

OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES ENTRE O CAPIM-ELEFANTE E MILHETO

Ana Luiza de Oliveira Timbó²; Lisete Chamma Davide³; José Eduardo Brasil Pereira Pinto⁴ e Antônio Vander Pereira⁵

Resumo

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de protoplastos de híbridos triplóides entre o capim-elefante e o milho como base para futuros trabalhos de duplicação cromossômica. Foram utilizados explantes de mesofilo de plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo* de dois híbridos triplóides (H1 e H2), os quais foram tratados com soluções enzimáticas em diferentes concentrações da enzima celulase R-10 (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%), acrescidas de 0,2% macerozyme e 0,1% driselase. A digestão enzimática foi monitorada a cada hora durante 5 horas. Obtiveram-se protoplastos a partir de folhas *in vitro* e *in vivo* dos dois híbridos triplóides, sendo as folhas *in vitro* as melhores fontes de explante. A quantidade de protoplastos variou em função do híbrido, solução enzimática e do tempo de tratamento.

Introdução

A principal utilização do capim-elefante é como forrageira e, no Brasil, mesmo sendo cultivado em todo o território nacional, há demanda de cultivares melhoradas adaptadas as diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de utilização, devido à existência de poucos programas de melhoramento (PEREIRA *et al.*, 2001).

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser conseguido por meio da exploração da variabilidade existente na própria espécie. No entanto, considerando a capacidade do capim-elefante de trocar alelos com outras espécies de *Pennisetum*, o programa de melhoramento pode recorrer à utilização de germoplasma de espécies pertencentes a conjuntos gênicos próximos, como o milho (PEREIRA *et al.*, 2001). Esse tipo de combinação genética busca reunir no híbrido algumas características desejáveis do milho como vigor, resistência à seca, tolerância a doenças, qualidade forrageira e tamanho das sementes, enquanto que rusticidade, agressividade, perenidade, boa palatabilidade e elevada produtividade de matéria seca são conferidas pelo capim-elefante (DIZ, 1994; JAUHAR; HANNA, 1998).

No entanto, essas duas espécies apresentam níveis de ploidia diferentes, pois o capim-elefante ($2n=4x=28$) é alotetraplóide, enquanto o milho ($2n=2x=14$) é diplóide. A hibridação entre ambas as espécies produz um híbrido triplóide infértil com $2n=3x=21$ cromossomos e genomas AA'B. Essa infertilidade do híbrido é a principal barreira nos programas de melhoramento, pois impede sua utilização em cruzamentos e sua propagação por sementes.

A restauração da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação cromossômica, utilizando-se antimutogênicos (HANNA 1981, HANNA *et al* 1984, ABREU *et al* 2006; BARBOSA *et al* 2007). Barbosa *et al.* (2007) induziu duplicação cromossômica em gemas e brotos. Porém, devido à utilização de material vegetativo multicelular esse processo de duplicação *in vitro* resultou na obtenção de plantas na maioria mixoplóides e poucas hexaplóides estáveis.

A utilização de protoplastos, tanto como material a ser tratado por antimutogênico (ZENG *et al.*, 2006), como para a fusão, poderia superar o problema de mixoploidia gerando plantas hexaplóides estáveis. Outra vantagem é que, depois da otimização do protocolo, pode haver produção em massa dos híbridos.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a obtenção de protoplastos de híbridos triplóides de capim-elefante e milho como subsídio para futuros trabalhos de duplicação cromossômica do híbrido tanto via fusão de protoplastos, para a formação de alohexaplóides, como por meio de antimutogênicos, para a formação de autohexaplóides.

Material e métodos

1. Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, Bolsa capes.
2. Bióloga, Mestre e Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas/UFLA, Caixa Postal 37 – 37200-000, Lavras, MG. Bolsista do cnpq. Oliveiratal@yahoo.com.br
3. Bióloga, Professora da universidade federal de lavras/ufla, Caixa Postal 37 – 37200-000 – Lavras, MG, Bolsista do cnpq. Lcdavide@ufla.br
4. Engenheiro Agrônomo, Professor da universidade federal de lavras/ufla, caixa Postal 37 – 37200-000 – Lavras, MG, Bolsista do cnpq. Jeduardo@ufla.br
5. Engenheiro Agrônomo, Doutor, Bolsista do cnpq, Embrapa Gado de Leite, 36038-330 – Juiz de Fora, MG. Avanderp@cnpq.embrapa.br

Os tratamentos foram constituídos por dois híbridos triplóides de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) e milho (*P. glaucum* (L.) R. Br.) denominados H1 (CNPGL 91-2-5x M42) e H2 (Merker Pinda x M41), dois materiais vegetativo (folhas de plântulas cultivadas *in vitro* e *in vivo*), quatro soluções enzimáticas Celulase R-10 (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%), acrescidas de (0,2% Macerozyme e 0,1% Driselase) e cinco diferentes tempos de incubação (1,2,3,4 e 5 horas).

