

Extração de protoplastos de *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*

Karina Lôbo Hajdu



Trabalho de finalização do Curso Médio Técnico de Biotecnologia

Professora Dra. Maria Antonia Malajovich

Instituto de Tecnologia ORT de Rio de Janeiro

Ano 2014



Resumo

Este projeto tem como objetivo a extração e análise comparativa de protoplastos de folhas de alface lisa (*Lactuca sativa*) e folhas de rúcula (*Eruca sativa*), dois dos vegetais mais comuns na mesa da população brasileira. Ao longo do projeto, foram realizadas diversas extrações, tanto de alface e rúcula, quanto de folhas alternativas, como a de boldo, para comparação morfológica.

A extração dos protoplastos vegetais baseia-se na digestão enzimática da parede celular vegetal, que é composta principalmente por celulose (25-30%), hemicelulose (15-25%) e pectina (35%). Um dos principais aspectos a se considerar ao extrair protoplastos é a utilização de um agente osmótico no meio de extração, pois a célula vegetal em ausência de sua parede torna-se frágil e sujeita à lise celular. (Figura 1). Como agentes osmóticos para esta série de extrações, foram utilizadas soluções de Manitol 13% (aproximadamente 0,7M), Sorbitol 13% (aproximadamente 0,7M) e Sacarose 21% (aproximadamente 0,6M). As extrações nas quais o agente utilizado foi o Manitol mostraram-se superiores àquelas nas quais se usou o Sorbitol, e por isso a solução de Manitol passou a ser utilizada prioritariamente.

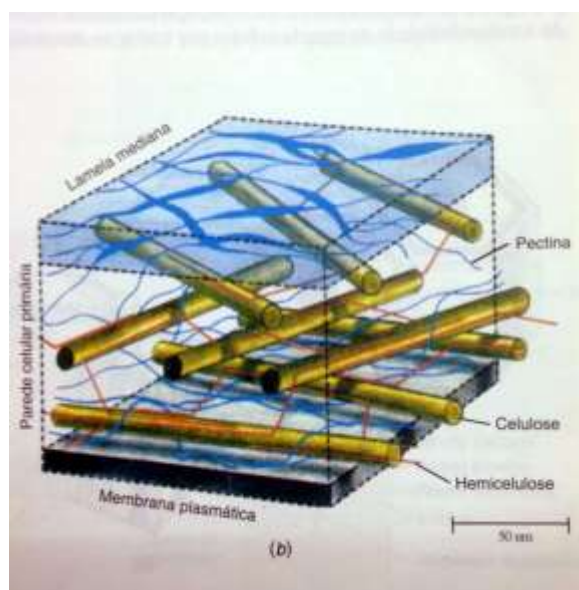


Figura 1. Representação esquemática da parede celular vegetal, segundo Raven *et al.*

Sumário

Introdução	Página 4
Material e Métodos	Página 5
Resultados e Discussão	Página 9
Conclusão	Página 11
Anexos	Página 12
Referências	Página 14
Agradecimentos	Página 15

Protoplastos e seus diferentes usos

O termo protoplasto é derivado da palavra grega *protoplasma*, a qual é utilizada para designar o conteúdo das células. Genericamente, protoplastos podem ser definidos como células sem a parede celular, que pode ser removida tanto por métodos enzimáticos quanto mecânicos. Assim, a célula fica com a sua membrana exposta, sendo esta a única barreira entre o meio intra-celular e o ambiente. Os protoplastos comumente utilizados são os vegetais, embora também existam diversas referências na literatura acerca da obtenção de protoplastos de fungos, especialmente de leveduras.

Os protoplastos apresentam usos em diversas áreas da ciência e até mesmo na indústria. Podem ser induzidos a fundir, produzindo um híbrido, por exemplo. Híbridos de formação inviável devido à incompatibilidade sexual ou física da espécie podem ser formados por fusão de protoplastos. Seu cultivo *in vitro* também é amplamente realizado, pois estes têm a capacidade de regenerar plantas inteiras.

