

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Dezembro, 2007

181

Hibridação Somática



Embrapa



ISSN 0103-0205
Dezembro, 2007

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 181

Hibridação Somática

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Daniela Vieira dos Anjos Sena

Campina Grande, PB.
2007

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
<http://www.cnpa.embrapa.br>

Comitê de Publicações

Presidente: Nair Helena Castro Arriel
Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevêdo
Everaldo Paulo de Medeiros
Fábio Aquino de Albuquerque
Francisco das Chagas Vidal Neto
João Luiz da Silva Filho
José Wellington dos Santos
Luiz Paulo de Carvalho
Nelson Dias Suassuna

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Tratamento das Ilustrações: Oriel Santana Barbosa

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa

1ª Edição

1ª impressão (2007) 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Hibridação Somática, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho. Campina Grande, 2007.

27p. (Embrapa Algodão. Documentos, 181)

1. Biotecnologia 2. Protoplastos I. Carvalho, J.M.F.C. II. Sena, D.V. dos A. III. Título. IV. Série.

CDD 634.3105

© Embrapa 2007

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

D.Sc., Engº agron., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: Julita@cnpa.embrapa.br

Daniela Vieira dos Anjos Sena

Estagiária da Embrapa Algodão, graduanda do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: danielasenas@hotmail.com

Apresentação

Um dos problemas enfrentados no melhoramento genético vegetal é a impossibilidade de obter descendentes a partir de alguns cruzamentos, devido a barreiras tanto em pré quanto em pós-fertilização. O cultivo in vitro permite a hibridação interespecífica e intergenérica em cruzamentos considerados incompatíveis seja realizada com sucesso e descendentes sejam obtidos. Consistindo num ferramenta importante para o melhorista para aumentar a variabilidade genética e para transferir genes desejáveis entre espécies, principalmente das selvagens para as cultivadas.

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Introdução.....	11
Etapas para Hibridação Somática.....	12
Obtenção de Protoplastos.....	12
Desinfestação do Material Trabalhado.....	13
Digestão da Parede Celular.....	13
Fusão de Protoplastos.....	15
Hibridação Somática.....	17
Regeneração da Parede Celular.....	19
Divisão Celular.....	19
Calo.....	20
Plantas Híbridas Regeneradas.....	21
Conclusão.....	22
Referências Bibliográficas.....	23

Hibridação Somática

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Daniela Vieira dos Anjos Sena

Introdução

A hibridação somática, via fusão de protoplastos é uma técnica promissora para utilização em programas de melhoramento genético, que permite a modificação de células vegetais mediante fusões nucleares ou citoplasmáticas.

Protoplastos são descritos como células desprovidas da parede celular. É um estado onde as células estão desprotegidas mediante processos mecânicos ou processos enzimáticos obtidos em laboratório. Estes representam, de fato, a única fonte de células individuais que se pode obter de plantas superiores. Os protoplastos, formando células individuais em cultura, podem ser manipulados com técnicas microbiológicas e sua totipotência permite a regeneração de plantas inteiras (FEHÉR; DUDITS, 1994).

Em 1892, já haviam sido obtidos os primeiros protoplastos por meio de isolamento mecânico (KLERCKER, 1892). Tecidos de folhas tinham suas células plasmolisadas e cortes eram feitos de modo a alcançar a parede celular sem danificar a membrana plasmática, liberando, no meio, os protoplastos intactos. Em 1960, foram empregadas enzimas pectocelulolíticas para a obtenção de protoplastos, aumentando o rendimento do processo e abrindo perspectivas do uso deste sistema em

pesquisas na biologia vegetal (COCKING, 1960). Em 1971, foram regeneradas as primeiras plantas a partir de protoplastos. (CARNEIRO, et al; 1998).

Os protoplastos vêm sendo utilizados no melhoramento de espécies de interesse agronômico para obtenção de plantas transgênicas, de híbridos somáticos e de mutantes ou variantes somaclonais; efetua-se o isolamento de protoplastos e, posteriormente, a fusão destes, ocorrendo, assim, a regeneração de plantas a partir dos tecidos selecionados, que serão analisados. Os protoplastos constituem, também, um sistema vegetal para o estudo da expressão de genes isolados e sua regulação.

Em recente revisão, Davey et al. (2005) apresenta resultados positivos em que a fusão de protoplastos colaborou no melhoramento genético de diversas culturas economicamente importantes.

