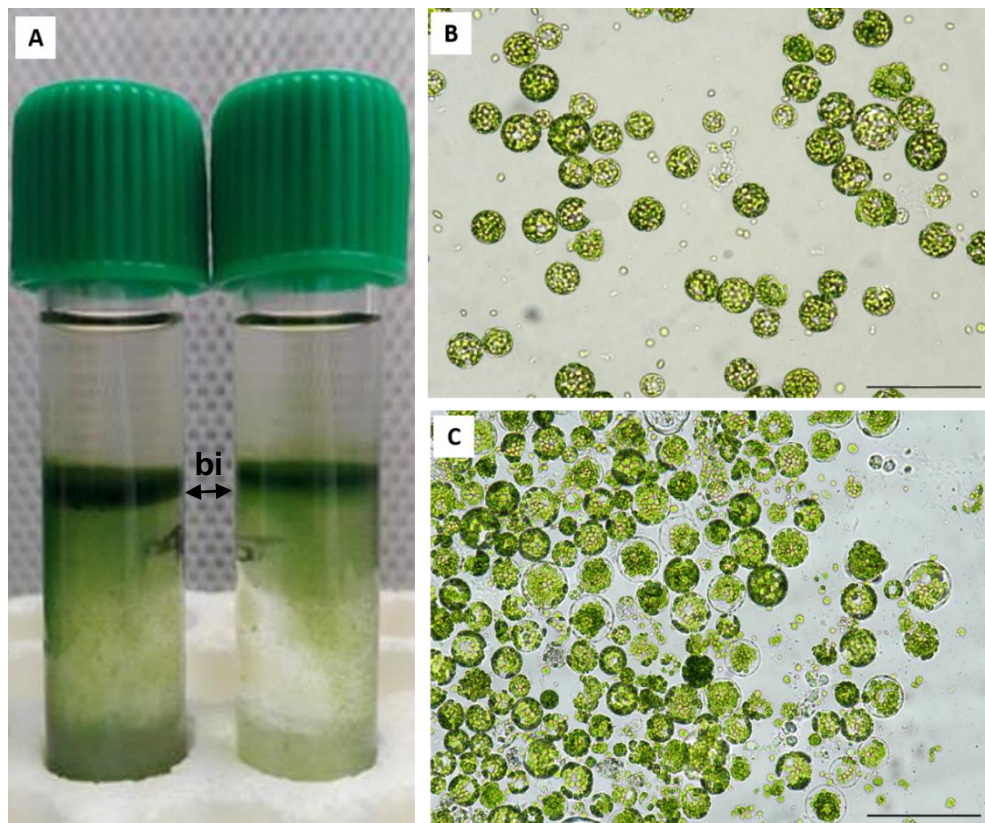


Figura 13 – Banda interfásica obtida após a centrifugação de gradiente de densidade (A) Protoplastos de tabaco (B) e tamarilho (C) da banda interfásica obtidos a partir de explantes foliares. As barras correspondem a 100 μ m. Legenda: bi – banda interfásica.

Em termos de rendimento o tamarilho apresentou um valor superior ($7,75 \pm 6,74 \times 10^5$ protoplastos/g PF) comparativamente com o tabaco ($6,04 \pm 5,86 \times 10^5$ protoplastos/g PF). Contudo, segundo o teste paramétrico t de *Student* os valores não apresentaram diferenças significativas.

Apesar de o tamarilho apresentar maior rendimento de protoplastos, quanto às percentagens de viabilidade o tabaco mostrou ter valores um pouco superiores.

Os protoplastos de tamarilho apresentam uma viabilidade de $56,78 \pm 19,97$ % enquanto os do tabaco têm uma percentagem de viabilidade de $61,29 \pm 13,13$ %.

De acordo com o teste paramétrico t de *Student* os valores não apresentaram diferenças significativas.

A determinação da viabilidade (Fig. 14) foi conseguida através do corante de exclusão Evans blue que permitiu distinguir protoplastos viáveis dos não viáveis. Os protoplastos não viáveis apresentavam uma coloração azul escura enquanto os viáveis não apresentavam coloração devida ao corante (Fig. 15).

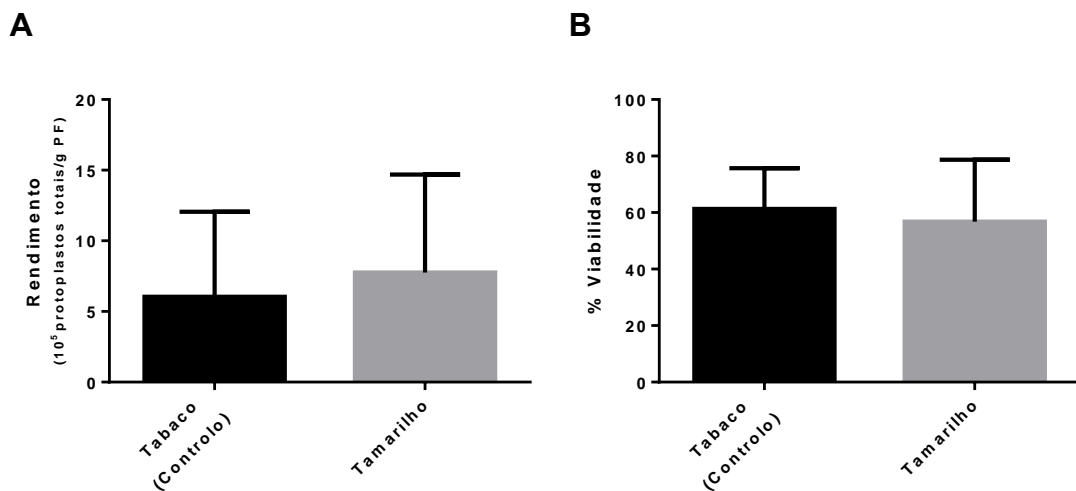


Figura 14 – (A) Rendimento médio dos protoplastos obtidos a partir de explantes foliares de tabaco e tamarilho. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de 18 réplicas. (B) Viabilidade dos protoplastos de tabaco e tamarilho obtidos a partir de explantes foliares. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão

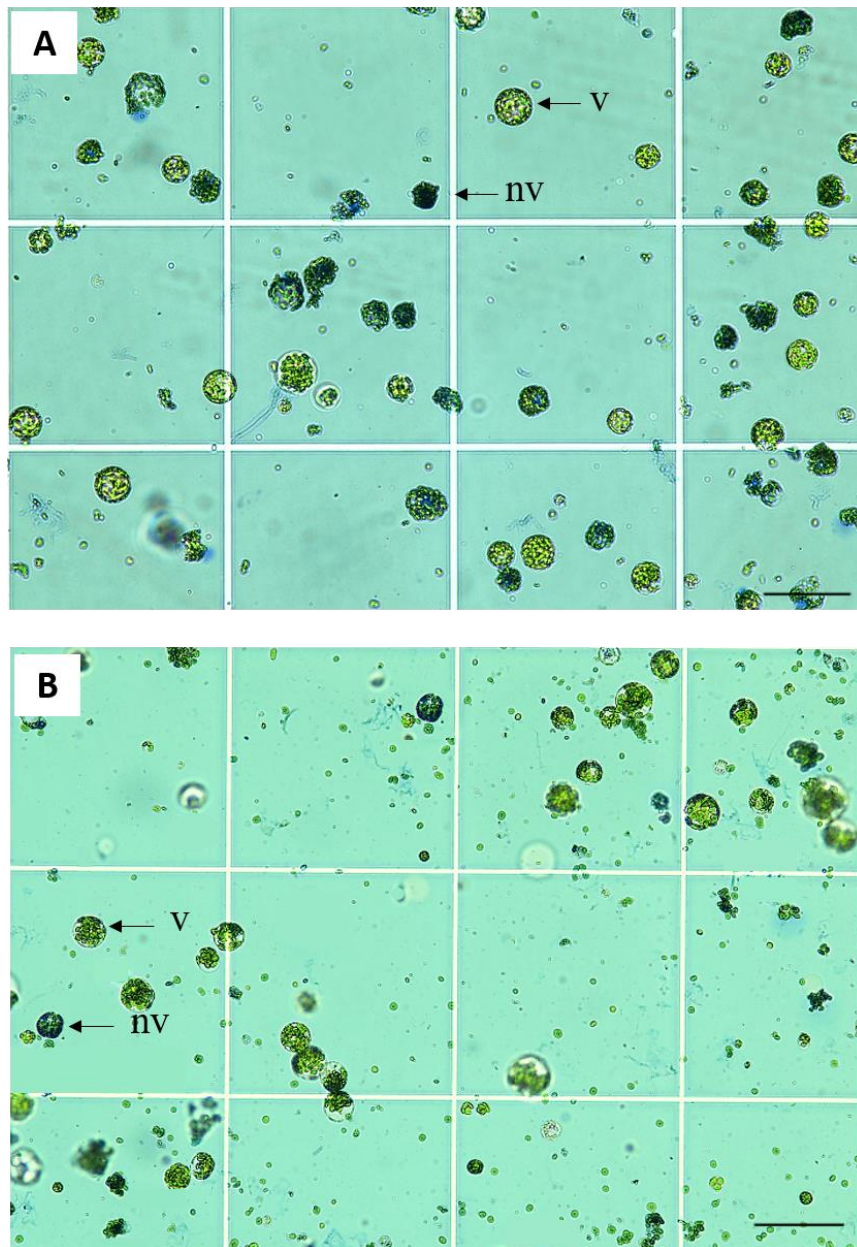


Figura 15 - Protoplastos de tabaco (A) e tamarilho (B) obtidos a partir de explantes foliares corados com Evans blue. As barras correspondem a 100 μm . Legenda: v- viável; nv- não viável.

3.1.2. A partir de suspensões celulares de *calli* embriogénicos

O método de isolamento e purificação usado mostrou ser bastante eficiente, uma vez que se traduziu num bom rendimento de protoplastos. A incubação enzimática durante 2 horas permitiu uma quase completa digestão dos tecidos, o que não aconteceu quando o período de incubação foi de 1 hora.

O rendimento dos protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de *calli* de origem embriogénica foi também determinado através da sua contagem em hemocitómetro.

Na figura 16 é possível observar o aspeto dos protoplastos isolados com o seu formato esférico característico mas são também visíveis algumas células com forma alongada que correspondem a células cuja parede celular não foi totalmente digerida. Os dados mostraram igualmente que a obtenção de protoplastos a partir de suspensões celulares de *calli* era acompanhada por uma maior quantidade de resíduos, comparativamente aos observados para os protoplastos foliares, resultantes das diferenças a nível dos processos de purificação utilizados.

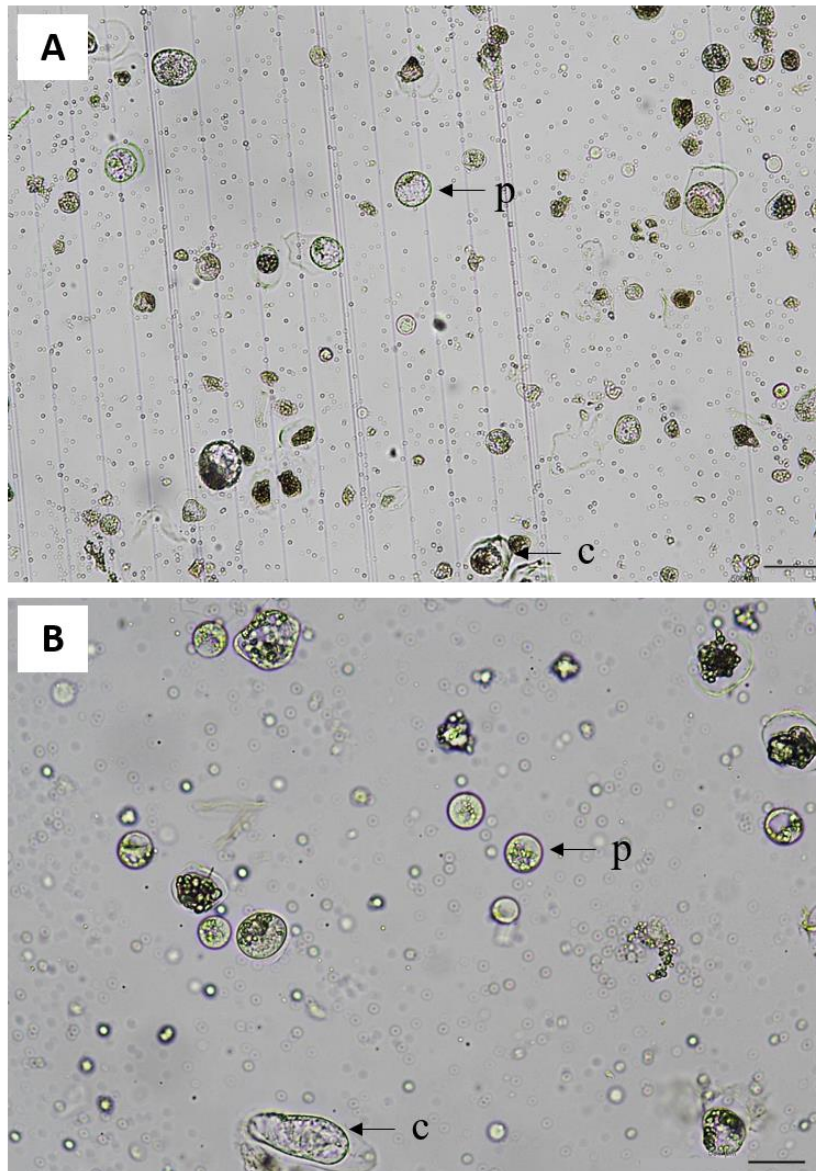


Figura 16 – Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de *calli* embriogênicos CE1 (A) e CE2 (B). As barras correspondem a 100 μm . Legenda: p- protoplasto, c- célula com parede celular não digerida.