Os explantes foliares foram retirados de plântulas obtidas a partir de sementes germinadas em substrato Plantmax e mantidas em casa de vegetação, ou germinadas em cultivo *in vitro*. Para a germinação *in vitro* as sementes foram submetidas à desinfestação com ácido sulfúrico 50% por 15 minutos e tratadas com solução de álcool 70% (v/v), por 1 minuto. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de água sanitária 50% (v/v) com o teor de cloro ativo de 2,5%, durante 15 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram lavadas com água destilada estéril por três vezes. Cada semente foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 3% de sacarose. Os tubos de ensaio foram transferidos para uma sala de crescimento sob condições controladas de temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e irradiação de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os ensaios para obtenção de protoplasto foram realizados após 30 dias.

As soluções enzimáticas foram preparadas por diluição em meio CPW (*cell protoplast wash*) de acordo com Frearson *et al.* (1973), acrescido de 13% de manitol e, após o ajuste do pH (5,6) com 5 mM do ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES).

Em capela de fluxo laminar, os explantes foliares de plantas *in vivo* mantidas em casa de vegetação foram imersos em NaOCl a 2,5% (v/v) por 10 minutos e, posteriormente, em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em seguida, os mesmos foram lavados por três vezes com água destilada estéril.

Para obtenção dos protoplastos procedeu-se da seguinte forma: em condições assépticas, pesaram-se 500 mg de folhas obtidas *in vivo* e *in vitro*, em tamanhos de 6 cm. Essas folhas foram seccionadas em tiras de 1,0 a 1,5 mm e, posteriormente, o material vegetal foi pré-plasmolisado, durante uma hora e na ausência de luz, em 20 mL de meio CPW + 13% de manitol. Em seguida, a solução de CPW + 13% de manitol foi descartada com o uso de pipetas de Pasteur, sendo, então, adicionados 20 mL da mistura enzimática. Cada amostra recebeu diferentes tratamentos enzimáticos.

A digestão enzimática ocorreu pela incubação, durante 5 horas, no escuro, sob agitação de 40 rpm a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. O monitoramento foi realizado a cada hora, sendo retirada uma pequena alíquota de cada placa/tratamento para a quantificação dos protoplastos em Câmara de Neubauer, sob microscópio óptico. Foi utilizado o corante Azul de Evans a 0,05% para a contagem dos protoplastos viáveis (WIDHOLM, 1972).

Resultados e discussão

A quantidade máxima de protoplastos para ambos os híbridos obteve-se a partir de folhas *in vitro*, sendo $27,75 \times 10^4$ protoplastos/mL para o híbrido H1, que foi obtida após cinco horas de digestão na solução enzimática E2 (1,0% celulase R-10; 0,2% macerozyme e 0,1% driselase) e $26,25 \times 10^4$ protoplasto/mL para o híbrido H2, obtidos após 3 horas de digestão pela solução enzimática E4 (2,0% celulase R-10; 0,2% macerozyme e 0,1% driselase) conforme Tabela 1.

Prasertsongsukum (2004) trabalhando com uma gramínea (*Vetiveria zizanioides* Nash) também obteve o seu melhor resultado ($8,4 \times 10^4$ protoplastos/mL) quando a celulase e macerozyme estavam presentes na solução enzimática (2,0% de celulase R-10 acrescido de 2,0% de macerozyme e 0,5% de pectinase).

Tabela 1. Quantificação de protoplastos viáveis ($\times 10^4$) obtidos de folhas de plântulas cultivadas *in vitro* e *in vivo* dos híbridos triplóides H1 e H2 em diferentes soluções enzimáticas, durante cinco horas de digestão. UFLA, Lavras, MG, 2007.

TRATAMENTOS	HÍBRIDOS										
	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H1	H2	
	1 hora		2 horas		3 horas		4 horas		5 horas		
Folhas <i>in vitro</i>	E1	0	0	1,25	2,63	2,0	3,0	0,5	3,0	5,63	3,38
	E2	0	0	4,75	1,13	13,5	1,88	17,88	11,25	27,75	2,8
	E3	0	0	0,75	3,88	3,88	8,5	11,63	18,63	10,25	11,63
	E4	0	1,63	0,13	2,5	6,0	26,25	9,0	21,0	9,38	23,5
Folhas <i>in vivo</i>	E1	0	0	0,13	0	0,13	0	0,25	0	0,63	0
	E2	0	0	1,0	0	0,75	0	2,38	0,10	2,38	1,0
	E3	0	0	0,63	0	0,5	0	0,25	0	1,0	0
	E4	0	0	0	0	0,13	0	0,25	0,15	1,38	1,50

H1 = híbrido 1; H2= híbrido 2; E= solução enzimática; E1= 0,5 % celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase; E2= 1,0 % celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase; E3= 1,5 % celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase; E4= 2,0% celulase R-10, 0,2% macerozyme e 0,1% driselase. Produção dada $\times 10^4$ protoplastos/mL.

Para os dois híbridos a maior eficiência na digestão da parede celular foi realizada pela combinação das enzimas celulase R-10, macerozyme e driselase. Devido às condições ambientais de cultivo *in vitro*, as folhas das plântulas mostram-se mais tenras, menores e mais finas do que as folhas das plântulas cultivadas *in vivo*, o que facilitou a ação das enzimas. Essas diferenças morfológicas, provavelmente, se devem à menor intensidade de luz e à maior umidade nas condições *in vitro*.