Etapas para Hibridação Somática

Obtenção de Protoplastos

A fonte utilizada para o isolamento de protoplastos é variável e tem influência na sua obtenção, e no processo de regeneração da parede e na freqüência das divisões celulares que se sucedem. Os protoplastos podem ser isolados de vários tecidos vegetais como o mesófilo foliar, calos e suspensões celulares (VIEIRA, 1997). O isolamento de protoplastos em suspensões celulares é mais utilizado pela facilidade de manipulação e eficiência no isolamento. Em trabalhos com espécies de Passiflora, os explantes mais utilizados para isolamento de protoplastos têm sido cotilédones (DORNELAS; VIEIRA, 1993; PASSOS et al., 2004) e folhas recém- expandidas (VAZ et al., 1993; DORNELAS, 1995; OTONI, 1995). Em Citrus, utilizam-se protoplastos isolados de suspensões celulares, de calos embriogênicos ou do mesófilo. O isolamento de protoplastos a partir de calos deve ser estudado e maximizado para cada espécie e variedade (KUNITAKE; MII, 1995).

Alguns fatores influenciam o sucesso da cultura de protoplastos; entre eles destacam-se: genótipo, estado fisiológico da planta, idade do explante, solução enzimática adequada para digestão da parede, tempo de incubação na solução enzimática, agitação, concentração e tipos de estabilizadores osmóticos, densidade de cultivo, métodos de cultivo, meios de cultura, luminosidade e temperatura. Fatores como idade e exposição ou não à luz influenciaram o rendimento do isolamento de protoplastos de *Passiflora edulis*. Explantes mais jovens (6 dias) com cotilédones não expostos à luz isolaram maior quantidade de protoplastos (MATOS et al. , 2005).

Desinfestação do Material Trabalhado

A manipulação dos protoplastos deve ser realizada em condições assépticas. Quando não são utilizadas plantas in vitro, os tecidos devem ser desinfestados previamente. Recomenda-se um método mais suave, por causa da sensibilidade dos protoplastos ao estresse fisiológico dos explantes. Os explantes são, usualmente, desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5-1% (água sanitária diluída em função da concentração de cloro ativo presente), durante 5 a 20 minutos, com ou sem agitação e, em seguida, lavados três vezes com água destilada autoclavada. Tanto a concentração de hipoclorito quanto o tempo e o modo de desinfestação variam com o tipo e a idade do tecido (CARNEIRO, et al; 1998).

Digestão da Parede Celular

A parede celular dos vegetais é constituída basicamente de celulose, hemicelulose e pectina. As fibras de celulose e hemicelulose dão rigidez à parede, enquanto a pectina mantém juntas as células adjacentes. Embora os constituintes básicos sejam os mesmos, a composição da parede celular varia muito entre espécies e diferentes tecidos da mesma planta, o que requer a definição de um sistema específico para digestão da parede celular (CARNEIRO, et al. 1998).

A prática mais utilizada para a degradação da parede celular é o uso de enzimas pectocelulolíticas; a seleção das enzimas e a concentração são importantes para o isolamento de protoplastos viáveis a partir de qualquer tipo de tecido vegetal. As enzimas pectocelulolíticas foram usadas, a princípio, na indústria para produção de sucos de frutas. Elas são isoladas de microorganismos simbóticos, parasitas ou sapróficos que degradam naturalmente as paredes celulares (CARNEIRO, et al., 1998).

Das enzimas em questão, a celulase Onozuka R 10, que é extraída de *Trichoderma viride*, possui duas importantes atividades celulolíticas - descristalização de cadeias e despolimerização da celulose; a pectinase Macerozyme R10, de *Rhizopus s.p.*, tem uma importante atividade endopoligalacturonase, desdobrando, assim, a pectina; a celulase Driselase, do fungo *Irpea lacteus*, possui atividades pectinolítica e celulolítica. Pode-se ainda citar, entre as preparações utilizadas, a celulase Cellulysin, a hemicelulase Rhozyme e a pectinase Pectolyase Y23.

Graças à descoberta e à melhoria das enzimas, atualmente pode-se obter grande quantidade de protoplastos (MATSUMOTO, 2001).