O rendimento do processo de isolamento e purificação (Fig. 17) foi sempre bastante superior para a linha de calo CE2, apesar de essa diferença não ser estatisticamente significativa de acordo com o teste t. A acentuada diferença de valores de rendimento de CE1 ($5,64 \pm 1,16 \times 10^5$ protoplastos/g PF) e CE2 ($1,80 \pm 0,94 \times 10^6$ protoplastos/g PF), permitiu optar pela linha CE2 para as etapas subsequentes do trabalho.

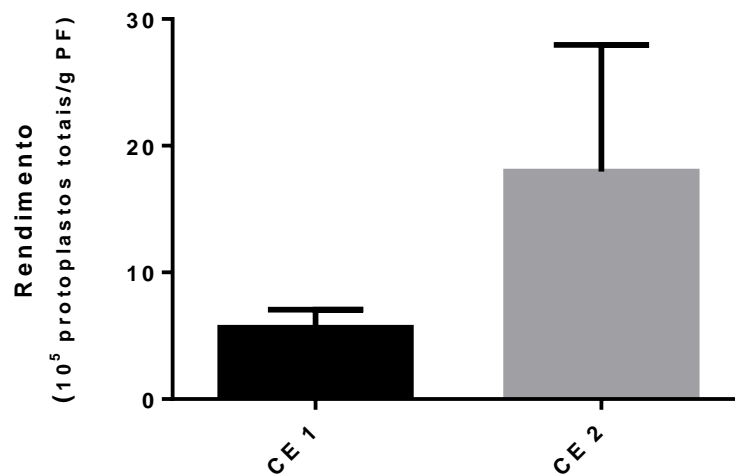


Figura 17 - Rendimento dos protoplastos obtidos a partir suspensões celulares de calo embriogénico 1 (CE1) e calo embriogénico 2 (CE2). $9 \geq n \geq 3$

À semelhança do método de determinação da viabilidade utilizado para protoplastos isolados a partir de explantes foliares, também para os protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de *calli* embriogénicos recorreu-se ao corante Evans blue (Fig. 18). A percentagem de viabilidade de CE2 foi de $52,31 \pm 9,67 \%$.

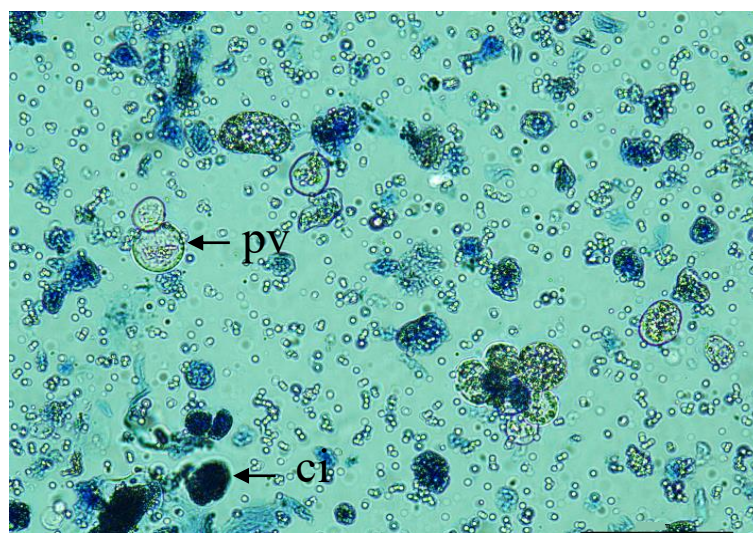


Figura 18 - Protoplastos de CE2 corados com Evans blue. As barras correspondem a 100 μm .
 Legenda: pv- protoplasto viável, ci- célula com parede celular não digerida não viável.

3.2. Cultura de protoplastos

3.2.1. Obtidos a partir de explantes foliares

Após 7 dias de cultura (Fig. 19 A-H) as condições experimentais para as quais se observava uma maior evolução das culturas de protoplastos de tabaco foram B5 + 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP (Fig. 19.A), TB + 3 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP (Fig. 19E) e PIM + 1 mg/l de 2,4-D (Fig. 19F). Em todos estes 3 meios de cultura foram observados sinais de síntese da parede celular e divisões celulares (Fig. 19A,E,F – setas pretas). Os restantes meios afetaram negativamente as células observando-se sinais de variações do volume celular e rebentamento.

Já para os protoplastos de tamarilho, ao fim de 7 dias de cultura (Fig. 20A-H), apenas no meio B5 + 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP os protoplastos apresentaram avanços positivos, como a regeneração da parede celular e divisões celulares (Fig. 20A). Para os restantes meios de cultura a maior parte das células libertou o seu citoplasma para o meio (rebenamento), observando-se apenas células alteradas, com uma cor escura e sem evolução.

Todo o procedimento subsequente foi efetuado tendo em conta apenas o meio B5 + 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP, uma vez que foi o único meio de cultura que apresentou sinais de evolução tanto no tamarilho como no tabaco.

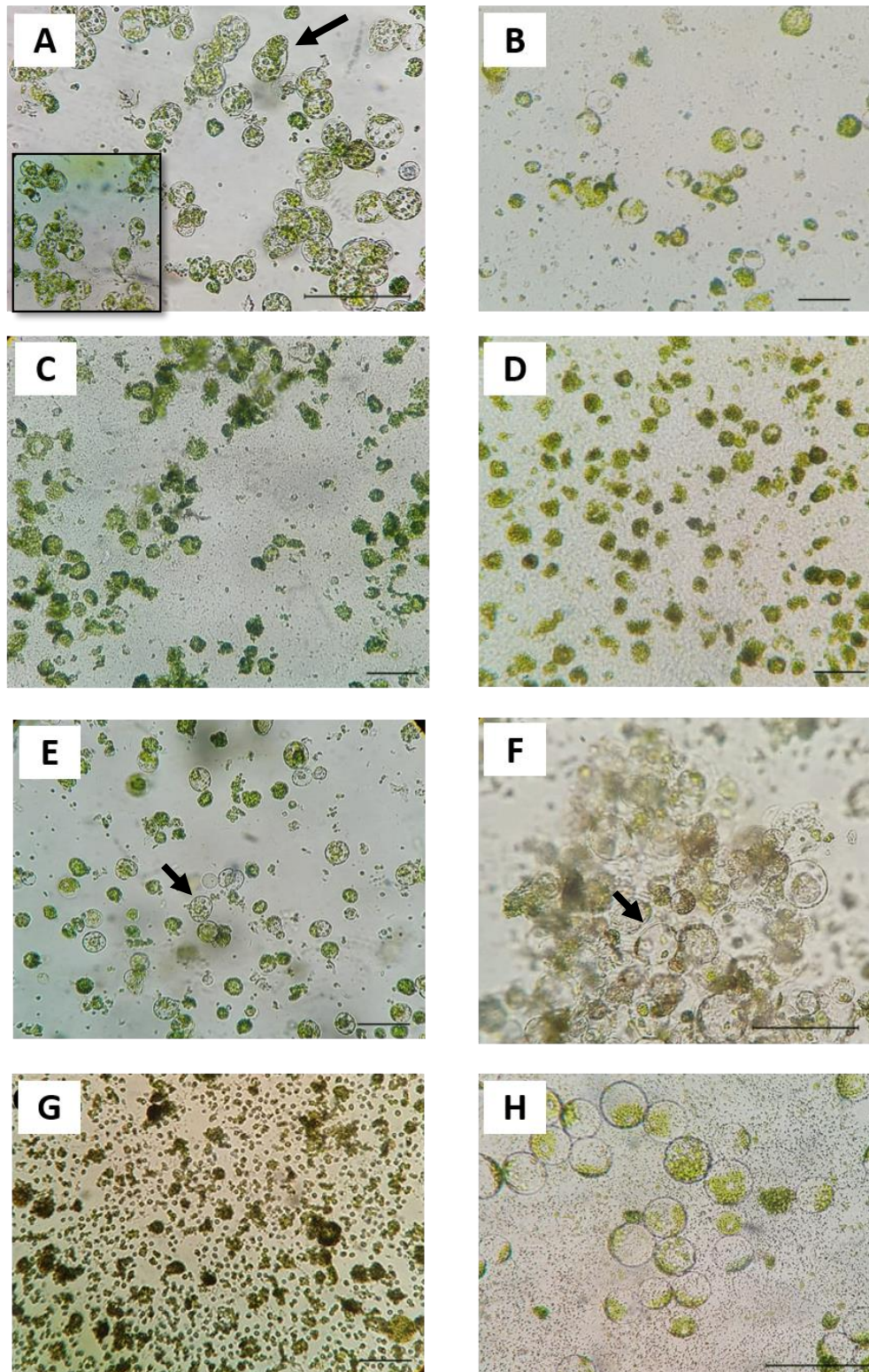


Figura 19 - Protoplastos de tabaco após 7 dias em diferentes meios de cultura. A (B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP); B (B5 + 3 NAA + 1 BAP); C (MS + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP); D (MS + 3 NAA + 1 BAP); E (TB + 3 NAA + 1 BAP); F (PIM + 1 2,4-D); G (SA + 3 NAA + 1 BAP); H (WPM + 4 NAA + 2 BAP). Bar = 100 μ m.

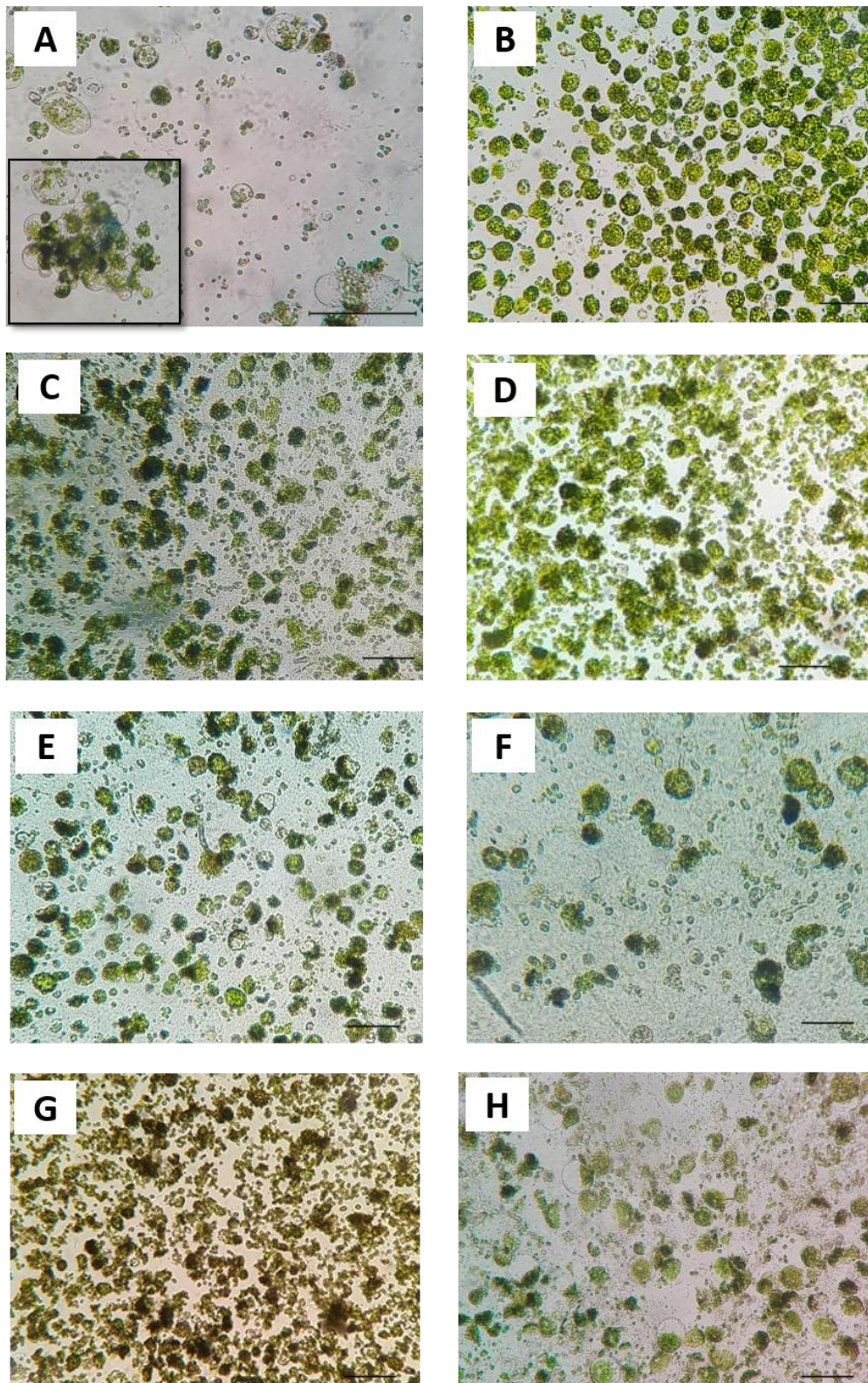


Figura 20 - Protoplastos de tamarillo após 7 dias em diferentes meios de cultura. A (B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP); B (B5 + 3 NAA + 1 BAP); C (MS + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP); D (MS + 3 NAA + 1 BAP); E (TB + 3 NAA + 1 BAP); F (PIM + 1 2,4-D); G (SA + 3 NAA + 1 BAP); H (WPM + 4 NAA + 2 BAP). Bar = 100 μ m.