Além disso, os protoplastos são capazes de ingerir material extracelular, como DNA, tendo um importante uso na engenharia genética, podendo ser usados para a produção de diversas enzimas e compostos amplamente utilizados na indústria farmacêutica. A técnica da transformação por protoplastos, aonde um protoplasto com DNA modificado é inserido em fungos ou bactérias, é utilizada para a produção destas substâncias.

O “scale-up” de protoplastos, ou seja, a obtenção de grande quantidade de células é feita em sua maioria por meio de biorreatores. Suspensões celulares são as melhores fontes para a extração de protoplastos para propósitos de fusão, transformação e introdução de organelas. Os Biorreatores de imersão permanente em geral são os mais utilizados para a micropropagação massal de plantas, mais especificamente para a cultura de células isoladas, calos ou de protoplastos.

Material e métodos

Para a realização das extrações, foi utilizado o seguinte material:

Material Vegetal:

Folhas frescas de rúcula (*Eruca sativa*)

Folhas frescas de alface lisa (*Lactuca sativa*)

Folhas frescas de boldo (*Plectranthus barbatus*)

Folhas de bortalha (*Basella alba*)

Reagentes:

Solução de sacarose 1%

Solução de Manitol 13%

Mix de enzimas – Celulase 5% (Celluclast®) e Pectinase 5% (Ultrazyme®)

Vidraria:

Pipeta 10 mL

Pipeta 1mL

2 tubos de ensaio

1 bastão de vidro fino

2 béquers de 50 mL

Outros:

Pipeta Pasteur

Pipeta automática 10 μ L

Ponteira

Faca

Azulejo

Estante para tubos

Pinça

18 microtubos

Papel de filtro

Lã de vidro

Banho-maria a 37° C

Mini centrífuga

Lamina e lamínula para microscópio óptico

As extrações ao longo do período foram baseadas em um protocolo geral, adaptado do livro “NCBE - Practical Biotechnology for schools and colleges”, dividido em cinco etapas: Preparo de soluções; Preparo das folhas; Digestão e Filtração; Centrifugação; Recuperação e Análise.

1. Preparo de Soluções

Solução de sacarose 1%:

Pesar 0,21g de açúcar em um béquer. Dissolver o conteúdo em 1 mL de água destilada e transferir para um tubo de ensaio.

Solução de Manitol 13%:

Pesar 3,25g de Manitol em um béquer. Dissolver o conteúdo em 25 mL de água destilada e transferir para um tubo de ensaio.

Mix de enzimas:

Em um tubo de ensaio, pipetar 1,8 mL de água destilada, 0.1 mL de celulase (Celluclast) e 0.1 mL de pectinase (Ultrazyme).

2. Preparo das Folhas

Com a pinça, retirar a epiderme inferior da folha (ver anexos) em questão e cortá-la em pedaços pequenos de aproximadamente 5mm x 5mm. Adicionar os pedaços a um tubo com 9,5 mL da solução de Manitol 13% e incubar durante aproximadamente 5 min no Banho-maria.

3. Digestão e Filtração

Com a pipeta de 1mL, pipetar 0,5 mL do mix de enzimas no tubo com o Manitol e os pedaços de alface e retorná-lo ao Banho-maria por 20 min, agitando cuidadosamente de tempos em tempos. Filtrar o conteúdo (esta etapa sofreu variações ao decorrer das extrações, tendo sido realizada com funil e papel de filtro ou com lã de vidro). Passar o conteúdo para 9 tubos de centrífuga (1 mL em cada um) e encher mais 9 tubos com 1mL de água, de modo a balancear a centrífuga corretamente.

4. Centrifugação

Colocar os microtubos na centrífuga e centrifugar por 5-7 min a 2000 rpm. Quando o rotor parar totalmente, retirar os tubos e desligar a centrífuga. É importante não rotacionar os protoplastos acima de 2500 rpm, levando em consideração sua fragilidade, pois sua membrana celular pode romper-se.

5. Recuperação e análise

Descartar o líquido sobrenadante dos microtubos com uma pipeta pasteur. Ressuspender os protoplastos, adicionando 10 μ L da solução de sacarose 21%. Com a pipeta pasteur, adicionar 2 gotas do conteúdo à uma lâmina de microscópio devidamente limpa e seca e cobrir com a lamínula. Observar ao microscópio com a objetiva 40x.

