



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISABELLY MARIA BARROS DE LIMA

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO DE
PROTOPLASTOS A PARTIR DE RAIZ DE *Jatropha curcas***

FORTALEZA

2018

ISABELLY MARIA BARROS DE LIMA

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS A
PARTIR DE RAIZ DE *Jatropha curcas*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial na obtenção do título de Bacharel em
Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis de
Paiva Campos.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L698e Lima, Isabelly Maria Barros de.
Estabelecimento de protocolo para isolamento de protoplastos a partir de raiz de *Jatropha curcas* / Isabelly Maria Barros de Lima. – 2018.
42 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.
1. *Jatropha curcas*. 2. Protoplasto. 3. Sintase do Casbeno. I. Título.

CDD 570

ISABELLY MARIA BARROS DE LIMA

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS A
PARTIR DE RAIZ DE *Jatropha curcas*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial na obtenção do título de Bacharel em
Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis de
Paiva Campos.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. José Roberto da Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Fabiano de Moura Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Teresinha de Paula Barros, minha avó
Mainha. Sinto sua falta todos os dias.

AGRADECIMENTOS

À minha mamãe, **Marta Maria de Paula Barros**, pelo enorme amor, por sempre me apoiar e por acreditar em mim até mesmo quando eu não acredito. Obrigada por ser a melhor mãe que eu poderia ter.

Ao **Prof. Francisco A. P. Campos**, pelas grandes oportunidades.

À minha irmã, **Lara Paula Barros de Lima**, por ser uma pessoa que eu amo tanto, mesmo sempre me irritando. Sei que você também me ama.

À minha ótima amiga, **Manuella Maciel** (Manu), por sempre estar comigo nos bons momentos e principalmente nos ruins.

Aos meus colegas de laboratório, **Evanildo, Domingos, Moab, Thais e Vitor**, pelas aventuras que passamos juntos. Agradeço especialmente ao **Fabiano** e ao **Roberto**, por me ajudarem até demais.

À **Dra. Emanoella Lima Soares**, pelos ensinamentos e ajuda constante. Obrigada por me aturar durante 2 meses em Gembloux. Very nice.

Ao meu pai, **Cleber Lopes de Lima**, pelos anos bons.

RESUMO

Jatropha curcas J. é uma espécie popularmente chamada de pinhão manso. Serve para diversas aplicações econômicas, mas se destaca principalmente como uma alternativa para a produção de biocombustível a partir do óleo extraído de suas sementes. O “bolo” gerado durante essa extração contém entre 24 e 28% de proteína em base seca e poderia ser utilizado para a alimentação animal, entretanto essa prática não é realizada porque a semente tem alta concentração tóxica devido a presença de diterpenos (ésteres de forbol). A biologia molecular oferece o possível bloqueio da síntese dos ésteres de forbol através do silenciamento de genes responsáveis pelo desenvolvimento desses compostos, especialmente na sintase do casbeno (SC), uma enzima que atua na reação que gera o casbeno, precursor da maioria dos diterpenos de Euphorciaceae. Existem 3 genes identificados com comprovada atividade de sintase de diterpenos, uma perspectiva para essa linha de pesquisa é utilizar a técnica CRISPR/Cas9 para bloquear tais genes, regenerando assim plantas de *J. curcas* com nenhuma ou, pelo menos, baixa toxicidade. Mas para a realização desse procedimento é necessário o uso de protoplastos da planta a ser modificada, protocolo esse que o pinhão manso não possui. Por isso nesse trabalho focou-se o isolamento de protoplastos de raiz de *J. curcas*, já que o gene e a proteína para a SC foram encontrados mais significativamente nas raízes e é esperado que a expressão gênica dos protoplastos isolados mantenham os padrões do tecido de origem. O isolamento de protoplastos foi baseado no protocolo de Deryckere et al. (2012) para plantas do gênero *Cichorium*, com certas adaptações para se ajustar às necessidades da *J. curcas*. As plantas foram desenvolvidas em 3 condições: *in vivo*, *in vitro* e hidroponia. Foram utilizados pedaços de 1,5 a 2 cm da extremidade da raiz (região da coifa) cortados longitudinalmente em pedaços de 2 mm em microscópio estereoscópio, removendo o estelo central, e colocados em solução P0 (pH 5,5). Em seguida, as raízes foram colocadas em solução P0 adicionada de 1% de celulase e 0,5% de macerozyme. Essas raízes ficaram no escuro sobre leve agitação, durante 16h, para a digestão da parede celular do tecido. Os resultados não apresentaram grandes discrepâncias dentre os testes individuais: baixo rendimento de protoplastos viáveis e grande concentração de debris (fragmentos de células e tecidos). Apesar dos resultados esperados não terem sido obtidos, esse trabalho servirá como base para eventuais pesquisas futuras que desejem isolar protoplastos de raízes de *J. curcas*, já que define algumas de suas muitas peculiaridades.