Dois a três dias após o isolamento, tanto nas culturas de tabaco como de tamarilho no meio de cultura B5 + 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP já eram notórios os sinais de evolução das células. Os protoplastos mudaram de forma, aumentaram o volume e os cloroplastos, presentes em abundância após o isolamento, começaram a desaparecer. Começaram também a ser visíveis bandas citoplasmáticas claras de deposição de celulose, que indicavam o início da formação de parede celular (Fig. 21 A e B).

O processo de ressíntese de celulose em protoplastos em cultura não foi síncrono, e estágios distintos puderam ser observados. Nas Figuras 20 A e B são visíveis alguns protoplastos que não apresentaram reação ao calcofluor white (Fig. 21 A e B, setas vermelhas), indicando que as paredes celulares foram completamente degradadas e que a celulose não foi ressintetizada. No entanto nas mesmas figuras observaram-se também protoplastos com zonas marcadas, indicando pontos iniciais de reconstrução da parede celular (Fig. 21 A e B, setas brancas).

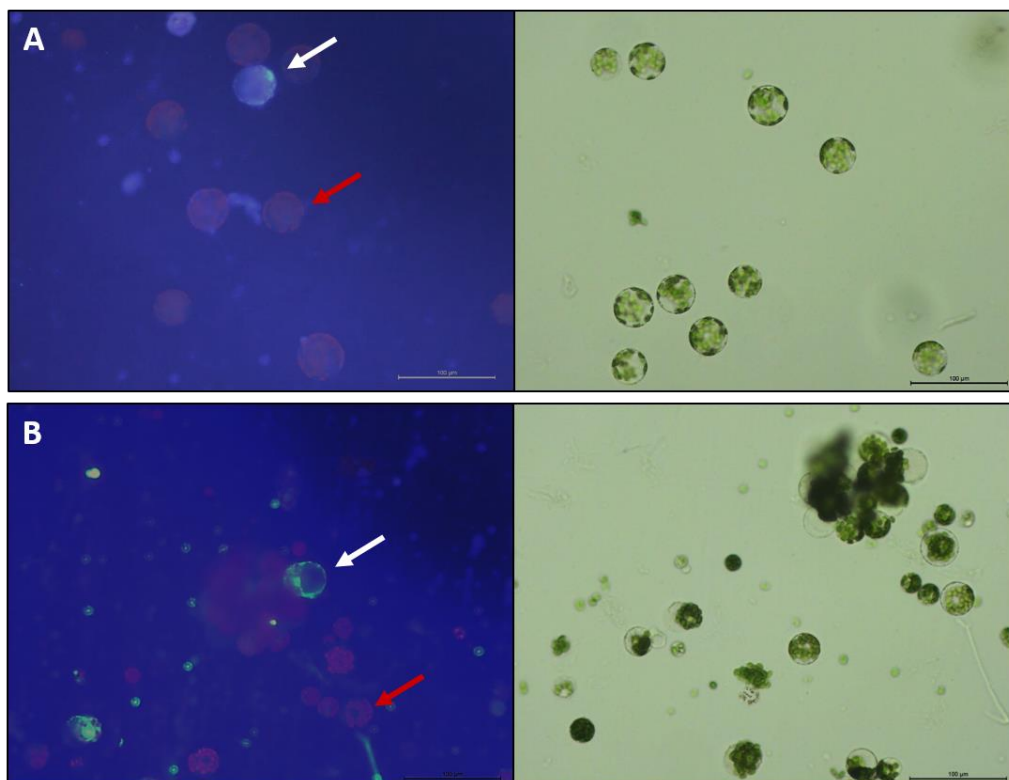


Figura 21 – Protoplastos de tamarilho (A) e tabaco (B) após 2 dias de cultura em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP. Bar= 100 µm.

Os protoplastos incorporados em *droplets* de agarose (meio semi-sólido) (Fig. 22) apresentaram uma distribuição bastante aleatória, aparecendo muitas vezes isolados e dispersos nas primeiras semanas de cultura em meio B5 suplementado com 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP (Fig. 22A). Só foi observada a formação de alguns agregados celulares (microcolônias) após 30 dias (Fig. 22B). No entanto, estas divisões iniciais não tiveram continuidade uma vez que ao longo do tempo não se observaram sinais da sua evolução. Nos restantes meios de cultura as células apresentaram-se dispersas e tiveram comportamento semelhante em relação ao respetivo meio líquido, ou seja, apresentaram uma cor bastante escura e um formato irregular causado pelo rebentamento celular. O comportamento dos protoplastos cultivados em *droplets* foi muito semelhante em tamarilho e no tabaco.

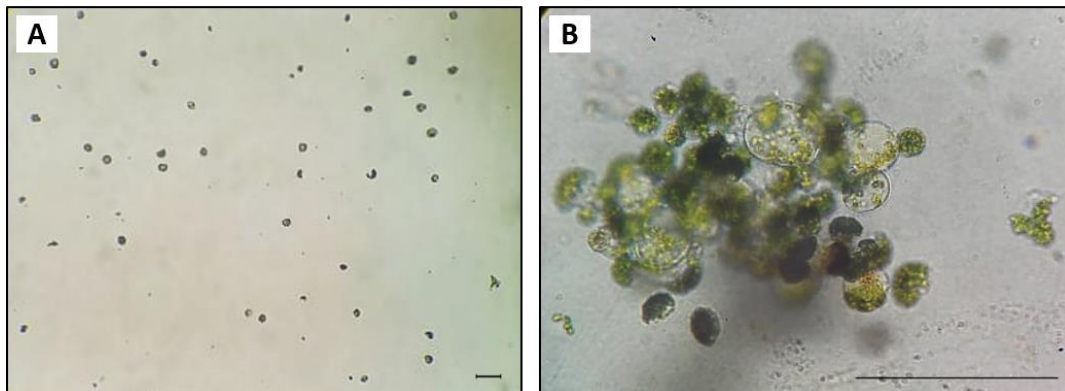


Figura 22 – Protoplastos de tamarilho em *droplets* em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP. (A) Após 15 dias de cultura. (B) Após 30 dias de cultura. Bar= 100 µm.

As figuras 23 e 24 mostram protoplastos marcados com calcofluor white após 7 dias em meio B5 + 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP, onde foi possível observar a distribuição uniforme da celulose sobre a superfície celular, o que indica a completa reconstrução da parede celular e, em alguns protoplastos era visível a formação de uma nova parede celular resultante da citocinese, durante a divisão celular (Fig. 23 e 24, setas vermelhas). Esta evolução das células foi observada tanto em tabaco como em tamarilho, apesar de as divisões celulares aparecerem em maior número para as células de tabaco.

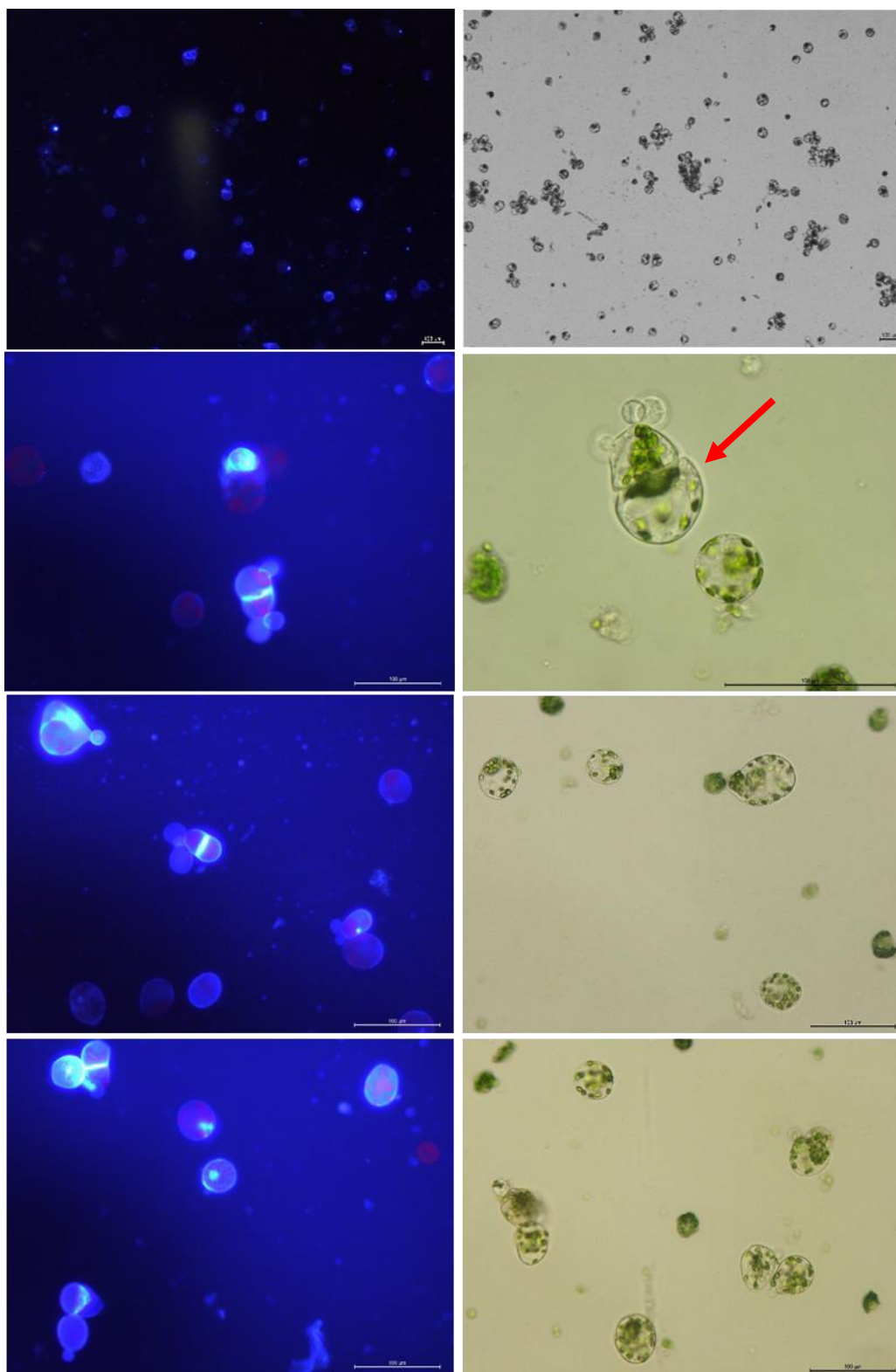


Figura 23 – Protoplastos de tabaco marcados com calcofluor white após 7 dias em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP. As barras correspondem a 100 µ.