Resultados e Discussão

As primeiras extrações ocorreram com certa dificuldade. A etapa de filtração dos protoplastos após a ação enzimática foi especialmente complexa, pois o papel de filtro, usado inicialmente, contém poros muito pequenos para a passagem das células (que medem cerca de 50 μ m) e a ausência de filtração resulta em uma lâmina repleta de fragmentos de tecido vegetal. A lã de vidro, semelhante a uma fina rede de náilon, foi utilizada posteriormente e demonstrou bons resultados, possibilitando lâminas claras e de fácil visualização.

A bateria de extrações deixou claro que tanto as folhas de alface como as de rúcula, se jovens e frescas, são ideais para a obtenção de protoplastos, por terem uma epiderme inferior fácil de ser removida e possibilitarem a obtenção de protoplastos em boa condição e número. As células de *Eruca sativa*, entretanto, mostraram precisar de mais alguns minutos de ação enzimática para terem sua parede celular completamente digerida (Figura 2).

Morfologicamente, é notável a diferença de tamanho entre as células das duas espécies. Os protoplastos de rúcula mostraram-se consideravelmente maiores que os de alface, chegando a medir quase o dobro destes. Em um trabalho posterior, seria interessante utilizar uma lente óptica específica para medição ou uma abordagem fotográfica, podendo verificar esta observação.

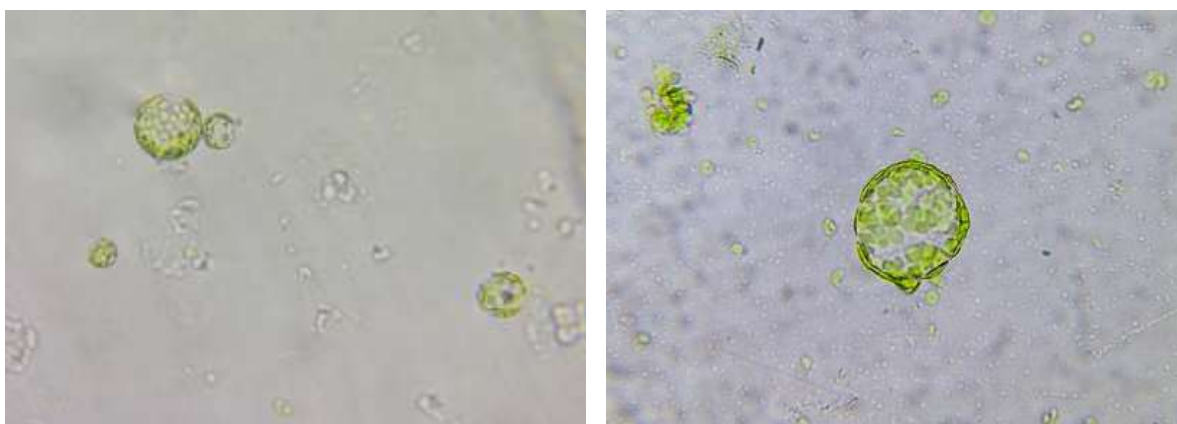


Figura 2. Protoplastos de Rúcula e Alface. À esquerda, protoplastos de *Lactuca sativa*. À direita, protoplasto de *Eruca sativa*. (Aumento: 400X)

Além das extrações principais, foi realizado o procedimento com folhas de Bertalha (*Basella alba*) e Boldo-da-terra (*Plectranthus barbatus*), que foram possibilidades logo descartadas, pois as duas plantas possuem uma epiderme inferior difícil de ser retirada, retardando o trabalho e tornando-o menos produtivo. No caso do Boldo, o excesso de tricomas nas folhas gera uma camada “aveludada” sobre a epiderme foliar, dificultando sua retirada com pinça (Figura 3).



Figura 3. Boldo e Bertalha. À esquerda, folha de Boldo-da-terra, também conhecido como Boldo-de-jardim ou Boldo brasileiro. À direita, protoplasto extraído de Bertalha com a membrana celular rompida (Aumento: 400X).