Palavras-chave: *Jatropha curcas*. Protoplasto. Sintase do Casbeno.

ABSTRACT

Jatropha curcas J. is a species popularly known as physic nut. It serves several economic applications, but it stands out mainly as an alternative to produce biofuel made with the oil extracted from its seeds. The "cake" generated during this extraction contains from 24 to 28% of protein in a dry basis and could be used to feed animals, however this practice is not performed because the seed has a high concentration of toxic substances due to the presence of diterpenes (phorbol esters). Molecular biology offers the possible blockade of the phorbol esters synthesis by silencing the genes responsible for the development of these compounds, especially in casbene synthase (CS), an enzyme that acts on the reaction that generates casbene, the precursor of most diterpenes of Euphorciaceae. There are 3 genes identified with proven activity for diterpene synthase, one perspective for this line of work is to use the CRISPR / Cas9 technique to block such genes, thus regenerating *J. curcas* plants with no or at least low toxicity. But for the accomplishment of this procedure is necessary to use protoplasts of the plant to be modified, such protocol is not available for the physic nut yet. Therefore, in this research the isolation of root protoplasts of *J. curcas* was the focus, since both the gene and the protein for the CS were found more significantly in the roots and it is expected that the gene expression of the isolated protoplasts maintain the patterns of the original tissue. Isolation of protoplasts was based on the protocol published by Deryckere et al. (2012) for plants of the *Cichorium* genus, with certain adaptations to fit the needs of *J. curcas*. The plants were developed in 3 conditions: *in vivo*, *in vitro* and hydroponics. Pieces from 1.5 to 2 cm of the root tip were cut longitudinally into 2 mm pieces under a stethoscope microscope, removing the central stele, and placed in P0 solution (pH 5.5). The roots were then placed in P0 solution with 1% cellulase and 0.5% macerozyme. These roots were left in the dark with gentle shaking for 16 hours, so that the digestion of the cell wall of the tissue could occur. The results did not present great discrepancies among the individual tests: low yield of viable protoplasts and high concentration of debris (cell and tissue fragments). Although the expected results have not been obtained, this work will pose as a basis for possible future researches that wish to isolate protoplasts from roots of *J. curcas*, since it defines some of its many peculiarities.