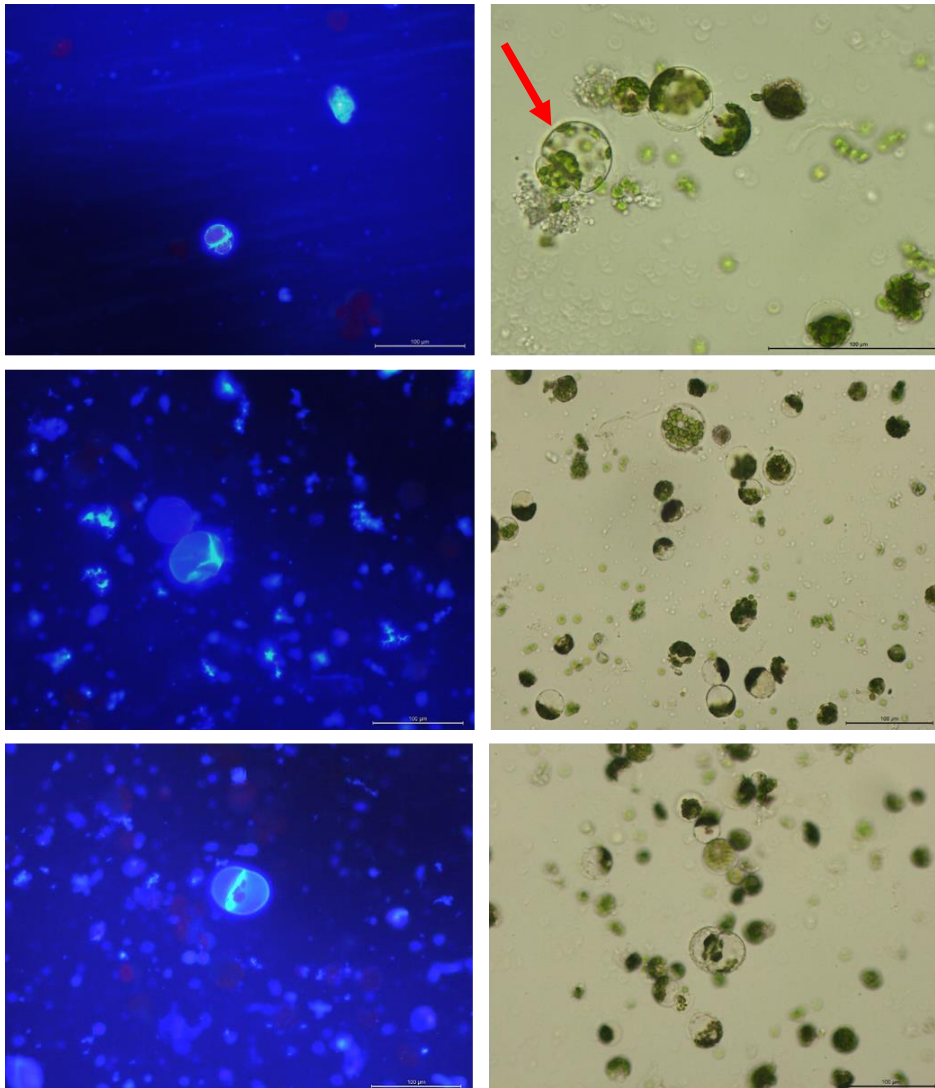


Figura 24 - Protoplastos de tamarilho marcados com calcofluor white após 7 dias em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP. As barras correspondem a 100 µm.

Na figura 20 A-E estão representadas imagens que demonstram a evolução dos protoplastos de tamarilho desde a fase final do isolamento (Fig. 20A) onde as células aparecem com os cloroplastos distribuídos até à agregação das células formando microcolónias após 15 dias de cultura (Fig. 20E). Tendo passado pela reconstrução de parede celular, visível ao segundo dia de cultura em que os cloroplastos já se encontram concentrados sobre um lado das células (Fig. 20C), pelas divisões celulares observadas ao fim de sete dias de cultura (Fig. 20D).

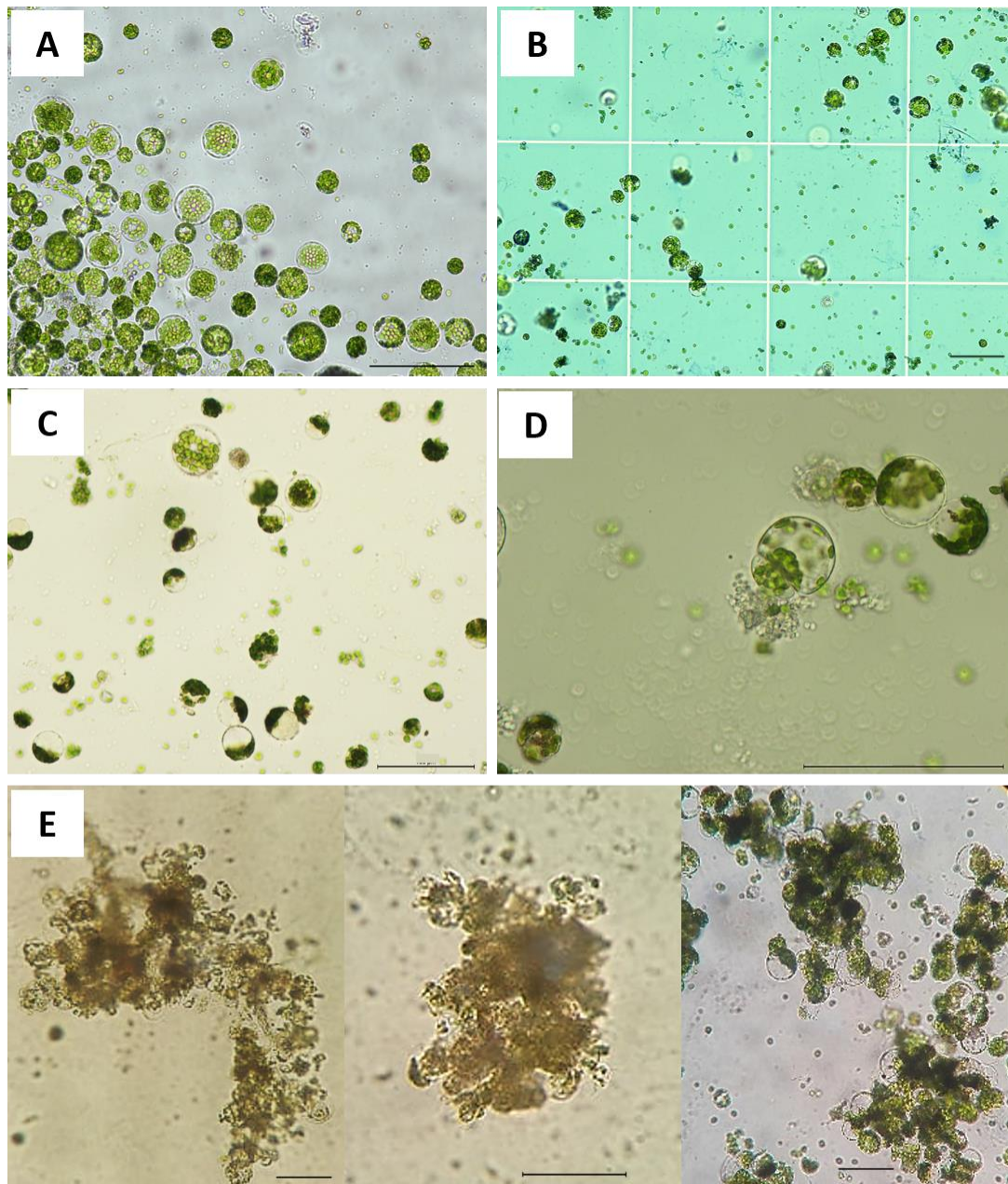


Figura 25 – Evolução dos protoplastos de tamarilho em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP. (A) Protoplastos isolados a partir de explantes foliares. (B) Protoplastos corados com Evans blue para determinação da viabilidade. (C) Protoplastos com parede celular após 2 dias em cultura. (D) Protoplastos em divisão celular após 7 dias em cultura. (E) Formação de microcolónias ao fim de 15 dias. Bar = 100 μ m.

3.2.1. Obtidos a partir de suspensões celulares de *calli* embriogênicos

Nos dois meios testados (B5 e MS suplementados com 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP) foi observada uma evolução similar ao longo do tempo, ou seja, os protoplastos apresentaram comportamentos muito semelhantes em ambos os meios.

A evolução dos protoplastos isolados a partir de suspensões celulares de CE2 foi um pouco mais rápida comparativamente com os protoplastos isolados a partir de explantes foliares. Dois dias após a cultura em meio MS (Fig. 26A) e B5 com 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP (Fig. 26B) para além de a maioria das células já ter completado o processo de ressíntese da parede celular foram também observadas as primeiras divisões celulares.

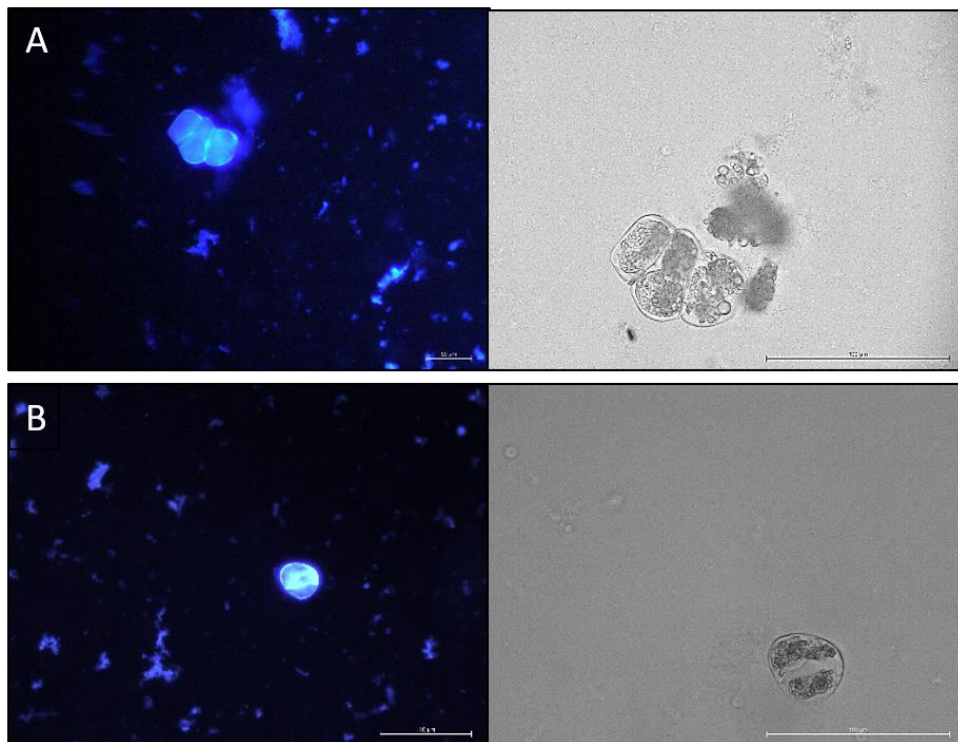


Figura 26 - Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de CE2 marcados com calcofluor white após 2 dias em meio de cultura MS 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP (A) e B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP (B). As barras correspondem a 100 μ m.

Ao fim de 7 dias através da colocação com calcofluor white, nos meios MS (Fig. 27) e B5 (Fig. 28) suplementados com 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP grande parte das células estavam em divisão e tinham um aspeto viável, o que demonstra um comportamento positivo em relação aos meios de cultura testados. No entanto para além destas divisões as células ao longo do tempo não houve progressão para a formação de microcolónias.

Quanto aos protoplastos colocados em meio de cultura semi-sólido MS e B5 com 0,1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BAP gelificado com agarose não houve quaisquer desenvolvimentos, isto é, não foram detetados sinais de reestruturação de parede celular nem aparecimento de células em divisão. As células apresentaram-se dispersas e sem sinais de evolução.