A degradação da parede celular ocorre em meio líquido, o qual deverá conter os principais componentes que favoreçam a ação enzimática; um pH ótimo e, principalmente, uma pressão osmótica que dê estabilidade aos protoplastos recém-liberados. O período ótimo de digestão da parede celular na solução de enzimas deve ser determinado para cada genótipo, tipo de explante e mistura enzimática (CARNEIRO, et al., 1998).

Para manter os protoplastos viáveis estes devem ser purificados para remover as enzimas residuais da digestão da parede celular, os grupos de células não digeridas e os fragmentos celulares. Podem-se purificar os protoplastos em solução de sacarose a 21%. Nessa solução, os protoplastos irão flutuar, após centrifugação de 120 g por 10 min, podendo ser coletados com auxílio de uma pipeta (MEGIA et al.; 1992).

O cultivo de protoplastos é feito em meio de cultura rico em componentes orgânicos e inorgânicos, suplementado com fitorreguladores e concentrações adequadas de polissacarídeos, que funcionam como estabilizadores osmóticos (VIEIRA, 1997).

O tamanho médio dos protoplastos depende da espécie analisada e do explante utilizado, podendo variar de 19 a 47 mm, quando isolados de tecidos de folhas, ou de 30 a 60 mm, quando os protoplastos derivam de tecidos cotiledonares (DORNELAS; VIEIRA, 1996).

Fusão de Protoplastos

Técnica de transformação de espécies não aparentadas com a qual se rompem os limites impostos pela propagação sexual. A fusão de protoplastos tem possibilitado combinar características citoplasmáticas em várias espécies de plantas, nas quais cloroplastos e mitocôndrias são maternalmente bloqueados na hibridação sexual (CHENG et al., 2003).

A indução da fusão pode ser alcançada, utilizando-se tratamentos químicos ou físicos comuns. Em ambos os casos, a fusão é um processo de dois estágios. Primeiro os protoplastos têm que ser aproximados para contato próximo entre membranas, onde o grau de adesão da membrana plasmática depende dos protoplastos parentais (BINSFELD, 1999).

As técnicas utilizadas procuram favorecer a agregação dos protoplastos e induzir a desestabilidade das membranas. A utilização de altas concentrações de Ca^{+2} no meio de fusão possibilitou os primeiros sucessos em fusão de protoplastos (KELLER; MELCHERS, 1973). Com a descoberta das propriedades fusogênicas do polietileno-glicol (PEG), tornou-se habitual o uso desta técnica (KAO; MICHAYLUK, 1974). As soluções salinas neutralizam as cargas negativas das membranas e o PEG pode formar pontes moleculares entre certas proteínas da membrana, o que facilita as agregações dos protoplastos (VOS et al, 1976; ALDWINCKLE et al, 1982). Segundo Grosser e Gmitter Junior (1990), esta técnica é eficiente, barata e não influência na viabilidade dos protoplastos.

Em outro método, o da eletrofusão, os protoplastos são submetidos a um campo de corrente alternada (AC), da alta freqüência, tornam-se dipolos transitórios, com um lado da superfície celular mais negativo que outro

(ZIMMERMAN, 1982). Os protoplastos se alinham conforme as linhas do campo elétrico, formando verdadeiras cadeias. Uma vez alinhados os protoplastos, são aplicados pulsos de corrente contínua (DC), de alta voltagem. Este tratamento gera poros temporários nas membranas, onde se iniciam as fusões (ZIMMERMAN, 1982; TEMPELAAR; JONES, 1985). Apesar do custo de aquisição do aparelho ainda ser alto, a fusão por corrente elétrica tem sido amplamente usada porque tem facilidade na manipulação e alta reprodutividade de resultados (MATSUMOTO, 2001).

Segundo Olivares-Fuster et al. (2005), um novo método eletroquímico, incorpora as vantagens dos dois processos, baseando-se na agregação química de células com uma baixa concentração de PEG e a subsequente aplicação de pulsos de corrente contínua. A aplicação deste protocolo é direta e os resultados são consistentes com respeito à formação de heterocáries e desenvolvimento pós-fusão, sendo um método eficiente de regeneração de híbridos somáticos e híbrido de Citrus. Logo após a fusão, os protoplastos são inoculados em meio contendo nutrientes, onde plantas poderão ser regeneradas.

