

Fusão de protoplastos de *Hevea brasiliensis* Müell. Arg. e *Hevea pauciflora* Müell. Arg. Estabelecimento de técnica.

Marcel Cailloux (*)
Eduardo Lleras (**)

Resumo

É descrita uma técnica para obtenção de protoplastos de folhas de *Hevea*, assim como um procedimento para determinar fusão de protoplastos de duas espécies.

INTRODUÇÃO

Os clones mais produtivos de látex de *Hevea brasiliensis* não podem ser cultivados como monocultura no Brasil devido a presença de um fungo, *Microcyclus ulei*, que infesta as folhas novas e eventualmente causa a murcha das mesmas. Na floresta amazônica, o habitat natural de *Hevea brasiliensis*, o fungo causa danos limitados sendo que só existem umas 5-7 árvores da espécie por hectare. Estão assim isoladas umas das outras e, conseqüentemente, parcialmente protegidas dos esporos de *M. ulei*. Além disto, estas árvores predominantemente pouco produtivas são relativamente tolerantes à doença. Em contraste, as árvores mais produtivas de *Hevea* são mais susceptíveis. Quando são plantadas próximas umas das outras em plantações, esta característica facilita a dispersão da doença e diminui grandemente a viabilidade de produção em larga escala de borracha nas Américas.

Existem espécies de *Hevea* tolerantes ao ataque por *Microcyclus ulei*. *Hevea pauciflora* é um extraordinário exemplo disto. Porém, esta espécie tem uma produção de borracha muito baixa. Cruzamentos entre *Hevea brasiliensis* e *H. pauciflora* poderiam ser conseguidos talvez, para tentar obter um híbrido resistente à doença e de alta produtividade. Esta técnica, porém, é difícil por muitas razões. As principais destas são: os mecanismos de isolamento e a segregação de cromossomos não

homólogos (que pode ser contornado com poliploidia).

A nova técnica de hibridização somática através de fusão de protoplastos pode possivelmente ser uma alternativa viável. Já têm sido obtidos híbridos somáticos nas Solanaceae (por exemplo Tomate x Batata), e não há razões teóricas pelas quais não possam ser obtidos em outras famílias. Assim, têm-se iniciado, com o presente trabalho, pesquisas na hibridização somática de *Hevea*.

MATERIAIS E MÉTODOS

a. SOLUÇÃO NUTRITIVA

Para a cultura de protoplastos de *Hevea* é utilizado o meio nutritivo completo T₀ descrito por Bourgin *et al.* (1976). Sua composição é a seguinte:

	concentração em g/l
Manitol (0,7M)	127400
Sacarose	20000
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
ZnSO ₄	1
H ₃ BO ₃	1
MnSO ₄	0,1
KI	0,01
CuSO ₄	0,03
AlCl ₃	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,03
Pantotenato de Ca	1
Inositol	100
Biotina	0,1
Niacina	1
Vitamina B ₆	1

(*) — Department des Sciences Biologiques, Université de Montreal, Montreal, Canadá.
(**) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

Vitamina B ₁	1
Ácido Naftaleno-acético	3
Benzyl Adenina	3
Fe	5 ml de solução "stock", contendo: 5,57 g Fe ₂ SO ₄ · 7H ₂ O + 7,45 Na ₂ EDTA até um litro de água.

Nesta solução nutritiva os macro-elementos são os de Murashige-Skoog (1962) diluídos à metade; os micro-elementos são os de Heller (1953), onde o FeCl₃ é substituído por Fe EDTA e as vitaminas são as de Morel e Wetmore (1951).

b — MEIO DE MACERAÇÃO

Este meio está composto de solução T₀ na qual é omitida a sacarose e as enzimas apropriadas na proporção certa. Para *Hevea brasiliensis* o meio de maceração é composto das seguintes substâncias:

Celulase Onozuka R ₁₀ (1)	0,4 %
Driselase (2)	0,2 %
Macerozima R ₁₀ (1)	0,08%

Para *Hevea pauciflora* o meio de maceração foi o seguinte:

Celulase Onozuka R ₁₀	0,3 %
Driselase	0,15%
Macerozima R ₁₀	0,06%

Os meios de maceração são inicialmente filtrados através de papel de filtro comum e logo esterilizados por filtração por meio de um filtro miliporo de 0,25 μm. Estes meios estão calculados para maceração durante a noite como descrito por Chupeau *et al.* (1974) e são ajustados para obter maceração apropriada para tiras de folha de *Hevea* (ver discussão).

c — TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DE HEVEA

Folhas jovens de *Hevea* são esterilizadas superficialmente por 15 minutos em uma solução comercial de hipoclorito de sódio (QBOA) a 10% à qual tem sido adicionadas 10 gotas de um detergente líquido de uso doméstico (Espuma Limão) para cada 500 ml de solução. As folhas são logo lavadas três vezes com água esterilizada. As folhas molhadas são colocadas sobre papelão estéril e cortadas em tiras de 1 mm de largura com seis lâminas de barbear (gilette) igualmente espaçadas umas das outras. Uma ferramenta em forma de "L" com

sua parte horizontal coberta de borracha é usada para segurar a folha quando as tiras são cortadas. As tiras são cortadas começando da nervura central para as margens. As folhas aderem melhor ao papelão e são mais fáceis de cortar. Se a largura da folha, da nervura à margem é maior que 4 cm, o excesso é tirado com um bisturi. As tiras são entre 3 e 3,5 cm de comprimento. As tiras são colocadas à flutuar imediatamente em 10 ml do meio de maceração em placas de petri de 10 cm de diâmetro.

Após pernoitar (14-16 horas) na temperatura de laboratório (aqui em Manaus aproximadamente 24°C), as placas de Petri são agitadas suavemente com movimento rotatório horizontal para liberar os protoplastos.

d — CULTURA DOS PROTOPLASTOS

Os protoplastos são pipeteados lentamente das placas de Petri e colocados em tubos estéreis de centrifuga com tampa de rosca. São logo centrifugados a menos de 100g (aproximadamente 800 revoluções por minuto) durante 5 minutos. O líquido sobrenadante é trocado por 10 ml de T₀ e os protoplastos postos novamente em suspensão. Isto é repetido três vezes até que o meio de maceração esteja diluído pelo menos 1000 X.

Quando são desejadas culturas líquidas, 2 ml da suspensão lavada de protoplastos, contendo aproximadamente 6 x 10⁶ protoplastos por ml são colocadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. A cultura sólida é obtida misturando 1 ml da suspensão de protoplastos com 1 ml de agar a 0,8% mantido a 45°C. As culturas são mantidas à temperatura de laboratório (24°C) ou sujeitas às flutuações normais de temperatura da região Amazônica (que variou entre 23 e 33°C durante nossos experimentos), sob luz difusa. Os exames para detectar divisão celular são feitos após quatro dias.

e — DETERMINAÇÃO DE FUSÃO INTERESPECÍFICA DE PROTOPLASTOS DE HEVEA

Os protoplastos das duas espécies de *Hevea* são indistinguíveis uns dos outros. Para poder determinar a fusão entre as duas espécies é preciso ter um marcador. Neste caso,