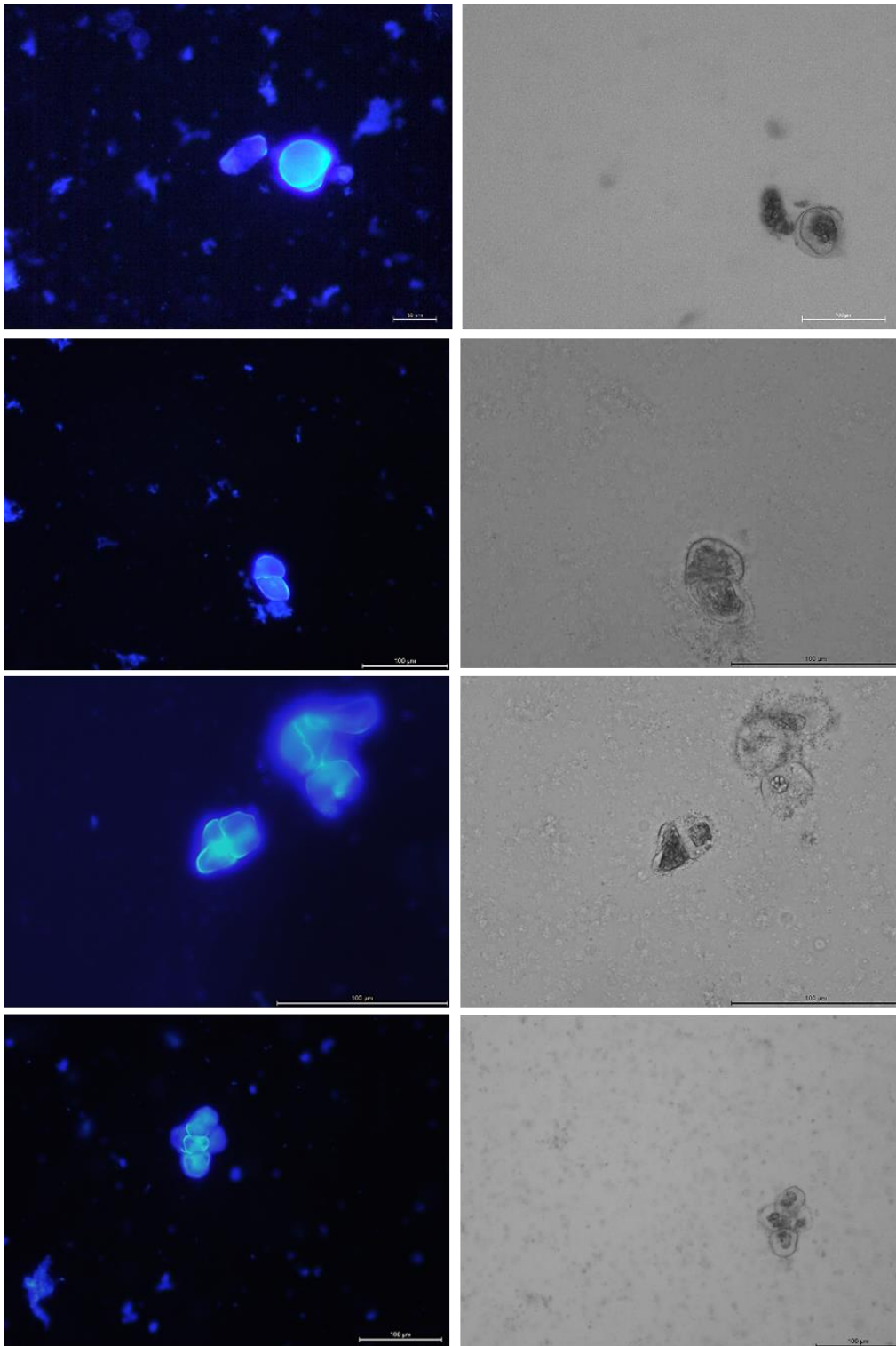


Figura 27 – Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de CE2 marcados com calcofluor white após 7 dias em meio MS + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP. As barras correspondem a 100 µm.

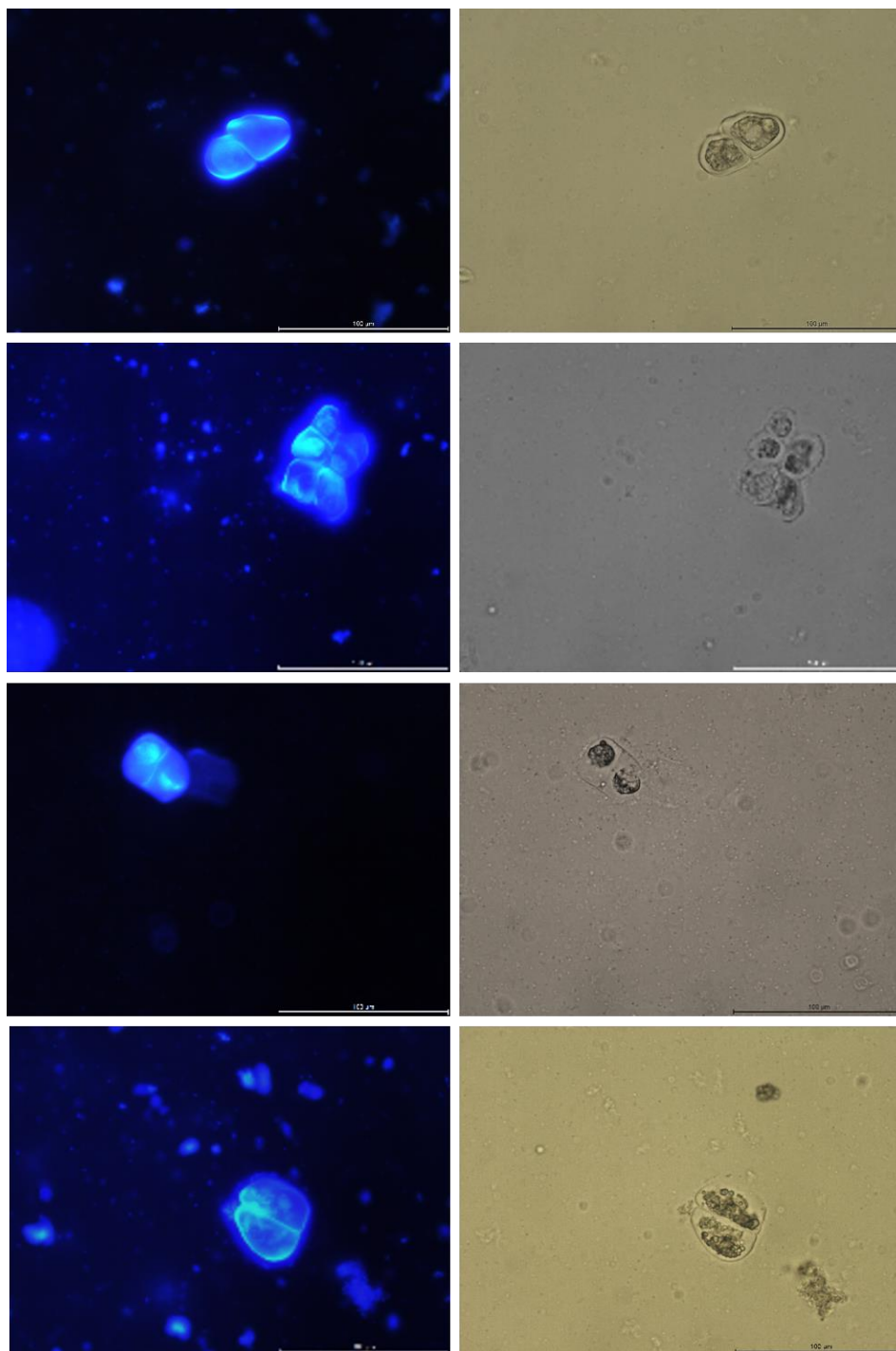
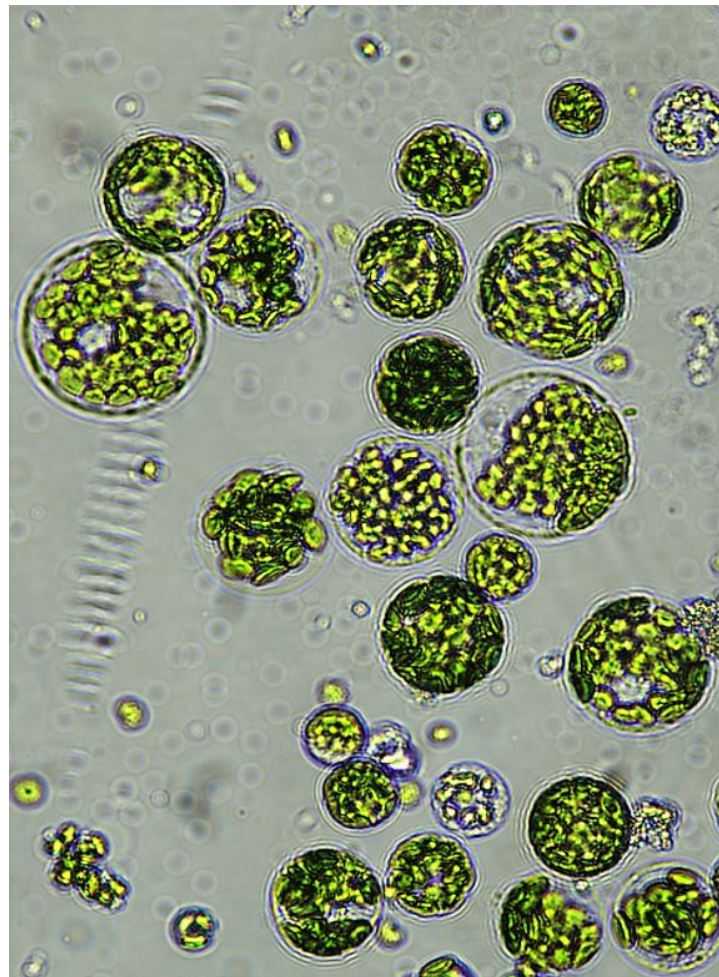


Figura 28 - Protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de CE2 marcados com calcofluor white após 7 dias em meio B5 + 0,1 2,4-D + 1 NAA + 1 BAP. As barras correspondem a 100 µm.

4. Discussão



A regeneração de protoplastos envolve vários passos consecutivos e depende de múltiplos parâmetros incluindo o material vegetal utilizado, a sua proveniência, o tipo de cultura, o método de isolamento de protoplastos, a densidade de protoplastos, a composição do meio e as condições de cultura (Davey *et al.*, 2005; Eeckhaut *et al.*, 2013). Assim sendo, o desenvolvimento de um protocolo sustentado para a regeneração de protoplastos bem sucedida requer a análise de várias condições para cada uma das etapas executadas (Chupeau *et al.*, 1993). Para além disso, o isolamento de protoplastos é um processo indutor de stresse (Papadakis *et al.*, 2001; Papadakis e Roubelakis-Angelakis, 2002), em que a acumulação de produtos residuais pode induzir a destruição das células (Barceló *et al.*, 2019).

A capacidade de isolar um elevado número de protoplastos saudáveis permite uma cultura bem sucedida e o desenvolvimento de um sistema de cultura eficiente (Rahmani *et al.* 2016). No entanto, o seu estabelecimento é influenciado por muitos fatores, como o genótipo, o estado fisiológico e condições de crescimento do tecido de origem do protoplasto, isolamento de protoplastos e composição do meio (Davey *et al.*, 2005; Eeckhaut *et al.*, 2013). O rendimento e a viabilidade podem também ser fortemente influenciados por outras variáveis como 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.*, 2011; Tudses *et al.*, 2015).

4.1. Isolamento e purificação de protoplastos

A densidade celular é um fator chave para a regeneração de protoplastos (Potrykus e Shillito, 1986; Bhojwani e Dantu, 2013) e a alta densidade celular facilita o contacto entre as células e estimula o crescimento de células adjacentes ao libertar fatores de crescimento, um fenómeno conhecido como condicionamento do meio (Morgan, 1999; Davey *et al.*, 2005).

Durante o isolamento dos tecidos dadores os protoplastos sofrem vários stresses, resultando em danos físicos e na modificação das propriedades fisiológicas das células, refletidas na redução da sua viabilidade (Kielkowska e Adamus, 2018).

Neste contexto, a diminuição da viabilidade dos protoplastos pode ser resultado de diversos fatores como do dano nas membranas plasmáticas durante a digestão e purificação (Watanabe *et al.*, 2002) e do stresse osmótico ou oxidativo durante o isolamento e estabelecimento da cultura (Tiburcio *et al.*, 1986). Estas observações podem explicar a acentuada diferença do rendimento obtido em relação ao número de protoplastos viáveis determinado através do corante Evans blue nos ensaios realizados. Este corante permite obter uma coloração diferencial das células, ou seja, protoplastos viáveis não apresentam coloração enquanto as células mortas se apresentam coradas de azul (Ling *et al.*, 2010).

Diversos dados experimentais têm demonstrado que um aumento rápido e irreversível da permeabilidade das membranas plasmáticas resulta no rebentamento de protoplastos, expulsão de eletrólitos das células e, muitas vezes, morte celular (Nolte *et al.*, 1990; Lung *et al.*, 2012).

Em alguns casos, os protoplastos inicialmente detetados como viáveis perdem a capacidade de regenerar as paredes celulares (regeneração perturbada incompleta) e de se dividirem (Kielkowska e Adamus, 2018), podendo este facto explicar o desaparecimento de alguns aglomerados de células observados nos nossos ensaios durante a contagem. No entanto, Navratilova e colaboradores (2000) observaram que o dano induzido pela cultura poderia ser minimizado pela modificação dos tratamentos enzimáticos ou pela redução do tempo de exposição à solução enzimática. Estes são dois fatores cruciais para a obtenção de protoplastos viáveis quando se trabalha em diversos tecidos de espécies de plantas diferentes (Chamani *et al.*, 2012).

