

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora coccinea* Aubl.) A PARTIR DE PROTOPLASTOS DERIVADOS DE MESÓFILO¹

Wagner Campos Otoni²
Vicente Wagner Dias Casali³
Paulo Roberto Cecon⁴
Michael Raymond Davey⁵
John Brian Power⁵

1. INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* é constituída de 12 gêneros e acha-se largamente distribuída nos trópicos, incluindo mais de 580 espécies, das quais a grande maioria pertence ao gênero *Passiflora* e habita a América Tropical, sendo predominantemente nativa do Brasil (5, 13, 14). O gênero *Passiflora* abriga espécies que são conhecidas com o nome de maracujá, fruta que ultimamente é de grande importância econômica.

Passiflora coccinea Aubl. é encontrada na forma selvagem na Venezuela, bacia Amazônica do Peru, Bolívia e Brasil, recebendo, neste último, o nome vulgar de "tomé-açú". A espécie pertence ao subgênero *Distephana*, possuindo algumas sinonímias como *P. fulgens*, *P. toxicaria* e *P. velutina* (4, 17).

Considerando a ampla variabilidade genética na família *Passifloraceae*, a regeneração de plantas a partir de protoplastos de outras espécies do gênero *Passiflora* abrirá novas perspectivas de hibridação, especialmente naqueles casos em que os processos sexuais são falhos, contribuindo, dessa forma, pela

¹ Aceito para publicação em 01.09.1994.

² Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

³ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

⁴ Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa.

⁵ Life Science Department, University of Nottingham. Nottingham NG7 2RD, U.K.

fusão de protoplastos, para a obtenção de combinações híbridas destinadas a porta-enxertos ou a variedades-copa.

O presente trabalho descreve o isolamento e a regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de mesófilo de *Passiflora coccinea* Aubl.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento de Protoplastos

Folhas novas recém-expandidas de maracujazeiro, obtidas de plântulas crescidas em casa de vegetação, com 45 a 60 dias de germinação e previamente à emissão de gavinhas, foram utilizadas como fonte de tecidos para o isolamento de protoplastos. O processo de desinfestação das mesmas constituiu-se da imersão, por 10 minutos, em solução de "Domestos" (Lever Bros, Kingston-upon-Thames, U.K.), a 5% (v/v), seguida de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.

Após o tratamento para desinfestação, as margens, bem como as nervuras centrais das folhas, foram removidas de forma que as lâminas foliares remanescentes fossem seccionadas, transversalmente, em tiras de 1 a 2 mm, que, imediatamente, foram transferidas para placas de Petri (Sterilin, Hownslow, U.K.) de 9,0 cm de diâmetro, contendo 15 ml de meio CPW 13M (16), composto dos sais do meio CPW e manitol a 13% (p/v). Os tecidos foram mantidos em pré-plasmólise, durante 60 minutos, e, em seguida, descartado o meio CPW 13M, sendo então adicionados 15 ml de mistura enzimática, a saber: ENZ 1, constituída de Celulase R-10 (Yakult Honsha Co. R10 Ltd., Japan), a 1,0% (p/v); Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co. Ltd., Japan), a 0,2% (p/v); Driselase (Kyowa Hakko Kogyo Co., Japan), a 0,1% (p/v); ENZ 2, composta de Celulisina (Calbiochem., USA), a 2,0% (p/v); Hemicelulase (Sigma Chemical Co., USA), a 2,0% (p/v); e Pectoliase Y-23 (Seishim Pharmaceutical Co. Ltd., Japan), a 0,2% (p/v); ENZ 3, composta de Celulisina, a 1,0% (p/v); Hemicelulase, a 2,0% (p/v); Pectoliase Y-23, a 0,2% (p/v); e Driselase, a 0,1% (p/v).