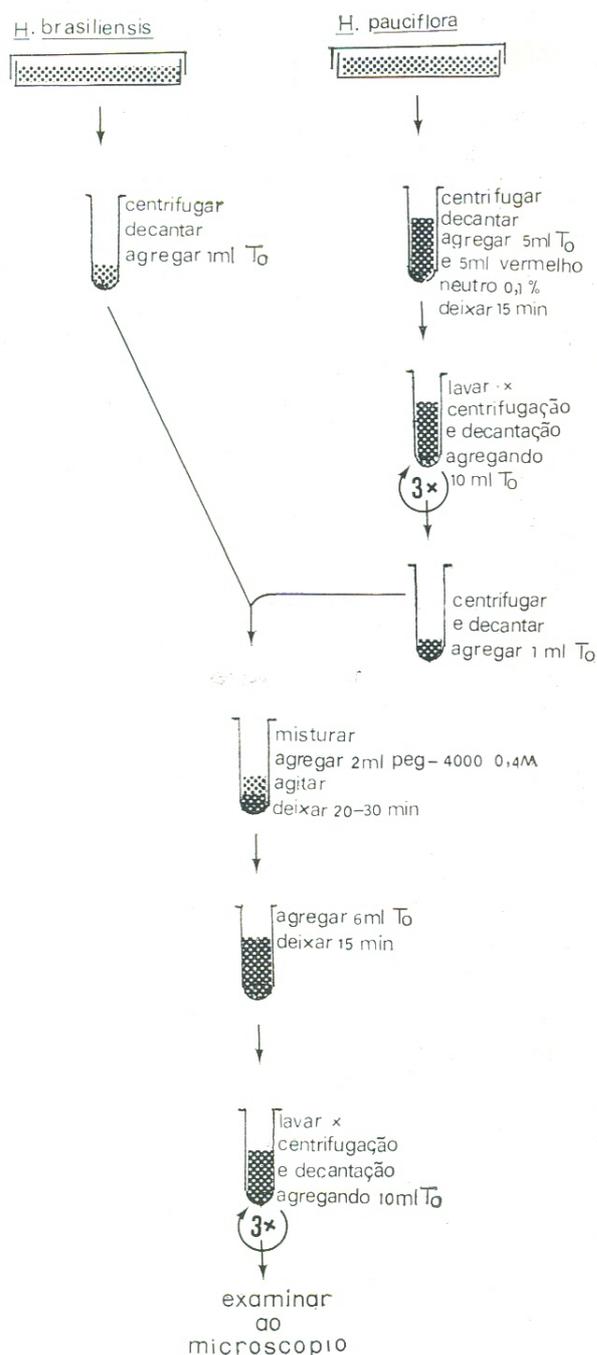


Fig. 1 — Protocolo de determinação de Fusão Interspecifica de Protoplastos de *Hevea brasiliensis* e *H. pauciflora*.

um corante vital, vermelho neutro é usado como marcador para tingir os protoplastos de uma das duas espécies. Glicol de Polietileno (PEG 4000) é o agente de fusão. A técnica ge-

ral é uma modificação da usada por Erikson *et al.* (1974). Está ilustrada na figura 1 e detalhada a seguir.

Inicialmente as tiras de folha de *Hevea brasiliensis* e *H. pauciflora* são maceradas durante a noite em suas placas de Petri respectivas. As suspensões de protoplastos resultantes são pipetadas nos respectivos tubos de centrifuga e centrifugados a 70g por cinco minutos. Após decantar o líquido sobrenadante, os dois tubos recebem tratamentos diferentes. Um ml de T₀ é agregado ao tubo de *H. brasiliensis* e o tubo é deixado a um lado até o momento de fazer a fusão. No tubo contendo os protoplastos de *H. pauciflora* são colocados primeiro 5 ml de T₀ e logo 5 ml de uma solução de vermelho neutro a 0,1%. Os protoplastos são levados a suspensão agitando suavemente e deixados por 15 minutos. O tubo é centrifugado três vezes a 70g por 5 minutos, cada vez com decantação, descartando o sobrenadante e adicionando 10 ml de T₀. Após uma quarta centrifugação e decantação, somente é agregado 1 ml de T₀.

Os protoplastos das duas espécies estão agora prontos para iniciar a fusão. Para iniciar fusão, misturar primeiro os protoplastos dos dois tubos e agregar 2 ml de PEG 4000 0,4 M. Agitar suavemente e deixar por 20-30 minutos. Lavar uma vez por centrifugação decantando e adicionando 10 ml de T₀. Deixar por 15 minutos (a maior parte da fusão ocorre nesta fase). Lavar duas vezes por centrifugação, decantação e adição de 10 ml T₀. Examinar ao microscópio para determinar o grau de fusão interespecifica. Se os resultados são satisfatórios, repetir, omitindo o processo de coloração para cultivar os produtos de fusão.