Hahne e colaboradores (1990) provaram que uma elevada densidade dos protoplastos é importante porque influencia o início da divisão celular (Davey *et al.*, 2000). Segundo Davey e colaboradores (2005) a densidade de plaqueamento dos protoplastos desempenha um papel importante tanto na divisão celular como na subsequente formação de colónias. Nos nossos ensaios a densidade de protoplastos foi relativamente elevada e as células evoluíram, por isso a densidade pode realmente ter sido um fator influenciador na evolução positiva dos protoplastos levando à divisão e formação de microcolónias.

A proporção de protoplastos depende, entre outras coisas, do tecido dador de protoplastos, o procedimento de isolamento e manutenção da cultura (Davey *et al.* 2005; Kielkowska e Adamus, 2012). Nesses casos, são usados diferentes suplementos para promover a viabilidade celular e num estudo realizado por Kielkowska e Adamus (2018) em *B. olerácea*, no qual foi testada a presença de PSK- α (phytosulfokine- α), os

resultados mostraram um efeito dose-dependente de PSK na viabilidade celular. A incorporação deste suplemento nas culturas de protoplastos de tamarilho poderá ser um fator a considerar para melhores resultados de viabilidade dos protoplastos em ensaios futuros.

A concentração e o tipo de estabilizador osmótico necessário para um isolamento bem sucedido de protoplastos varia com as espécies de plantas e condições de crescimento (Tahami e Chamani, 2016). 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). Dessa forma, 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), o que pode explicar a solução de 0,45 M de manitol ter demonstrado melhores resultados que a solução W5 – 0,4 M sacarose utilizada como solução de pré-plasmólise no tamarilho, uma vez que também a solução enzimática continha o manitol como estabilizador osmótico.

Outro fator importante para o sucesso da regeneração de protoplastos em plantas é o material de origem para isolamento de protoplastos (Bruznican, *et al.*, 2017). As suspensões de células são muitas vezes uma fonte adequada para o isolamento de protoplastos com boa capacidade de regeneração. De facto, as suspensões celulares mostraram-se muito mais adequadas para a regeneração de protoplastos do que outros tecidos nos casos de *Zea* (Prioli e Sondahl 1989), *Hordeum* (Funatsuki *et al.* 1992), *Oriza* (Jain *et al.* 1995), *Allium* (Buiteveld *et al.* 1998) ou *Musa* (Assani *et al.* 2002).

No trabalho realizado em tamarilho usou-se uma suspensão de células embriogénicas como fonte de protoplastos, da mesma forma que em outros estudos com outras espécies (Guo *et al.*, 2007; Mehpara *et al.*, 2012). Trabalhos anteriores com calo embriogénico e não embriogénico de tamarilho determinaram as condições de crescimento destas células em suspensão celular (Alves, 2012). Uma suspensão celular é considerada uma população de células isoladas, ou em pequenos aglomerados, constituindo uma forma mais conveniente para a extração em grande escala de metabolitos e para estudos a nível celular e molecular (Mustafa *et al.*, 2011). Nestas condições, as células crescem 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).

As suspensões de células têm sido amplamente relatadas como sendo um material de boa fonte para o isolamento bem sucedido de protoplastos em vários dos gêneros de plantas investigados (Masani *et al.*, 2013). Neste contexto Bhojwani e Razdan (1996) demonstraram que para a obtenção de protoplastos não devem ser utilizadas culturas de células em suspensão que se encontrem numa fase estacionária de crescimento, uma vez que tendem a formar agregados celulares densos, cujas células de maiores dimensões possuem uma parede espessa de difícil digestão enzimática.

Quanto à citologia dos protoplastos isolados, no presente estudo foram observadas diferenças no tamanho e estrutura interna das células, resultados que vão de encontro aos observados em outros estudos (Masuda, 1989). Estas diferenças podem ser atribuídas à estrutura complexa de agrupamentos de células em crescimento que incluem uma região meristemática e outras células do parênquima, tendo sido encontrados caracteristicamente em suspensões celulares embriogénicas (Jones, 1974; Vasil e Vasil, 1982).

A fim de sustentar a estrutura e função dos protoplastos, estes são libertados das células através do tratamento com soluções enzimáticas de degradação da parede celular e estabilizadores osmóticos (Zhang *et al.*, 2011). O uso de enzimas de degradação da parede celular tornou possível isolar protoplastos viáveis em grande número para fins experimentais (Duquenne *et al.*, 2007). Neste trabalho, a incubação de protoplastos obtidos a partir de suspensões celulares de *calli* embriogénicos durante duas horas em solução enzimática foi considerada ótima para o isolamento de protoplastos viáveis. Como os protoplastos são frágeis e sensíveis à digestão enzimática, a incubação prolongada na solução da enzima leva à quebra e disfunção do protoplasto, embora o rendimento seja frequentemente alto (Tudses *et al.*, 2014).

4.2. Cultura de protoplastos

Os reguladores de crescimento de plantas, como as auxinas e as citocininas, desempenham um papel central na divisão eficiente de protoplastos. Todavia, as concentrações e combinações destas hormonas precisam de ser otimizadas em cada etapa do desenvolvimento de protoplastos e para cada espécie e tipo celular (Davey *et al.*, 2005).

No caso do tamarilho os resultados indicaram que entre os reguladores de crescimento testados a combinação de 1 mg/l de BAP e 1 mg/l de 2,4-D promoveu a divisão de protoplastos. Este resultado coincide com observações anteriores em que a presença simultânea de auxina e a citocinina em alta concentração eram relativamente eficazes para a divisão celular em protoplastos de petúnia (Oh e Kim, 1994) e em protoplastos de uma suspensão celular de *Allium cepa* (Karim e Adachi, 1997). Em estudos realizados com protoplastos isolados de rosa, a combinação de NAA e BAP mostrou ser mais eficiente para a regeneração de microcalos (Marchant *et al.*, 1997).

Jin Cui e colaboradores (2019), concluíram que uma menor concentração de NAA teve um efeito positivo na formação de calos em *Kalanchoe blossfeldiana*, o que comprova os resultados positivos deste trabalho observados em culturas de protoplastos com meio B5 suplementado com 1 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de 2,4-D e 1mg/L de NAA, que levaram à formação de massas celulares visíveis em comparação com os meios suplementados com 3 mg/L NAA que não mostram qualquer evolução no seu comportamento.

Quanto às concentrações utilizadas nos ensaios realizados neste trabalho, no meio de cultura inicial, uma quantidade igual de BAP e NAA na presença de uma baixa quantidade de 2,4-D foi favorável. Dietert *et al.* (1982) também registaram um melhor crescimento de calos na presença de uma baixa concentração de 2,4-D. No entanto, segundo Glimelius (1984) e Kohlenbach *et al.* (1982), uma quantidade elevada de 2,4-D é essencial para a divisão celular e proliferação de calos. De acordo com os resultados obtidos para o tamarilho, esta última opinião não foi evidente, podendo estar possivelmente ligado ao nível endógeno de auxinas no material vegetal usado.

Segundo estudos realizados por Arturo *et al.* (2016), a combinação BAP e 2,4-D levou a uma melhor proliferação celular em *Rubus glaucus*. No presente estudo, a esta combinação adicionamos também o NAA. Logo, apesar de termos obtido resultados favoráveis na presença destes dois reguladores não foi testado o comportamento das células apenas na presença destes dois, sem o NAA.

Como resultado de diversos estudos, comprovou-se que diferentes concentrações de 2,4-D resultam em aspectos diferentes das células, ou seja, células expostas a altas concentrações de 2,4-D permanecem pequenas com citoplasma denso e podem-se transformar em aglomerados de células pro-embriogênicas, enquanto protoplastos cultivados em baixa concentração de auxina alongam-se e subsequentemente morrem ou formam colônias de células indiferenciadas (Domoki *et*

al., 2006). No nosso estudo, uma baixa concentração de 2,4-D permitiu a agregação das células formando microcolônias.

De acordo com Bridgen (2018), a concentração do estabilizador osmótico deve ser gradualmente diminuída e os *calli* formados são geralmente transferidos para meios semi-sólidos ou sólidos. Este meio deve ser complementado com reguladores de crescimento, proporcionando um equilíbrio de auxina/citocinina, o que vai de encontro ao protocolo utilizado nos ensaios.

Neste estudo, o aumento no volume celular, bem como a alteração da disposição dos cloroplastos precederam a divisão celular, como foi observado em protoplastos de *Nicotiana tabacum* (Nagata e Takebe, 1970). Para além deste rearranjo das células os cloroplastos também se tornaram menos distintos e eram difíceis de distinguir após várias divisões celulares. Um comportamento similar de cloroplastos foi relatado nas células de mesófilo ativamente divididas de *Macleaya* cultivadas *in vitro* (Kohlenbach, 1966). George (2008) verificou que os cloroplastos nos protoplastos derivados do mesófilo foliar perdem a sua integridade e desaparecem à medida que a formação do *microcallus* prossegue.

Os resultados da cultura de protoplastos em tamarilho mostraram que, após uma semana de cultura, praticamente todos os protoplastos sobreviventes sofreram divisão e alguns desenvolveram-se em pequenas colônias. No entanto, alguns dos protoplastos inicialmente vivos tinham colapsado sem sofrer divisão celular, resultados estes que vão de encontro aos obtidos em estudos de protoplastos de *Nicotiana tabacum* (Nagata, 1971).

Em muitos dos meios testados nos nossos ensaios as células não se conseguiram adaptar e não foram observadas evoluções. Trabalhos realizados por Arturo *et al.* (2016) em *Rubus glaucus*, mostraram que o ácido giberélico na concentração de 0,5 ppm permite uma adaptação celular no meio de cultura líquido. No nosso estudo a adição de ácido giberélico não foi testada, no entanto pelos resultados positivos obtidos noutras pesquisas poderá ser algo a otimizar em abordagens futuras, de forma a garantir a adaptação das células ao meio e as divisões celulares.

Tanto as divisões mitóticas como a rapidez na síntese da parede celular nas fases iniciais da cultura são cruciais para o desenvolvimento bem sucedido de sistemas de recuperação de “protoplastos para plantas” (Davey *et al.*, 2000). A divisão dos protoplastos foi bastante frequente em meio líquido, semelhante ao relatado em outros estudos (Tahami *et al.*, 2014).

Neste estudo, foram testados dois meios base com uma combinação de 2,4-D, NAA e BAP, a partir da qual se obtiveram divisões celulares, no entanto o eficiente sistema de regeneração de plantas a partir de culturas embriogênicas de suspensão de *Curcuma longa* foi estabelecido pelo tratamento combinacional de TDZ (Thidiazuron) e BAP (Jie, 2019).

Ali e colaboradores (2018) obtiveram protoplastos em divisão em meio MS líquido suplementado com NAA e BAP, o que coincide com os nossos resultados. Isto pode reforçar a forte influência destes dois reguladores de crescimento na divisão celular. Nesse estudo, após a divisão dos protoplastos, os agregados celulares foram transferidos para meio suplementado com 2,4-D, onde obtiveram a formação de microcolônias e calos (Ali *et al.*, 2018), o que não vai de encontro aos resultados obtidos no nosso ensaio. No entanto não foi testado o meio apenas com 2,4-D mas sim a combinação dos três reguladores, o que pode justificar a ausência da formação de calos.

O uso de agentes gelificantes para a cultura de protoplastos previne a agregação celular, estabiliza as membranas e reduz a difusão dos precursores da parede fora dos protoplastos (Shillito *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1988; Eeckhaut *et al.*, 2013).

Em vários estudos foi provado que o escurecimento das células ocorre com maior frequência em meios solidificados em agarose do que em meio líquido, o que coincide com os nossos resultados. Este escurecimento é provavelmente causado pela oxidação de compostos fenólicos, que são libertados de células vegetais cultivadas no meio (Saxena e Gill, 1986). Esta oxidação provoca danos severos às células levando à interrupção do seu crescimento e inibição da divisão de outros protoplastos saudáveis que se encontram nas proximidades. No entanto, em meio líquido, a acumulação desses compostos tóxicos pode ser diluída (Duquenne *et al.*, 2007), mostrando assim menos escurecimento (Tahami *et al.*, 2014). Esta explicação pode justificar a evolução positiva dos protoplastos cultivados em meio líquido e o insucesso das culturas de protoplastos em *droplets*.

5. Conclusão e perspectivas futuras



A obtenção de protoplastos tem vindo a dar um contributo assinalável para a cultura de células vegetais e como tal pode ser considerada como uma ferramenta importante para o melhoramento do tamarilho, na medida em que constituem um passo prévio a várias técnicas de manipulação genética, nomeadamente hibridação somática (por fusão de protoplastos) e transformação genética.