Todas as misturas de enzimas foram acrescidas de 5,0 mM de tampão MES (Sigma Chemical Co., USA), PVP-10 (Sigma Chemical Co., USA), a 1% (p/v), e Cefotaxima (Claforan, Roussel Lab., Uxbridge, U.K.), a 250 mg.l⁻¹. As misturas enzimáticas foram preparadas pela diluição com o meio CPW 13M, sendo o pH corrigido para 5,6; a esterilização deu-se por filtro-esterilização e alíquotas de 15 ml foram armazenadas a -20°C. A digestão enzimática dos tecidos deu-se com a incubação durante 12 a 14 horas, no escuro, sob agitação orbital de 40 rpm e à temperatura de 26 ± 2°C. Após a fase de incubação, os tecidos em suspensão foram passados através de

uma peneira plástica e estéril, com malha de náilon de 64 μm , disposta sobre uma placa de Petri de 9,0 cm, sendo o filtrado coletado, por pipetagem, utilizando pipetas Pasteur e transferido para tubos de centrífuga de 16 ml de capacidade. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 800 rpm, durante cinco minutos, por três vezes consecutivas, sendo o sobrenadante descartado após cada etapa e o precipitado ressuspendido em, aproximadamente, 15 ml de meio CPW 13M. Após a terceira etapa de centrifugação, avaliaram-se a viabilidade e o rendimento dos protoplastos isolados. A viabilidade dos protoplastos foi determinada pela utilização de uma solução-estoque de diacetato de fluoresceína (Sigma Chemical Co., USA), de $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$, em acetona, segundo descrito por Larkin (9).

2.2. Cultivo de Protoplastos e Regeneração de Plantas

A densidade de plaqueamento de protoplastos utilizada foi de $1,5 \times 10^5$ protoplastos. ml^{-1} , em meio KM8p (8). Os métodos de cultivo empregados foram gotas ou camadas de agarose "SeaPlaque" (FMC, Rockland, USA), a 0,6% (p/v), sendo os protoplastos cultivados em placas de Petri (Sterilin, Hownslow, U.K.) de 5,5 cm, em ausência de luz, e à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 28 a 30 dias, até que as microcolônias atingissem a fase de calos de 1 a 2 mm de diâmetro. Foi adotada a redução da pressão osmótica do meio mediante a substituição, a intervalos de 5 dias, do meio KM8p pelo KM8 (7), as razões de volumes KM8p:KM8 (ml) de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 0:1, segundo adotado por DORNELAS e VIEIRA (1), d'UTRA VAZ (2), d'UTRA VAZ *et alii* (3), GILMOUR *et alii* (6) e MANDERS (10).

Na fase de enverdecimento, no final de 28 a 30 dias de cultivo, pequenos calos (2 a 3 mm) foram transferidos para o meio MS (11), suplementado por $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA; $0,25$ ou $0,50 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP; $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de tiamina.HCl; $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de piridoxina; $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ácido nicotínico; 50 mg.l^{-1} de cisteína; 50 mg.l^{-1} de glutamina; $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de biotina; $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ácido fólico; 3% (p/v) de sacarose; e solidificado pela adição de ágar a 0,7% (p/v).

Nessa fase, as culturas foram transferidas para a condição de luz, sob intensidade luminosa de $1,5 \text{ W.m}^{-2}$ (luz fluorescente branca-fria), fotoperíodo contínuo e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, permanecendo nessa condição durante 25 a 30 dias.

Na fase de regeneração, os calos desenvolvidos e enverdecidos foram recultivados pela alternância, a cada 30 dias, entre o meio básico de MS (11) suplementado com $0,001 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA; e $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP e o meio básico de MS suplementado com $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de zeatina (MSZ-7), ambos adicionados de sacarose a 3% (p/v), e solidificados pela adição de ágar (Sigma Chem. Co., USA) a 0,7% (p/v). Uma vez regenerados, os ramos de 0,50 a 0,60 cm de

comprimento foram destacados do calo original e cultivados, dessa vez, pela alternância dos meios MSZ-7 e MS com ausência de reguladores de crescimento, a cada 25 dias, até que atingissem de 5,0 a 6,0 cm de altura. Nessa fase, as culturas foram mantidas sob intensidade luminosa de $1,5 \text{ W.m}^{-2}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