Assani et al. (2005) compararam a eficiência de dois métodos de fusão mais utilizados em diferentes espécies: químico (tratamento dos protoplastos com PEG, polietileno glicol) e elétrico; verificaram que, em banana, a eficiência de fusão foi maior com PEG, mas a eletrofusão foi melhor com relação à taxa de atividade mitótica e, ao tempo, para a formação de microcalos e regeneração de plantas. Tanto por eletrofusão quanto por PEG, as fusões celulares ocorrem ao acaso, podendo haver fusões entre as células da mesma origem e de células de origens distintas. Além disso, podem-se ter células ainda não fundidas, dificultando a identificação dos possíveis híbridos. Para auxiliar na identificação dos híbridos pode ser realizada uma pré-seleção utilizando marcadores morfológicos como tamanho, espessura e coloração da folha e espessura do pseudocaule, seguida de citometria de fluxo para determinar o nível de ploidia (ASSANI et al., 2005) e/ou marcadores moleculares (MATSUMOTO et al., 2002). O RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) consiste em um dos marcadores moleculares mais utilizados, por se tratar de uma técnica simples, de baixo custo e que necessita de pequenas quantidades de DNA genômico (OLIVEIRA et al., 2001, 2002).

A fusão de protoplastos colaborou no melhoramento genético de diversas culturas economicamente importantes como batata, plantas ornamentais, citrus, brassicas e cereais (DAVEY et al., 2005).

Hibridação Somática

A fusão de protoplasto não é um evento dirigido. Ela pode ocorrer entre protoplastos de uma mesma espécie, formando homocários, ou entre espécies diferentes, dando origem aos heterocários. Nos heterocários, é necessário utilizarem-se marcadores morfológicos, que permitam a identificação dos protoplastos oriundos das espécies envolvidas na fusão.(VIEIRA,1997).

Segundo Liu et al. (2005) a fusão de células somáticas tem potencial de aplicação no melhoramento genético em casos de alta incompatibilidade sexual ou barreiras de reprodução entre espécies não relacionadas, inclusive pela recombinação de novas combinações dos genomas nuclear e/ ou citoplasmático. Dessa maneira a hibridação somática abriu inúmeras possibilidades para manipulações do genoma tais como:superação de incompatibilidades sexuais, produção de anfidiplóides, transferência de parte de um genoma de uma espécie para outra, transferência do DNA citoplasmático para a produção de plantas macho- estéreis, produção de plantas resistentes a estresses ambientais ou pragas e doenças (BINSFELD,1999).

Por esse método é possível combinar genomas mesmo incompatíveis e, portanto, isolados reprodutivamente, obtendo-se uma fusão de núcleos de uma espécie a outra a ser melhorada. Uma célula híbrida somática é totipotente e capaz de desenvolver-se como planta, através de embriões ou organogênese.

A hibridação somática foi obtida pela primeira vez por Carlson et al.(1972), resultando na fusão de protoplastos de *Nicotiana glauca* e *Nicotiana langedorffii*, conseguindo-se o primeiro híbrido somático no vegetal (PIERIK, 1990).

Esta prática também é utilizada para se multiplicarem geneticamente campos, sementes propagadas, espécies estéreis e indivíduos de ciclos longos.

A fusão de protoplastos é considerada uma ferramenta útil para a produção de híbridos somáticos tetraplóides, que serão usados como parentais em cruzamentos com diplóides ou para a obtenção direta de híbridos somáticos triplóides mediante a fusão de protoplastos haplóides e diplóides (ASSANI et al., 2003).

A hibridação somática é uma alternativa promissora para cultura da banana, porque a maioria das cultivares é geneticamente triplóides, produz poucas sementes ou quase nenhuma e apresenta falta de variedade e resistência a doenças (MATSUMOTO, 2001). A técnica de fusão de protoplastos, que permite a combinação assexual do genoma de duas plantas diferentes, constitui uma alternativa para superar a esterilidade e aumentar a variabilidade genética em bananeira (ASSANI et al., 2005).

Na cultura de Citrus, há vários fatores que impedem o aumento da produtividade. O melhoramento genético é imprescindível e a técnica da fusão de protoplastos constitui-se em nova e viável alternativa, produzindo híbridos somáticos potencialmente capazes de gerarem variedades superiores (BENEDITO, et al., 2000).

A hibridação somática é uma técnica promissora para o melhoramento genético do maracujá e demanda protocolos de estabelecimento in vitro, organogênese adventícia e muitas vezes, cultura de células em suspensão, bem estabelecidos.