A realização deste trabalho permitiu otimizar um protocolo para o isolamento e purificação de protoplastos de tamarilho a partir de diferentes explantes. Através da comparação entre todos os tratamentos aplicados aos explantes foliares, definiu-se como tratamento mais eficiente o que envolveu: i) solução pré-plasmólise de 0,45 M de manitol; ii) incubação em solução pré-plasmólise 20 min a 27 °C e 30 rpm, no escuro; iii) isolamento de protoplastos em solução enzimática constituída por celulase a 2 % (w/v) e macerozima a 0,5 % (p/v), em solução tampão que contém 0,45 M manitol, 20 mM MES – KOH, 20 mM KCl, 0,1 % (p/v) BSA e 10 mM CaCl₂ (a pH 5,7); iv) centrifugação por gradiente de densidade a 145 g durante 10 minutos, com obtenção de protoplastos em banda interfásica acima de uma camada de 0,5 M de sacarose. Este procedimento permitiu obter rendimentos de $7,75 \pm 6,74 \times 10^5$ protoplastos/g PF.

Para protoplastos isolados e purificados a partir de suspensões celulares de *calli* embriogénicos definiu-se igualmente o procedimento mais eficiente tendo em conta os rendimentos mais elevados obtidos ($6,692 \pm 4,2110 \times 10^5$ protoplastos / g PF) e envolveu: i) digestão enzimática em solução enzimática constituída por celulase a 1 % (p/v), driselase a 0,4 % (p/v) e pectinase a 0,04 % (p/v), em solução tampão (a pH 5,7); ii) incubação enzimática de 2 horas a 27 °C e 30 rpm, no escuro e iii) purificação dos protoplastos por centrifugação a 100 g durante 10 minutos, seguida de outra centrifugação a 100 g, 5 minutos, com obtenção dos protoplastos em *pellet*.

O meio de cultura líquido mostrou ser mais eficiente do que o meio semi-sólido (agarose), tanto em protoplastos isolados a partir de explantes foliares como obtidos a partir de suspensões celulares de *calli* embriogénicos. Em protoplastos obtidos a partir de explantes foliares de tamarilho o meio B5 líquido que incluiu a combinação de 1 mg/l de NAA, 1 mg/l de BAP e 0,1 mg/l de 2,4-D foi o que proporcionou uma maior evolução das células e estimulou a regeneração da parede celular, a divisão celular, formação de microcolónias e o aparecimento de massas celulares visíveis ao fim de 1 mês de cultura.

Apesar dos resultados obtidos terem sido bastante positivos neste estudo não foi ainda possível estabelecer um protocolo eficiente de cultura de protoplastos com vista à regeneração de plantas de tamarilho, uma vez que as condições necessárias para a cultura dos protoplastos isolados carecem ainda de investigação futura. No entanto, conseguimos a concretização de 3 dos objetivos definidos: i) o isolamento e purificação de protoplastos viáveis; ii) a indução da regeneração da parede celular e iii) a estimulação da divisão celular.

Em trabalhos futuros seria importante testar novos meios de cultura com diferentes reguladores de crescimento e concentrações testados em outros estudos como é o caso do ácido giberélico e o TDZ.

Do ponto de vista do melhoramento de *S. betaceum*, a obtenção de protoplastos provenientes de plantas de diferentes genótipos 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 importante aplicação em análises moleculares e na regeneração de transformantes.

6. Referências bibliográficas



- Acosta-Quezada P.G., Martínez-Laborde J.B., Prohens J. (2011) Variation among tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: implications for conservation of genetic resources and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 943-960.
- Alam M.F., Mondol P.C., Roy S.K., Anisuzzaman M., Parvez S., Ray S.K., Mahzabin F., Tanny T., Alam I. (2019) Determination of apposite plant regeneration protocol for several cucurbits through direct and indirect organogenesis. *Horticultural Biotechnology Research* 5: 4-12.
- Alves A. (2012) Ensaio de embriogênese somática e transformação genética em tamarilho (*Cyphomandra betacea* [Cav.] Sendt.). Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Alves C.S., Vicentini, R., Duarte G.T., Pinoti V.F., Vincentz M., Nogueira F.T. (2017) Genome-wide identification and characterization of tRNA-derived RNA fragments in land plants. *Plant Molecular Biology* 93: 35-48.
- Arturo R.D., Andrea A., Pedro R., Bryan R., Gooty J.M. (2016) Obtaining protoplasts from leaf tissue plantlets of *Rubus glaucus* Benth (Blackberry) to develop proembryos. *Indian J Sci Technol* 9: 1-8.
- Assani A., Haicour R., Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Bakry F., Côte F. X., Grapin A. (2002) Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Science* 162: 355-362.
- Atkinson R.G., Gardner R.C. (1993) Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell Reports* 12: 347-351.
- Augusto D. (2015) Optimização dos processos de isolamento e cultura de protoplastos de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.) 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: 1-10.
- Ayeleso T.B. (2015) Protoplast isolation and plant regeneration in *Bambusa groundnut*: a platform for transient gene expression. Doctoral dissertation, Cape Peninsula University of Technology.

- Azad M.K. (2012) Plant regeneration through callus-derived protoplasts of *Phellodendron amurense*. Rupr. BTAIJ 6: 317-326.
- Azurduy S. (2009) The wild relatives of tree tomato (*Cyphomandra betacea*) in Bolivia: distribution, ecology and uses. Crop Wild Relative, pp. 19.
- Barceló M., Wallin A., Medina J. J., Gil-Ariza D.J., López-Casado G., Juarez J., Pliego Alfaro F. (2019) Isolation and culture of strawberry protoplasts and field evaluation of regenerated plants. Scientia Horticulturae 256: 108552.
Doi: 10.1016/j.scienta.2019.108552.
- Barghchi M. (1986) *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand, pp. 52.
- Bhojwani S.S., Dantu P.K. (2013) Plant Cell Tissue & Organ Culture: An Introductory Text. Springer, New Delhi.
- Bhojwani S.S., Razdan M.K. (Eds.) (1996) Plant Cell Tissue & Organ Culture: Theory and Practice. The Netherlands: Elsevier, 337-372.
- Bohs L. (1989) Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). Economic Botany 43: 143-163.
- Bois D. (1927) Les plantes alimentaires, vol I. Paris, Ed. Paul Lechevalier.
- Borlaug, N. E., Dowsell, C. R. (2003). Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. In: R. Tuberosa, R. L. Phillips, M. Gale (Eds.), Proceedings of the International Congress "In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution", Bolonha, pp. 3-23.
- Bridgen M. P., Van Houtven W., Eeckhaut T. (2018) Plant Cell Tissue & Organ Culture: Techniques for Breeding. Ornamental Crop, 1: 127-144.
- Bruznican S., Eeckhaut T., Van Huylenbroeck J., De Clercq H., Geelen D. (2017) Regeneration of cell suspension derived *Apium graveolens* L. protoplasts. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 131: 163-174.

- Buckeridge M.S., Santos W.D., Souza A.P. (2010) As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: LAB Cortez. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. Editora Blucher, São Paulo, pp. 365-380.
- Buiteveld J., Suo Y., Campagne M.M.V., Creemers-Molenaar J. (1998) Production and characterization of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). Theor Appl Genet 96: 765–775.
- 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, Dordrecht, Springer, pp. 379-389.
- Canhoto JM, Correia SI, Marques CI (2009) Factors affecting somatic embryogenesis induction and development in *Feijoa sellowiana* Berg. Acta Hort 839: 147-156.
- Canhoto J.M. (2010) Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Chamani E., Tahami S.K., Nasser Z.A.R.E., Asghari-Zakaria R., Mohebodini M., Joyce D. (2012). Effect of Different Cellulase and Pectinase Enzyme Treatments on Protoplast Isolation and Viability in *Lilium ledebeourii* Bioss. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40: 123-128.
- Chawla H.S. (2010) Introduction to Plant Biotechnology (3rd Ed.). Enfield: Science Publishers.
- Chen W.H., Davey M.R., Power J.B., Cocking E.C. (1988) Sugarcane protoplasts: factors affecting division and plant regeneration. Plant Cell Reports 7: 344–347.
- Chrispeels M.J., Gepts P. (2018) Plant, Genes and Agriculture – Sustainability through Biotechnology. Sinauer Associates, New York.
- Choury Z., Meschini R., Dell’Orso A., Fardusi M.J., Mugnozza G.S., Kuzminsky E. (2017) Optimized conditions for the isolation of mesophyll protoplasts along the growing season from *Arbutus unedo* and their use in single cell gel electrophoresis. Plant Cell Tissue & Organ Culture 132: 535-543.

- Chupeau M.C., Lemoine M., Chupeau Y. (1993) Requirement of thidiazuron for healthy protoplast development to efficient tree regeneration of a hybrid poplar (*Populus tremula* × *Populus alba*). *Plant Physiology* 141: 601–609.
- Chupeau M.C., Granier F., Pichon O., Renou J.P., Gaudin V., Chupeau, Y. (2013). Characterization of the early events leading to totipotency in an *Arabidopsis* protoplast liquid culture by temporal transcript profiling. *Plant Cell* 25: 2444-2463.
- Cocking E.C. (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 927-929.
- Cohen D., Elliot D. (1979) Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Combined Proceedings, International Plant Propagators Society* 29: 177-179.
- 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. (2011) Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra.
- 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.
- 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., Canhoto J. M. (2016) Somatic mbryogenesis of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). In: MA Grmanà and M Lambardi (Eds.) *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Springer, New York, pp. 171-179.
- Correia S.I., Canhoto J.M. (2018). Somatic Embryogenesis of Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). In *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody*. Cham Plants, Springer, pp. 171-179.

- Correia S.I., Alinho A.T., Casimiro B., Miguel C.M., Oliveira M.M., Veríssimo P., Canhoto J.M. (2019) NEP-TC a rRNA Methyltransferase Involved on Somatic Embryogenesis of Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Frontiers in Plant Science* 10: 438. doi: 10.3389/fpls.2019.00438
- Cosgrove D.J. (2015) Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *Journal of Experimental Botany* 67: 463-476.
- Costa M.A.P.C., Mourao Filho F.A.A., Mendes B.M.J. (2002) Isolamento e eficiência de plaqueamento de protoplastos de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 472-476.
- Cui J., Mackenzie K. K., Eeckhaut T., Müller R., Lütken H. (2019) Protoplast isolation and culture from *Kalanchoë* species: optimization of plant growth regulator concentration for efficient *callus* production. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 138: 287-297.
- Cunha A. (2001) Ontogénese lipídica associada à embriogénese somática e ao crescimento de culturas *in vitro* de linho (*Linum usitatissimum* L.). Tese de Doutorado. Universidade do Minho.
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23: 131-171.
- Davey M.R., Power J.B., Lowe K.C. (2000) Plant protoplasts. In: John Wiley and Sons. *Encyclopaedia of cell technology*. Ed. Spier R.E. New York, USA, pp. 1034-1042.
- Dietert M.F., Barron S.A., Yoder O.C. (1982) Effects of genotype on *in vitro* culture in the genus *Brassica*. *Plant Science Letters* 26: 233–240.
- Domoki M., Gyorgyey J., Biro J. (2006) Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf protoplast-derived alfalfa cells. *Biochim Biophys Acta* 1759: 543–551.
- Dovzhenko A., Koop H.U. (2003) Sugarbeet (*Beta vulgaris* L): shoot regeneration from *callus* and *callus* protoplasts. *Planta* 217: 374-381.

- Duquenne B., Eeckhaut T., Werbrouck S., Huylenbroeck J.V. (2007) Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 91: 165–173.
- 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., Verherbruggen 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*. Humana Press. Springer, New York pp. 453-46.
- Farinas C.S. (2011) A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. *Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Fehér A. (2019). *Callus*, dedifferentiation, totipotency, somatic Embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science* 10: 536. Doi: 10.3389/fpls.2019.00536.
- 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: 115-127.
- Franklin C.I., Dixon R.A. (1994) Initiation and maintenance of *callus* and cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue & Organ Culture – a practical approach*, 2nd ed. IRL Press, Oxford, pp. 1-25.
- Funatsuki H., Lorz H., Lazzeri P.A. (1992) Use of feeder cells to improve barley protoplast culture and regeneration. *Plant Science* 85: 179–187.
- 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., Hall M. A., De Klerk G. J. (2008). *Plant tissue culture procedure-background*. *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht. 1: 1-28.
- Giri C.C., Giri A. (Eds.) (2007) *Plant Biotechnology: Practical Manual*. New Delhi: I K International Publishing House Pvt. pp. 27-38

- Glimelius K. (1984) High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiologia Plantarum* 61: 38–44.
- 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. *Journal of Visualized Experiments*, 68: 4214.
- 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.). *Trees IV. Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer – Trees IV, pp. 120-137.
- Guo Y., Bai J., Zhang Z. (2007) Plant regeneration from embryogenic suspension-derived protoplasts of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 89: 151–157.
- Hahne B., Lorz H., Hahne G. (1990) Oat mesophyll protoplasts: Their response to various feeder cultures. *Plant Cell Reports* 8: 590–593.
- Heiser C, Anderson G (1999) "New" solanums. In: *Perspectives on new crops and new uses*. J. Janick (ed.), *Perspectives on new crops and new uses* pp. 379–384.
- 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* Humana Press. Springer Protocols, New York, pp.112.
- Hooker J.D. (1899) *Cyphomandra betacea*. *Curti's Bot Mag* 55: 7682.
- Hurtado N.H., Morales A.L., González Miret M.L., Escudero Gilete M.L., Heredia F.J. (2009) Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry* 117: 88-93.
- Jain R.K., Khehra G.S., Lee S.H., Blackball N.W., Marchant R., Davey M.R., Gosal S.S. (1995) An improved procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts. *Plant Cell Reports* 14: 515-519.