O enraizamento dos ramos deu-se pela transferência desses para o meio MS na consistência semi-sólida pela adição de "Phytigel" (Sigma Chem. Co., USA) a 0,2% (p/v), e suplementado com 2% (p/v) de sacarose, metade da concentração de sais e $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIB. Os ramos permaneceram nesse meio durante 12 dias, quando então foram transferidos para a fase final de alongamento das raízes, em meio de composição similar ao anterior, porém na ausência de reguladores de crescimento. As condições de ambiente foram semelhantes às descritas na fase de regeneração. Os regenerantes enraizados foram transferidos para a casa de vegetação para a aclimatação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as mesmas condições de incubação, o mesmo volume da mistura enzimática e a mesma massa de tecido digerido, as misturas enzimáticas ENZ 2 e ENZ 3 proporcionaram resultados superiores em termos de viabilidade e rendimento de protoplastos, respectivamente (Quadro 1). No entanto, para a ENZ 3 foi obtida, no final do processo de purificação, suspensão de protoplastos de qualidade superior em termos de pureza, em função de efetiva digestão das paredes celulares, com reduzida quantidade de restos celulares em suspensão. Foi observado que os protoplastos isolados a partir da utilização da ENZ 3 tiveram elevado desempenho em cultivo (Quadro 1).

A mistura enzimática ENZ 1 proporcionou baixo rendimento e viabilidade dos protoplastos, em virtude da ineficiência dessa combinação de enzimas na digestão dos tecidos mesofílicos de *P. coccinea*. Essa mistura, originalmente descrita por OCHATT *et alii* (12), foi utilizada, com sucesso, no isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. edulis* f. *flavicarpa* (3), *P. incarnata*, *P. suberosa*, *P. seemannii* e *P. serrulatus* X *P. maliformis* (15). Todavia, MANDERS (10) e d'UTRA VAZ (2) obtiveram baixa produção de protoplastos isolados de mesófilo de *P. coccinea*, quando a mistura enzimática, ENZ 1, foi usada na digestão dos tecidos. Dadas as características das folhas dessa espécie, coriáceas e pilosas, foi verificada a necessidade de inclusão de Hemicelulase na mistura. Pela utilização da mistura ENZ 2, os mesmos autores obtiveram rendimento de $6,2 \times 10^6$ protoplastos/grama de tecido e viabilidade em torno de 88%. No entanto, apenas as primeiras divisões foram observadas, e o estágio de calos não foi atingido com sucesso.

QUADRO 1 - Médias do rendimento e viabilidade de protoplastos derivados de mesófilo de *P. coccinea*, considerando três misturas enzimáticas (ENZ 1, ENZ 2 e ENZ 3) em dois isolamentos

Misturas enzimáticas	Isolamento I		Isolamento II	
	Rendimento*	Viabilidade** (%)	Rendimento*	Viabilidade** (%)
ENZ 1	2,4 ± 0,9	51,1 ± 3,2	1,8 ± 0,6	45,1 ± 0,9
ENZ 2	6,3 ± 0,8	84,3 ± 10,3	8,1 ± 2,2	83,5 ± 4,8
ENZ 3	7,9 ± 1,3	81,0 ± 15,4	9,9 ± 1,8	81,5 ± 1,7

* X 10⁶ protoplastos/grama de matéria fresca. Média de cinco repetições.

** Média de 10 repetições.

No presente trabalho, a mistura originalmente utilizada por d'UTRA VAZ (2), d'UTRA VAZ *et alii* (3) e MANDERS (10), ENZ 2, foi alterada pela redução, à metade, da concentração de Celulisina e inclusão de Driselase, permitindo, assim, com a utilização dessa combinação, completar o processo de regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de mesófilo de *P. coccinea*.

No isolamento de protoplastos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina* e *P. cincinnata*, a partir de folhas cotiledonares de plantas germinadas *in vitro* foram utilizadas apenas as enzimas Macerozyme R10 e Celulase R10 nas concentrações de 2,0% (p/v) e 0,2 ou 0,4% (p/v), respectivamente (1). A escolha dessa combinação de enzimas pode ser justificada pela fonte de tecidos utilizada no isolamento de protoplastos, uma vez que a condição de ambiente *in vitro* contribui para menor espessamento, por deposição secundária de substâncias, das paredes celulares, comparativamente a tecidos provenientes de plantas desenvolvidas em condições de casa de vegetação.