Embora a hibridação somática tenha sido mencionada na década de 80, como a biotécnica que poderia revolucionar a agricultura e as pesquisas de melhoramento de plantas, esta previsão nunca se materializou e esforços na pesquisa têm mudado em direção as estratégias da biologia molecular. Razões para que a técnica não tenha tido o impacto esperado incluem dificuldades no isolamento de protoplastos, cultivo e regeneração de

plantas e elevados níveis de ploidia (GROSSER, et al., 2000). Muitas vezes não se conseguem controlar as ações dos genes não desejáveis. Por essa razão, a hibridação somática completa está atualmente sendo aplicada em culturas limitadas (MATSUMOTO, 2001).

Regeneração da Parede Celular

Após o isolamento dos protoplastos, estes são cultivados em meio nutritivo com auxina e citocinina, sendo estimuladas a divisão celular e a regeneração da parede.

É importante ressaltar que a regeneração da parede do protoplasto ocorre em um sistema in vitro, onde a formação de novas paredes e a química dos polímeros poderiam diferenciar-se das paredes originais.

O comportamento dos protoplastos varia; embora alguns protoplastos sejam incapazes de formar parede, em sua maioria, formam paredes completas da célula original.

Muitos trabalhos realizados sobre a regeneração da parede celular esclarecem sobre sua composição, sua função e sua formação posteriormente. Mas como se inicia este processo da membrana no protoplasto, ainda é desconhecido.

Divisão Celular

As densidades de cultivo, métodos de cultivo e meios de cultura empregados vão influenciar na indução e na manutenção da divisão celular e na obtenção de colônias e microcalos.

Após a regeneração da parede celular, que deve ocorrer nas primeiras 24h de cultura, as células entram em divisão. As primeiras divisões são observadas em freqüências que variam dependendo do genótipo e da

espécie com que se está trabalhando. Na medida em que se sucedem as divisões celulares, pequenas colônias vão se formando, originárias de uma única célula. No decorrer de 28 dias em cultura, as microcolônias podem ser vistas a olho nu, podendo então ser transferidas para meio sólido, onde darão origem a calos (VIEIRA, 1997).

Embora sejam células desprovidas de parede celular, os protoplastos vegetais não podem ser vistos como análogos de células animais, mas como células injuriadas que devem passar por um processo de recuperação antes de serem capazes de sustentar divisões (FEHÉR; DUDITS, 1994).

As divisões celulares podem ser acompanhadas facilmente em microscópio. Em protoplastos de fumo, as primeiras divisões ocorrem no terceiro dia de cultura; no quarto dia, de 60 a 80% dos protoplastos já estão divididos (NAGATA; TAKEBE, 1970).

Usualmente os protoplastos são cultivados no escuro até o início das primeiras divisões; algumas culturas necrosam com a presença da luz, devendo ser mantidas sobre baixa luminosidade até a fase de calos. A temperatura ótima para divisão dos protoplastos em cultura varia entre as diferentes espécies.

A divisão de células derivadas de protoplastos pode ser favorecida pelo contato com uma cultura de células sadias em crescimento (CARNEIRO, et al., 1998).

Calo

Calos são definidos como massas celulares desorganizadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*.

Com a fusão dos protoplastos, estes são cultivados até a fase de calo e, em seguida, colocados em meio de regeneração de brotos. Na fase de calo, pode-se proceder à seleção pela análise de padrões eletroforéticos de

proteínas totais e de isoenzimas. Nas análises eletroforéticas, o padrão de bandas das espécies mistura física das amostras revela um padrão que corresponde à soma das bandas parentais que serve como controle para a identificação dos híbridos somáticos verdadeiros (VIEIRA, 1997).

Entretanto, em alguns casos, protoplastos podem regenerar embriões somáticos diretamente sem passar pela fase de calo (CARNEIRO, et al., 1998).

Plantas Híbridas Regeneradas

A habilidade para regenerar plantas a partir de células e tecidos em cultivo é um componente essencial na biotecnologia para a manipulação genética e o melhoramento vegetal (POLCI; FRIEDRICH, 2004).

Protoplastos provenientes de um dos genitores deve apresentar potencial embriogênico como requerimento para regeneração de plantas, permitindo que a formação de embriões seja um processo espontâneo após a fusão de protoplastos (GLÓRIA, et al., 2000).