DISCUSSÃO DO MÉTODO

Quanto mais novas forem as folhas, maior será o número de protoplastos obtidos por grama de peso fresco de tecido à uma concentração dada de enzimas macerantes. O tamanho das folhas não é tomado como indicação da idade fisiológica das mesmas. Folíolos de 12-18 cm de comprimento coletados no campo de enxertos de 2 anos são escolhidos para *Hevea brasiliensis*. Folhas de *H. pauciflora* nas mesmas condições tendem a ser muito maio-

res. As folhas novas são flácidas e parecem estar penduradas pelo pecíolo. As folhas mais maduras são mais rígidas e dão menos protoplastos (tabela 1). Quando maduras são quebradiças e fazem o som característico de vidro fino sendo quebrado quando são cortadas em tiras com lâminas de barbear. A produção por grama de peso fresco das folhas normalmente atinge 1×10^8 protoplastos nos meios de maceração com as concentrações de enzimas escolhidas para *Hevea*. Aproximadamente 0,75 gramas de tiras de folhas são usadas para cada placa de Petri de 10 cm de diâmetro.

A concentração osmótica de manitol tem que ser ajustada à idade fisiológica das folhas. Por exemplo, ainda se mais protoplastos são obtidos a 0,7 M que a 0,55 M, só a metade dos protoplastos são perfeitamente esféricos à concentração de 0,7M. Esfericidade e lisura do contorno comparados com forma e contornos irregulares são tomados aqui como critérios para determinação de protoplastos saudáveis.

TABELA 1 — Quantidade de protoplastos por ml de meio de maceração em função da idade fisiológica das folhas.

Comprimento de folhas	relativa rigidez	protoplastos por ml
18 cm	flácida	6×10^6
18 cm	ligeiramente rígida	$3,5 \times 10^6$
23 cm	flácida	$2,85 \times 10^6$
20 cm	ligeiramente rígida	2×10^6

Não há uma concentração absoluta de enzimas que seja melhor em todas as situações. As concentrações maiores produzem mais protoplastos. Porém, deve-se lembrar que as enzimas não são puras e podem assim apresentar alguma toxicidade aos protoplastos.

A menor concentração de enzimas, que produz um número suficiente de protoplastos, deve ser usada. A figura 2 indica a relação entre o número de protoplastos obtidos e a concentração de enzimas do meio de maceração. Aqui, a concentração de enzimas usada por Chupeau *et al.* (1974) é usada como ponto de comparação (IX).

Pode-se ver que *Hevea pauciflora* produz mais protoplastos por ml de solução de maceração que *H. brasiliensis* e que o número de protoplastos produzidos começa a diminuir à concentrações de 4X para *H. brasiliensis*. Assim, escolhemos 4X para *H. brasiliensis* e 3X para *H. pauciflora*, sendo que estas duas concentrações dão respectiva e aproximadamente o mesmo número de protoplastos.

Para avaliar a eficiência relativa de cada enzima no meio de maceração, as enzimas têm sido testadas individualmente e em diversas combinações. Os resultados são apresentados na Tabela 2. A celulase, quando usada independentemente, apresenta atividade muito baixa. Driselase, usada independentemente, é 13 vezes mais ativa, mas em combinação estas duas enzimas liberam quase 2/3 dos protoplastos, quando comparado com uma mistura completa de enzimas.

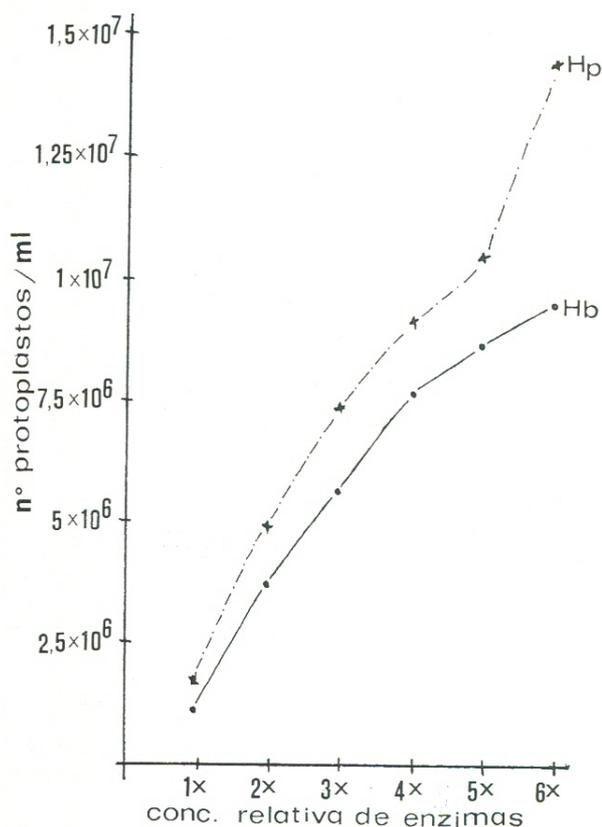


Fig. 2 — Efeito da concentração de enzimas de maceração na produção de protoplastos de *Hevea*. A referência (IX) é a concentração usada por Chupeau *et al.* (1974) para tabaco. Hb, *H. brasiliensis*; Hp, *H. pauciflora*.