A eficiência inicial de plaqueamento (EIP), nesse sistema, foi avaliada aos 10 dias, e as primeiras divisões só foram detectadas ao fim do oitavo dia de cultivo, no entanto prontamente seguidas por segundas e terceiras divisões mitóticas. O estágio de macrocolônias (calos de 1 a 2 mm) foi atingido ao fim de 35 a 40 dias. Em resultados obtidos para outras espécies do gênero, verificou-se que os tratamentos que envolveram o cultivo dos

protoplastos em gotas de agarose proporcionaram resultados superiores tanto para a EIP quanto para a eficiência final de plaqueamento (EFP) (1, 3, 10, 15). Entretanto, em *P. coccinea*, não foi observada diferença significativa entre as médias para EIP, porém houve para os valores de EFP (Quadro 2).

QUADRO 2 - Valores médios, em percentagem, das eficiências inicial e final de plaqueamento de protoplastos de mesófilo de *P. coccinea*, em função de diferentes métodos de cultivo

Método	Eficiência de plaqueamento (%)	
	Inicial	Final
Gotas de agarose	32,88 a	0,32 a
Camada de agarose	28,51 a	0,25 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Na fase de enverdecimento foi obtida elevada frequência de calos verdes, ao fim de 25 a 30 dias. Tal resultado acha-se em conformidade com as elevadas frequências obtidas por outros autores para várias espécies do gênero *Passiflora* (1, 2, 3, 10, 15).

Na fase de regeneração, foi obtida a frequência regenerativa de ramos de $25 \pm 15\%$, o que implica a necessidade de mais estudos visando à otimização da fase de regeneração de plantas para essa espécie. DORNELAS e VIEIRA (1), cultivando calos derivados de protoplastos isolados de cotilédones de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina* e *P. cincinnata*, obtiveram frequências de organogênese de ramos de 48, 75 e 93%, respectivamente, em meio MS suplementado com $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP e 10% (v/v) de água de coco. Entretanto, no presente trabalho foi observado que a alternância de recultivo dos calos, a cada 30 dias, entre os meios MS suplementado com $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP e $0,001 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA e MS suplementado com $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de zeatina, aumentou a frequência de calos compactos e nodulares, potencialmente organogênicos.

4. RESUMO

Folhas novas, recém-expandidas, de plantas de *Passiflora coccinea* Aubl., obtidas a partir da germinação de sementes e anteriores à emissão das gavinhas, foram utilizadas como fonte de explantes para o isolamento de

protoplastos. O rendimento e a viabilidade dos protoplastos variaram em função da mistura enzimática empregada na digestão dos tecidos. Foi observada baixa frequência de organogênese ($25 \pm 15\%$) de ramos em calos derivados de protoplastos. Regenerantes foram obtidos, ao final de 90 dias, pelo cultivo dos calos em alternância, a cada 30 dias, entre os meios MS suplementado com $0,001 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA e $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP e MS suplementado com $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de zeatina, ambos adicionados de sacarose a 3% (p/v) e ágar a 0,7% (p/v). Os ramos regenerados foram alongados pela alternância, a cada 25 dias, entre os meios MS suplementado com $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de zeatina e MS na ausência de reguladores de crescimento. O enraizamento dos ramos deu-se pela transferência dos ramos alongados para o meio MS suplementado com sacarose a 2% (p/v), metade da concentração dos sais e $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIB. Os ramos permaneceram nesse meio durante 12 dias, quando foram transferidos para a fase final de alongamento das raízes em meio de composição similar, porém na ausência de reguladores de crescimento.

5. SUMMARY

(PLANT REGENERATION FROM LEAF MESOPHYLL-DERIVED PROTOPLASTS OF *Passiflora coccinea* Aubl.)