As células de um organismo totipotente são capazes de dividirem-se em tecidos e órgãos. A falta de crescimento dessas células podem ser devido a uma inadequada nutrição do ambiente físico ou a uma instabilidade genética, que poderia ser causada por certas condições de cultivo. uma instabilidade genética, que poderia ser causada por certas condições de cultivo. Os protoplastos mantidos em meio para sua conservação, algumas vezes produzem massa de calos que se rediferenciam formando embrióides, chegando até mesmo a regenerar plantas.

Alguns fatores determinam as possibilidades de êxito para regenerar uma planta a partir de protoplastos (BINDING et al., 1982 citado por PIERIK 1990), como a família, a espécie, o genótipo e o estado de diferenciação das células dominantes de transporte, das células juvenis e das células dos ápices de brotos.

A regeneração de brotos ocorre posteriormente à formação de calos, sob condições de luz e em meio cuja composição varia muito entre grupos de plantas - tais como monocotiledôneas e dicotiledôneas, gramíneas e leguminosas - e não há como generalizá-la. Esse processo de regeneração pode ocorrer pela via organogênica ou por embriogênese somática (VIEIRA, 1997). A regeneração de plantas a partir de protoplastos via embriogênese somática tem sido obtida em numerosos genótipos de citros, pois calos nucelares e suspensões celulares se constituem numa excelente fonte de protoplastos totipotentes (GROSSER; GMITER JÚNIOR, 1990).

O fato de se poder regenerar uma planta a partir de um único protoplasto torna vantajoso o método de transformação via protoplasto, em relação aos demais. É necessário, no entanto, estabelecer métodos de regeneração de plantas a partir de protoplastos, o que muitas vezes pode ser um processo demorado porque cada espécie ou, às vezes, cada genótipo exige ajustes específicos na cultura para a regeneração, limitando sua aplicação generalizada.(CARNEIRO, et al.,1998).

Conclusão

A utilização de protoplastos permite aos pesquisadores inovar estratégias para o melhoramento genético de espécies vegetais, pela obtenção de plantas transgênicas, de híbridos somáticos ou pela seleção de mutantes, além de estudos do desenvolvimento vegetal, da expressão e regulação de genes e de estudos bioquímicos da síntese da parede celular, entre outros.

Obtenção e cultivo de protoplastos são fáceis de manipular e não requerem equipamentos sofisticados, mas os procedimentos necessitam de alguns ajustes específicos de acordo com a cultura utilizada.

A fusão de protoplastos é uma alternativa viável para o melhoramento de uma espécie, pela introdução de um gene ou para a produção de híbridos interespecíficos de cruzamentos incompatíveis.

Referências Bibliográficas

- ALDWINCKLE, T. S. ; AHKONG, Q.F.;BANGHAM, A.D.; FISCHER, D.; LUCY, J.A. Effects of polyethylene glycol liposome and erythrocytes: permeability changes and Membrane fusion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam v. 689, p.548-560, 1982.
- ASSANI, A.; BAKRY, F.; KERBELLEC, F.; HAICOUR, R.; WENZEL, G.; FOROUGHI-WEHR, B. Production of haploids from anther culture of banana [(Musa balbisiana (BB)]. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 511-516, 2003.
- ASSANI, A.; CHABANE, D.; HAICOUR, R.; BAKRY, F.; WENZEL, G.; FOROUGHI-WEHR, B. Protoplast fusion in banana (Musa spp.): comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture Hague**, n. 83, p. 145-151. 2005.
- BENEDITO, V. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agrícola**, Piracicaba v. 57, n. 1, jan/mar. 2000. Disponível na Internet: < www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0103-901 >. Acesso em: 14 fev. 2007.
- BINSFELD, P. C. **Production and characterization of interspecific transgenic plants in the genus Helianthus using microprotoplast technique**. Göttingen :Cuvillier Verlag, 1999.
- CARLSON, P. S.; SMITH, H. H.; DEARING, R. D. Parasexual interspecific plant hybridization. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 69, p. 2292- 2294, 1972.
- CARNEIRO, V. T. C.; CONTROI, T.; BARROS, L. M. G; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, p. 413-458.

COCKING, E. C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. **Nature**, London, n. 187, p. 962- 963, 1960.

CHENG, V. L.; GUO, W. W.; DENG, X. X. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa Kunquat(*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 445-451, 2003.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant protoplasts :status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, p. 131-171, 2005.