TABELA 2 — Papel sobre *Hevea pauciflora* de cada enzima na mistura usada por Chupeau et al. (1974) em tabaco. A concentração de referência é 3x. A eficiência é expressada como número de protoplastos obtidos por ml. de meio de maceração.

Enzima	mg de enzima por 10 ml de T.						
	30	30	30	15	—	—	15
Cellulase	—	15	15	15	15	15	7
Driselase	—	—	6	6	6	—	6
Macerozima	3,5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁶	6,8 × 10 ⁶	6,3 × 10 ⁶	4,6 × 10 ⁶	4,7 × 10 ⁶	3,1 × 10 ⁶
Número de protoplastos/ml.							

Uma terça parte da atividade de maceração é devida à ação da Macerozima. Reduzindo-se à metade a concentração de celulase ou driselase, reduz-se consideravelmente a eficiência da mistura. Assim, as proporções relativas de enzimas usadas por Chupeau *et al.* (1974) em folhas de tabaco são também válidas para *Hevea* e só a concentração das mesmas tem que ser aumentada.

A fusão de protoplastos de *Hevea* não apresenta grandes problemas já que obtivemos entre $7,5 \times 10^5$ e $1,12 \times 10^6$ fusões por ml, o que equivale a um índice de fusão de entre 10 a 15%. Percentagens idênticas foram encontradas por Kao & Michayluk (1974) e Erikson *et al.* (1974). Eles consideram esta percentagem de fusão como sendo de alta frequência. Sendo que temos obtido divisão celular em protoplastos individuais de *Hevea* tanto em cultura líquida quanto sólida, e sendo que *Hevea* apresenta um grande potencial para regeneração celular em enxertos, as perspectivas de obter regeneração de plantas completas a partir de produtos de fusão parecem ser uma meta alcançável.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos de maneira muito especial a todo o pessoal técnico do Instituto Nacional de Pesquisas da Seringueira que deu todo o apoio à nossa pesquisa. Agradecemos também à Dra. Rosemary Silvester Bradley e ao Dr. Theodore Verne St. John pelo gentil empréstimo de equipamento e laboratório.

Fusão de protoplastos...

SUMMARY

A technique for obtaining protoplasts from *Hevea* leaves is described together with a procedure to ascertain the fusion of the protoplasts of two species, *Hevea brasiliensis* and *H. pauciflora*.

BIBLIOGRAFIA

- BOURGIN, J.P.; MISSONIER, C. & CHUPEAU, Y.
1976 — Culture de protoplastes de mésophylle de *Nicotiana sylvestris* Spegazzini et Comes haploide et diploide. *C. R. Acad. Sc. Paris. Série D*, 282 : 1853-1856.
- CHUPEAU, Y.; BOURGIN, J.P.; MISSONIER, C.; DORION, N. & MOREL, G.
1974 — Préparation et culture de protoplastes de divers *Nicotiana*. *C. R. Acad. Sci. Paris. Série D*, 278 : 1565-1568.
- ERIKSON, T.; BONNETT, H.; GLIMELIUS, K. & WALLIN, A.
1974 — Technical advances in protoplast isolation, culture and fusion. In: "Tissue Culture and Plant Science" edited by H. E. Street. London, New York, San Francisco. p. 213-231.
- HELLER, R.
1953 — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Thesis & *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.*, Paris, 14 : 1-223.
- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R.
1974 — A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115 : 355-367.
- MOREL, G. & WETMORE, R.H.
1951 — Tissue culture of monocotyledons. *Amer. Jour. Bot.*, 38 : 138-140.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.
1962 — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum*, 15:473-497.

(Aceito para publicação em 5/12/78)