Newly expanded leaves of glasshouse-grown seedlings of *Passiflora coccinea* Aubl., prior to the development of tendrils were used as source of mesophyll protoplasts. Protoplast yield and viability were variable according to the enzyme mixture used. Following culture, protoplasts reached callus stage. A low regeneration frequency ($25 \pm 15\%$) was observed in protoplast derived calli. Plants were regenerated from dark-green compact callus, derived from MSG medium, after three subcultures, every 30 days, on MS medium supplemented with 1.0 mg.l^{-1} BAP, 0.001 mg.l^{-1} NAA, and MS medium supplemented with 1.0 mg.l^{-1} zeatin, both containing 3.0% (w/v) sucrose and solidified with 0.7% (w/v) agar. Shoot regeneration occurred through organogenesis with the development of adventitious buds on the surface of the calli. Regenerated shoots were elongated by subculturing every 25 days alternating between MS medium with 1.0 mg.l^{-1} zeatin and MS medium lacking growth regulators, and rooted on a half-strength MS based medium supplemented with 1.0 mg.l^{-1} IBA, for 12 days, followed by the transference to the same medium lacking growth regulators. Rooted plants were successfully acclimatized under glasshouse conditions.

6. LITERATURA CITADA

1. DORNELAS, M. & VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. *Plant Cell Rep.*, 13: 103-106, 1993.
2. d'UTRA VAZ, F.B. *Somatic and sexual hybridization in tropical fruit crop species: passionfruit and tomato*. Nottingham, University of Nottingham, 1992. 175 p. (Tese Ph.D.).
3. d'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. & POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Rep.*, 12: 220-225, 1993.
4. FERREIRA, F.R. & OLIVEIRA, J.C. Germoplasma de *Passiflora*. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R. & VAZ, R.L. (coord.). *A cultura do maracujá no Brasil*. Jaboticabal, FUNEP, 1991. p. 187-200.
5. FREITAS, P.C.D. Possibilidades farmacológicas. In: RUGGIERO, C. (ed.). *Cultura do maracujazeiro*. Ribeirão Preto, Legis Summa, 1987. p. 210-217.
6. GILMOUR, D.M.; DAVEY, M.R. & COCKING, E.C. Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. *Plant Cell Rep.*, 8: 29-32, 1989.
7. KAO, K.N. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soyabean-*Nicotiana glauca* L. *Mol. Gen. Genet.*, 150: 225-230, 1977.
8. KAO, K.N. & MICHAYLUK, M. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfafa. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96: 135-141, 1980.
9. LARKIN, P.J. Purification and viability determination of plant protoplasts. *Planta*, 128: 213-216, 1976.
10. MANDERS, G. *Genetic manipulation of temperate and tropical woody species*. Nottingham, University of Nottingham, 1991. 189p. (Tese Ph.D.).
11. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-479, 1962.
12. OCHATT, S.J.; COCKING, E.C.; & POWER, J.B. Isolation, culture and plant regeneration of colt cherry (*Prunus avium* X *Prunus pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Sci.*, 50: 139-143, 1987.
13. OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (ed.). *Cultura do maracujazeiro*. Ribeirão Preto, Legis Summa, 1987. p. 218-246.
14. OLIVEIRA, J.C. & FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; & VAZ, R.L. (coord.). *A cultura do maracujá no Brasil*. Jaboticabal, FUNEP, 1991. p. 211-239.
15. OTONI, W.C.; d'UTRA VAZ, F.B.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; DAVEY, M.R. & POWER, J.B. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of wild passionfruit species (*Passiflora suberosa* L.; *P. incarnata* L.; *P. seemanii* Griseb) and the sexual hybrid *P. maliformis* X *P. serrulatus*. *Plant Cell Rep.*, 1995 (No prelo).
16. POWER, J.B.; DAVEY, M.R.; McLELLAN, M. & WILSON, D. *Laboratory manual: plant tissue culture*. Nottingham, University of Nottingham, 1989. 138p.
17. VANDERPLANK, J. *Passion flowers*. London, Cassell Publishers, 1991. 176 p.