DORNELAS, M. C. **Cultura e fusão de protoplastos de Passiflora spp.** 1995. 182 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. **A Fusão de protoplastos como um recurso auxiliar ao melhoramento genético vegetal.** Ribeirão Preto: SBG, 1996. v. 3.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplasts cultures of *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. Cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 103-106, 1993.

VAZ, F. B. D; SANTOS, A. V. P.; 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* Deg.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, p. 220-225, 1993.

FÉHER, A.; DUDITS, D. Plant protoplasts for cell fusion and direct DNA uptake: culture and regeneration systems. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kleuwer, 1994. p. 71-118.

GROSSER, J. W.; GMITTER JÚNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York , v. 8, p. 339-374, 1990.

GROSSER, J. M.; OLLITRAULT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Invited review: somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, London, v. 36, p. 434-449, 2000.

KAO, K. N.; MICHAYLUK, M. R. A method for high- frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. **Planta**, Berlin, v. 115, p. 355-367, 1974.

KELLER, W. A.; MELCHERS, G. The affect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, Tübingen, v. 28, p. 737-741, 1973.

KLERCKER, J. A. Eine methone sur isoleirung labender protoplasten. **Swenka Vet' Akademia Forth Stockholm**, Stockholm, v. 9, p. 463- 471, 1892.

KUNITAKE, H.; MII, M. Somatic embryogenesis in Citrus species. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.280-298. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 30).

LIU, J.; XU, X.; DENG, X. Intergeneric somatic hibridization and its application to crop genetic improvement. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, p. 19-42, 2005.

MATOS, G. V. C.; PASSOS, I. R. S.; BINSFELD, P. C.; DORNELAS, M. C.; SCOTT, M. D. S.; SAWASAKI, H. E.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C. Hibridação somática em Passiflora spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Resumos... Águas de Lindóia: SBG**, 2005. 1 CD-ROM.

MATSUMOTO, K. Híbridos somáticos: fusão celular para a obtenção de híbridos interespécies de banana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 4, n. 20, p. 26-28, maio/jun. 2001.

MATSUMOTO, K.; VILARINHOS, A. D.; OKA, S. Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. **Euphytica: netherlands journal of plant breeding**, Wageningen, v. 125, p. 317-324, 2002.

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; ROSSIGNOL, L.; SIHACHAKR, D. Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa* sp.) **Plant Science**, Limerick, v. 85, p. 91-98, 1992.

GLÓRIA, F. J. M. da; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Plant regeneration from protoplast of brazilian citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 4, p. 727-732, 2000.

NAGATA, T.; TAKEBE, I. Cell wall regeneration and cell division isolated tobacco mesophyll protoplasts. **Planta**, New York, v. 92, p. 301-308, 1970.

OLIVARES-FUSTER, O.; DURAN-VILA, N; NAVARRO, L. Eletrochemical protoplast fusion in citrus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, p. 112 -119, 2005.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VIDOSO, C. A.; MACHADO, C. A. Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 4, p. 479-484, 2002.

OTONI, W. C. **Hibridização e embriogênese somática e transformação genética em espécies de Passiflora**. 1995. 198 p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; BINSFELD, P. C.; ROSALES, M. B.; SCOTT, M. D. S.; SAWASAKI, H. E.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; SIQUEIRA, W. J. Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration in species of the genus *Passiflora*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR, 12., CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR, 9., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: SBBC, 2004. 1 CD-ROM.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundiprensa, 1990. 258 p.

POLCI, P.; FRIEDRICH, P. Parte III: métodos para generar variabilidad: hibridação somática. In: ECHEIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biotecnología y mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004. p. 97-108.

TEMPELAAR, M. J. ; JONES, M. G. K. Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields. **Planta**, New York, v. 165, p. 205-216, 1985.

VIEIRA, M. L. C. Hibridação somática em plantas A importância das espécies selvagens como fonte de genes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, p. 36-40, 1997.

VOS, J.; AHKONG, Q. F.; BOTHAM, G. M.; QUIRK, S. J.; LUCY, J. A. Changes in the distribution of intramembranous particles in hen erythrocytes during cell fusion induced by the bivalent ionophore. **Biochemistry Journal**, v. 158, p. 651-653, 1976.

ZIMMERMAN, V. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 694, p. 227-277, 1982.



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