Conclusão

A série de extrações com os diferentes vegetais ao longo do período trouxe esclarecimentos sobre os tipos de folhas mais adequados à técnica e acerca do estudo da morfologia celular em si, que pôde ser observada nos protoplastos. Foi possível identificar a presença de muitos cloroplastos, especialmente nas folhas de rúcula. Os protoplastos foram ainda comparados com a morfologia dos tecidos vegetais, observados posteriormente (ver anexos).

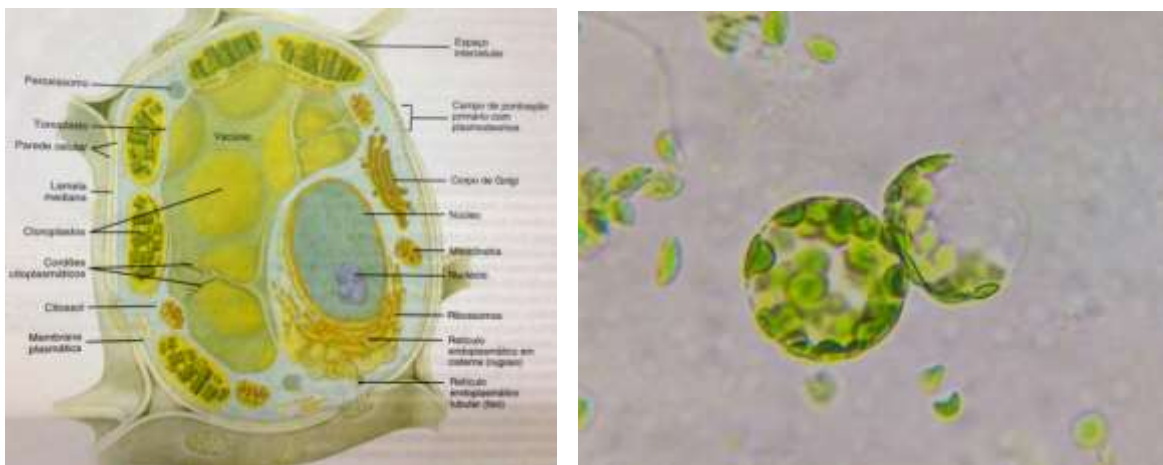


Figura 4. Comparação entre a representação esquemática (Raven, Evert & Eicchorn) de uma célula vegetal e protoplastos obtidos de rúcula. A representação mostra a parede celular, ausente no protoplasto à direita. O vacúolo e os cloroplastos são visíveis no protoplasto de *Eruca sativa* (Aumento: 400X).