- Jie E.Y., Ahn M.S., Lee J., Cheon Y.I., Kim C.Y., Kim S.W. (2019) Establishment of a high-frequency plant regeneration system from rhizome-derived embryogenic cell-suspension cultures of *Curcuma longa* L. *Plant Biotechnology Reports* 13: 123-129.
- Jones L.H. (1974) Factors influencing embryogenesis in carrot cultures (*Daucus carota* L.). *Ann. Bot.* 38: 1077-1088.
- Karim M. A., Adachi T. (1997) Cell Suspension, Isolation and Culture of Protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 51: 43-47.
- Kärkönen A., Santanen A., Kuninori I., Fukuda H. (2011) The Plant Cell Wall: Methods and Protocols. In: Z.A. Popper (Ed.). *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. Humana Press, New York, Springer Protocols, pp.1-20.
- Kielkowska A., Adamus A. (2012) An alginate-layer technique for culture of *Brassica oleracea* L. protoplasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 48: 265–273.
- Kielkowska A., Adamus A. (2018) Peptide growth factor phytosulfokine- α stimulates cell divisions and enhances regeneration from *B. oleracea* var. *capitata* L. protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation* 86: 1-14.
- 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.
- Kohlenbach H.W. (1966) Die Entwicklungspotenzen explantierter und isolierter Dauerzellen. I. Das Streckungs- und Teilungswachstum isolierter Mesophyllzellen von *Macleaya cordata*. *Z. Plant Physiology* 55: 142-157.
- Kohlenbach H.W., Wenzel G., Hoffmann F. (1982) Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures from isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts. *Plant Physiology* 105: 131-142.
- Kou M.C., Yen, J.H., Hong, J.T., Wang, C.L., Lin, C.W., Wu, M.J. (2009) Cyphomandra betacea Sendt. phenolics protect Ldl from oxidation and Pc12 cells from oxidative stress. *LWT - Food Science and Technology* 42: 458-463.

- 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: 4-32.
- Ling A.K., Phua G.T., Tee C.S., Hussein S. (2010) Optimization of protoplast isolation protocols from *callus* of *Eurycoma longifolia*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 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*. Springer, Dordrecht 77: 553-566
- Lopes ML, Ferreira MR, Carloto JM, Cruz GS, Canhoto JM (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton (Eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Springer, Dordrecht, 6: 433-455.
- Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (Eds.) (2006) *Plant Cell Tissue & Organ Culture Protocols*. 2nd Ed. New Jersey: Humana Press pp 3-8.
- Lung S.C., Yanagisawa M., Chuong S.D.X. (2012) Isolation of dimorphic chloroplasts from the single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. *Plant Methods* 8: 8.
- Maćkowska K., Jarosz A., Grzebelus E. (2014) Plant regeneration from leaf-derived protoplasts within the *Daucus* genus: effect of different conditions in alginate embedding and phytosulfokine application. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 117: 241-252.
- Marchant R., Davey M.R., Power J.B. (1997) Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts from *Rosa hybrida*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 50: 131–134.
- Masani M.Y.A., Noll G., Parveez G.K.A., Sambanthamurthia R., Prufer D. (2013) Regeneration of viable oil palm plants from protoplasts by optimizing media components, growth regulators and cultivation procedures. *Plant Science* 210: 118–127.
- Masuda K., Kudo-Shiratori A., Inoue M. (1989) Callus formation and plant regeneration from rice protoplasts purified by density gradient centrifugation. *Plant Science* 62: 237-246.

- McCane J., Widdowson D.A. (1992) Fruit and nut (Suppl. To the composition of foods.) 5th Ed. London, Holland, Unwin, Buss, pp. 74 -77.
- Meadows L.R. (2002) Growing tamarillo relatives. In: The New Zealand Home Garden. www.naturalhub.com., aceso a 12/02/2019.
- Mehpara M., Mujib A., Dipti T., Abidin M.Z. (2012) Protoplast isolation, culture and plant regeneration in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don via somatic embryogenesis. *Current Biotech* 1: 217–222.
- Menczel L., Nagy F., Kiss Z.R., Maliga P. (1981) Streptomycin Resistant and Sensitive Somatic Hybrids of *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana glauca*: 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* 100: 1686-1690.
- Morgan E.R. (1999) *Callus* production from protoplasts of *Cyclamen persicum*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 55: 63–65.
- Morton J.F., Dowling, C.F. (1987) Roselle. In: *Fruits of warm climates*. J.F. Morton (Eds), Miami, pp. 379–384.
- Mota-Narváez L.A., Herrera-Cool G.E., del Rosario Ayora-Talavera T., Santana-Buzzy N., López-Puc G. (2018) Isolation and regeneration of protoplasts from leaf explants of *Rhynchospora digbyana*. *African Journal of Biotechnology* 17: 1082-1089.
- Moura T. L., Almeida, W.A., Mendes, B. M., Filho, F.A. (2001) Organogênese in vitro de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23: 240-245.
- Mukhtar I., Bajwa R., Nasim G. (2012) Isolation of Mesophyll Protoplasts from Leaves of *Dalbergia sissoo* Roxb. *J Appl Sci Environ Manage* 16:11–15.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 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: 715-42.
- Nagata T., Takebe I. (1970) Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92: 301-308.
- Nagata T., Takebe I. (1971) Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12-20.
- Navratilova B. (2004) Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae. *Hort Sci* 31: 140-157.
- Navratilova B., Rokytova L., Lebeda A. (2000) Isolation of mesophyll protoplasts of *Cucumis* spp. and *Cucurbita* spp. *Acta Hort.* 510: 425–431.
- Nolte K.D., Nothnagel E.A., Coggins C.W. Jr (1990) Electrolyte leakage and protoplasm viability of *Pummelo* mesocarp tissue as influenced by exogenous GA₃. *J Am Soc Hortic Sci* 115: 592–597.
- 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.
- Oh M.H., Kim S.G. (1994) Plant Regeneration from Petal Protoplast Culture of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 36: 275-283.
- Pais M.S. (2003) Biotecnologia vegetal. In: Lima N., Mota M. (Eds.). *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas, Lda, pp. 402-427.
- Papadakis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (2002) Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiology* 40: 549–559.
- Papadakis A.K., Simis C.I., Roubelakis-Angelakis K.A. (2001) Reduced activity of antioxidante machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiology* 126: 434–444.
- Park Y.S. (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment consideration. *Ann For Sci* 59: 651-656.

- Pati P.K., Sharma M., Ahuja P.S. (2008) Rose protoplast isolation and culture and heterokaryon selection by immobilization in extra thin alginate film. *Protoplasma*, 233: 165-171.
- 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: 193-200.
- Popenoe H.L., King S.R., León J., Kalinowski L.S., Vietmeyer N.D. (1989) *Lost Crops of the Incas: Little-known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*, the National Academy Press, Washington, D.C.
- Potrykus I., Shillito R.D. (1986) Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymol.* 118: 549–578.
- Prioli L.M., Sondahl M.R. (1989) Plant-regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). *Nat Biotechnol* 7: 589–594.
- Prohens J., Nuez F. (2000) The Tamarillo (*Cyphomandra betacea*): A review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review* 1: 43-68.
- Prohens J., Rodriguez-Burruezo A., Nuez F. (2004) Breeding Andean Solenaceae Fruit Crops for adaptations to subtropical climates. *Acta Hort* 662: 129-127.
- Rahmani M.S., Pijut P.M., Shabanian N. (2016) Protoplast isolation and genetically true-to-type plant regeneration from leaf- and callus-derived protoplasts of *Albizia julibrissin*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 127: 475–488.
- Rao S., Prakash A.H. (1995) A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Biosciences* 20: 645-655.
- 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 & Organ Culture* 122: 585-604.
- Rose R.J., Mantiri F.R., Kurdyukov S., Chen S.K., Wang X.D., Nolan K.E., Sheahan M.B. (2010) Developmental biology of somatic embryogenesis. In: Pua, Eng Chong, Davey, Michael R. (Eds.) *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*, Springer, Berlin, Heidelberg pp. 3-26.

- Saxena P.K., Gill R. (1986) Removal of Browning and Growth Enhancement by Polyvinylpyrrolidone in Protoplast Cultures of *Cyamopsis tetragonoloba* L. *Biologia Plantarum* 28: 313–315.
- Schotsmans W.C., East A., Woolf A. (2011) Tamarillo (*Solanum betaceum* (Cav.)). In: Yahia, E. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Woodhead Publishing, Oxford, pp. 427–441.
- Sheen J. (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* 127: 1466-1475.
- Shiba T., Mii M. (2005) Plant regeneration from mesophyll-and cell suspension-derived protoplasts of *Dianthus acicularis* and characterization of regenerated plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41: 794.
- Shillito D., Paszkowski J., Potrykus I., (1983) Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Reports* 2: 244–247.
- Smith M.A.L., McCown B.H. (1983) A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. *Plant Science Letters* 28: 149-156.
- Solis Ramos L.Y., Andrade-Torres A., Carbonell L., Salín C.M., Castaño de la Serna E. (2012) Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. In: Ken-Ichi S (ed) *Embryogenesis*. InTech, Rijeka, 25: 597–618.
- Tahami S. K., Chamani E. (2016) Efficient Protocol for Protoplast Isolation and Plant Regeneration of *Fritillaria imperialis*. *Journal of Agricultural Science and Technology* 8: 467-482
- Tahami S.K., Chamani E., Zare N. (2014) Plant Regeneration from Protoplasts of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss. *Journal of Agricultural Science and Technology* 16:1133-114.
- Taiz L., Zeiger E., Møller I. M., Murphy A. (2015) *Plant physiology and development*. 6th Edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates, pp. 67-86.
- Thorpe T. (1980) Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. *International Review of Cytology* 11: 71-111.

- Tiburcio A.F., Kaur-Sawhney R., Galston A.W. (1986) Polyamine Metabolism and osmotic stress - relation to protoplast viability. *Plant Physiology* 82: 369-374.
- Tomar U.K., Dantu P.K. (2009) Protoplast Culture and Somatic Hybridization. In: G. Tripathi (Ed.). *Cellular and Biochemical Science*. New Delhi: I K Int. Publishing House Pvt.,1: 876-891.
- 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.
- Tonon G., Capuana M., Di Marco A. (2001) Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. *Scientia Horticulturae* 87: 291-301.
- Tripathi G. (2010). *Cellular and Biochemical Science*. IK International Pvt Ltd, pp. 876–91.
- Tudses N., Premjet S., Premjet D. (2014) Optimal conditions for high-yield protoplast isolations of *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* L. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci* 14: 221-230.
- 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: 50-56.
- Upadhya B., Taffet G.E., Cheng C.P., Kitzman D.W. (2015) Heart failure with preserved ejection fraction in the elderly: scope of the problem. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 83: 73-87.
- Vasil V., Vasil I.K (1982) Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, Gramineae). *Amer J Bot* 69: 1441 - 1449.
- Von Arnold S. (2008) Somatic embryogenesis. In: George E.F., De Klerk G.J. (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, The Netherlands, pp 335–354.
- Von Klercker J. (1892). A method for isolating living protoplasts. *Ofvers Vetensk. Akad. Forh. Stockholm* 49: 463.

- Von Röpenack E., Parr A., Schulze-Lefert P. (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *Biol Chem* 273: 9013–9022.
- Watanabe M., Setoguchi D., Uehara K., Ohtsuka W., Watanabe Y. (2002) Apoptosis-like cell death of *Brassica napus* leaf protoplasts. *New Phytol* 156: 417–426.
- 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.
- Yang X., Zhang X. (2010) Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29: 36-57.
- 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.
- 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: 5137-5142.
- Zimmerman J.L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.