Resultados semelhantes também foram relatados por Komai *et al.* (1996) que obtiveram $1,46 \times 10^7$ protoplastos/g de folhas de plântulas cultivadas *in vitro* de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), quando tratadas, de 4 a 10 horas, pelas enzimas 2% de celulase R10 e 0,5% de macerozyme R10, bem como, Hu *et al.* (1999) que utilizaram a solução enzimática de 2,0% celulase RS, 1,0% macerozyme, 0,5% driselase, durante 15 a 20 horas, no isolamento de protoplasto de folhas *in vitro* e hipocótilo de várias espécies de *Brassica*.

Para as folhas de plântulas cultivadas *in vivo*, obtiveram-se protoplastos, embora em pequena quantidade. No entanto, é interessante notar que, para ambos os híbridos, o mesmo tratamento enzimático que levou à obtenção de maior número de protoplastos de explantes *in vitro* repetiu-se para explantes *in vivo*. No caso do híbrido H1, o tratamento E2 permitiu obter apenas de $2,38 \times 10^4$ protoplastos/mL, após 5 horas de digestão, enquanto que as folhas *in vitro*, produziram aproximadamente 12 vezes mais ($27,75 \times 10^4$ protoplastos/mL). Para o híbrido H2, a melhor solução enzimática foi a E4, do qual foram obtidos $1,5 \times 10^4$ protoplastos/mL após cinco horas de digestão das folhas *in vivo*, tendo sido necessárias apenas três horas de digestão das folhas *in vitro* para a produção de aproximadamente 18 vezes mais ($26,25 \times 10^4$ protoplastos/mL) (Tab.1).

Vasil *et al.* (1983) isolaram protoplastos de suspensões celulares originados de calos de inflorescências de capim-elefante (*P. purpureum*) e, após extensivos trabalhos, concluíram que o melhor tratamento enzimático foi com 2,5% de celulase R10, com ou sem 1,0% de macerozyme, que possibilitou isolar 80% de protoplastos, após 6 horas de digestão.

É importante ressaltar que a obtenção de protoplastos varia muito, isso se deve, principalmente, ao tipo de cultivo do material vegetal e das condições de obtenção, além do tipo de genótipo utilizado e das combinações e concentrações enzimáticas usadas no estudo.

Conclusões

As folhas de plântulas cultivadas *in vitro* foram as melhores fontes para a obtenção de protoplasto de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto.

A combinação enzimática da celulase, macerozyme e driselase possibilitou a obtenção de maior quantidade de protoplastos.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de mestrado do primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de produtividade.

Referências

- ABREU, J. C. ; DAVIDE, L. C. ; PEREIRA, A. V. ; BARBOSA, S. . Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, 2006.
- BARBOSA, S. ; DAVIDE, L. C. ; PEREIRA, A. V. ; ABREU, J. C. . Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho.. *Bragantia* (São Paulo), v. 66, n.3, p. 365-372, 2007.
- DIZ, D. A. *Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploid hybrids*. 1994. 118 p. (PhD Thesis)-University of Florida, Florida.
- FREARSON, E. M.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasto. *Developmental Biology*, v. 33, p.130-137, 1973.
- HANNA, W. W. Method of reproduction in napiergrass and in the 3X and 6X allopoloid hybrids with pearl millet. *Crop Science*, Madison, v. 21, p. 123-126, 1981.
- HANNA, W. W.; GAINES, T. P.; GONZALEZ, B.; MONSON, W. G. et al. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. *Agronomy Journal*, Madison, v. 76, n. 6, p. 969-971, 1984.
- HU, Q.; ANDERSEN, S. B.; HANSEN, L. N. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, Netherlands, v. 59, p. 189-196, 1999.
- JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. *Advances Agronomy*, New York, v. 64, p. 1-26, 1998.
- KOMAI, F.; MASUDA, K.; HARADA, T.; OKUSE, I. Plant regeneration from adventitious roots of spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown from protoplasts. *Plant Science*, n. 120, p. 89-94, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, Bethesda, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. *Recursos genéticos e melhoramento*. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p.549-602.
- PRASERTSONGSKUN, S. Isolation and culture of suspension protoplasts of vetiver. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Songkhla v. 26, n. 3, p. 411-416, 2004.
- VASIL, V.; WANG, D.; VASIL, I. K. Plant Regeneration from protoplasts of Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, v. 111, p. 233-239, 1983.
- WIDHOLM, J. M. The use fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, v. 47, n. 4, p.89-94, 1972.
- ZENG, S-H; CHUAN-WU C.; LUI, H.; JI-HONG, L.; XIU-XIN, D. *In vitro* indução, regeneração and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, v. 87, p.85-93, 2006.

ANAIS do 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas



5º CBMP

10 a 13 de agosto de 2009
SESC - GUARAPARI-ES

© *melhoramento e os novos
cenários da agricultura.*

Documentos nº 011
ISSN 1518-4854