Anexos

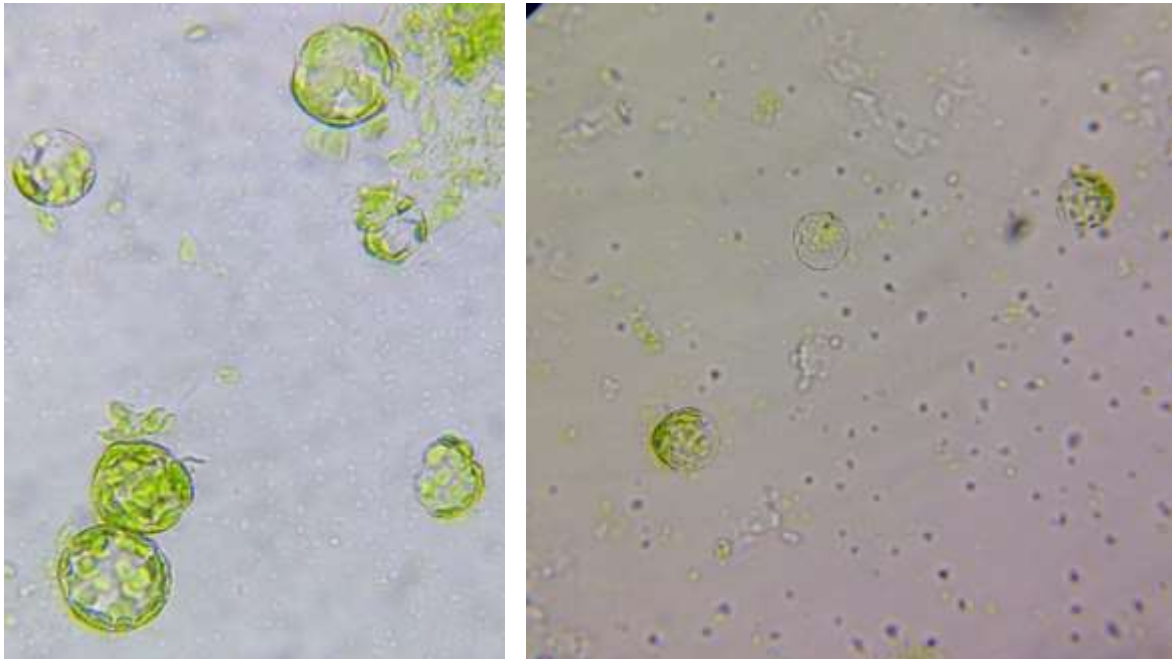


Figura 1. Protoplastos de *Eruca sativa* à esquerda e de *Lactuca sativa* à direita (Aumento: 400X).

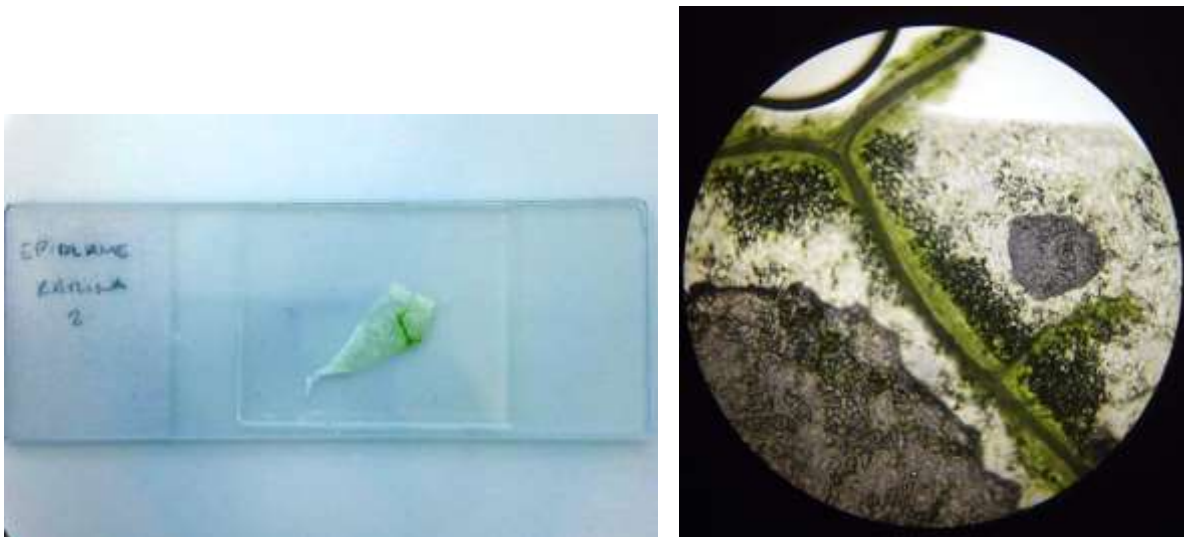


Figura 2. Epiderme inferior. À direita, lâmina com corte sagital de epiderme inferior de *Eruca sativa*. À esquerda, a epiderme inferior com um aumento de 400X.

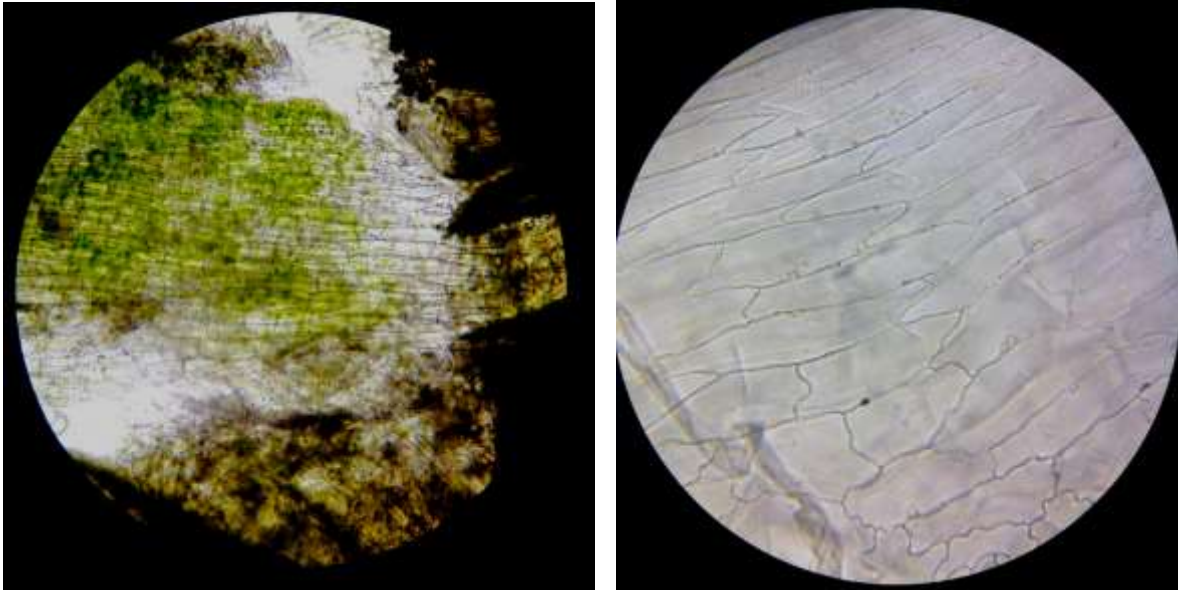


Figura 3. Morfologia da folha de *Eruca sativa* à esquerda (Aumento: 100X) e de *Lactuca sativa* à direita (Aumento: 400X), mostrando células alongadas em seu estado natural, ou seja, com a parede celular.

Referências

DODDS, JOHN H.; ROBERTS, LORIN W. – Experiments in plant tissue culture, terceira edição, 1995 – Isolation and culture of protoplasts.

RAVEN, PETER H.; EVERT, RAY F.; EICCHORN, SUSAN E. – Biologia Vegetal, sexta edição, 2001.- Editora W.H Freeman.

NCBE - Practical Biotechnology for schools and colleges, 1993 – Plant protoplasts.

MARTINS, C.V.B; HORII, J.; PIZZIRANI, A.A; KLEINER. - Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de H₂S, 1998.

FAPESP – Biblioteca Virtual - Estudo da técnica de transformação por protoplastos em *Bacillus megaterium* para a produção de Penicilina G Acilase recombinante:

<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/129507/estudo-da-tecnica-de-transformacao-por-protoplastos-em-bacillus-megaterium-para-a-producao-de-penici/>

Slideshare – Fusão de protoplastos e transformação em fungos:

<http://pt.slideshare.net/AdrianaDantas2/fuso-de-protoplastos-em-fungos>

EMBRAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Noções de cultivo de tecidos vegetais:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/16668/1/DOC116.PDF>

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC-Centro de Ciências Agrárias – CCA – LFDGV – Apostila de Biotecnologia 1: <http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila.htm>

Agradecimentos:

Gostaria de reconhecer ao Instituto de Tecnologia ORT por prover a oportunidade de trabalhar em um ambiente técnico profissional.

A meus pais pela criação em um ambiente de incentivo ao estudo e à curiosidade desde jovem e por me introduzirem ao mundo da ciência e à coordenadora e professora do Curso de Biotecnologia Dra. Maria Antonia Malajovich.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA ORT

Rua Dona Mariana 213 - Botafogo

CEP 22280-020 - RJ - BRASIL

Tel. (021) 2539-1842 / FAX (021) 2527-0843

<http://ort.org.br>