Keywords: *Jatropha curcas*. Protoplast. Casbene Synthase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura dos ésteres de forbol.....	06
Figura 2 – <i>Jatropha curcas</i> L. desenvolvida <i>in vivo</i>	14
Figura 3 – <i>Jatropha curcas</i> L. em crescimento hidropônico.....	15
Figura 4 – Características das sementes e do embrião de <i>Jatropha curcas</i> L.	15
Figura 5 – Protoplastos isolados a partir de raízes de <i>Jatropha curcas</i> L.	20
Figura 6 – Protoplastos isolados a partir de folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> L.	20
Figura 7 – Protoplastos isolados a partir de raízes de <i>Jatropha curcas</i> L. desenvolvidas em hidroponia	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio P0 (pH 5,5)	16
Tabela 2 – MS Macro elements	16
Tabela 3 – Heller Micro elements	17
Tabela 4 – Morel Wetmore vitamins	17
Tabela 5 – MC2	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CS	Casbene Synthase
DTT	Ditiotreitol
LMPA	Low Melting Point Agarose (Agarose com baixo ponto de fusão)
SC	Sintase do Casbeno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3	REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1	<i>Jatropha curcas</i> J.	4
3.2	Toxicidade	5
3.3	Protoplastos	6
3.4	Aplicabilidade de protoplastos	8
3.5	Comparação entre raízes e folhas de <i>Jatropha curcas</i>	11
3.6	Isolamento de protoplastos	11
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Desenvolvimento de raízes de <i>Jatropha curcas</i>	14
4.2	Isolamento de protoplastos	15
4.3	Quantificação dos protoplastos	18
5	RESULTADOS	19
6	DISCUSSÃO	23
7	CONCLUSÃO	26
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

Jatropha curcas J., é uma Euphorbiaceae popularmente chamada de pinhão manso, é um arbusto oleaginoso da família Euphorbiaceae que serve para diversas aplicações econômicas, mas se destaca principalmente como uma alternativa para a produção de biocombustível, apresentando as vantagens de poluir menos que os combustíveis de origem fóssil e ser originado a partir de fonte renovável (DRUMOND et al., 2016). No Brasil, o cultivo dessa espécie tem grande potencial, já que ela é favorecida pelo clima tropical, além de ser resistente à seca (CARIOCA et al., 2009).

A semente de *J. curcas*, em específico, é usada para extração de óleo que subsequentemente produz o biodiesel, cujas vantagens excedem as do diesel puro à base de petróleo (WEYERHAEUSER et al., 2007). Como essa semente apresenta um elevado conteúdo proteico, o resíduo gerado durante a extração do óleo (chamado de “bolo”) contém entre 24 e 28% de proteína em base seca (MALVIYA et al., 2011), portanto esse “bolo” poderia ser usado para a alimentação animal, para que cada resíduo fosse aproveitado, evitando o desperdício. Entretanto, essa prática não é possível, já que a semente é altamente tóxica, devido a presença de diterpenos, os ésteres de forbol (FUJIKI et al., 2017).

Mesmo com múltiplas tentativas de técnicas de processamento, nenhuma conseguiu eliminar efetivamente a toxicidade do resíduo gerado (NWALA; AKANINWOR; MONANU, 2013). Uma alternativa seria o uso de técnicas moleculares de edição gênica. A biologia molecular oferece o possível bloqueio da síntese desses ésteres de forbol através do silenciamento de genes responsáveis pelo seu desenvolvimento. A enzima sintase do casbeno (SC) é uma das grandes responsáveis pela formação desses ésteres, já que atua na reação que gera o casbeno, precursor da maioria dos diterpenos de Euphorbiaceae (KIRBY et al., 2010).

Existem 14 genes identificados como possíveis geradores da sintase do casbeno no genoma de *J. curcas* (SOARES, 2015), 3 desses com comprovada atividade de sintase de diterpenos (KING et al., 2014). Uma perspectiva para essa linha de pesquisa é utilizar a técnica CRISPR/Cas9 para editar os genes citados, possivelmente regenerando assim plantas de pinhão manso com nenhuma ou, pelo menos, baixa toxicidade.

CRISPR/Cas9 é um sistema de edição gênica capaz de cortar a fita dupla de DNA em posições precisas, através do direcionamento de um RNA guia (CONG et al., 2013). É uma técnica com muitas vantagens, dentre elas a não inserção de DNA recombinante no

cromossomo da planta, gerando uma dúvida se resulta ou não em Organismos Geneticamente Modificados (OGM) (WALTZ, 2016).

Para a aplicação dessa técnica, é essencial o uso de protoplastos da planta a ser modificada, como mencionam várias publicações (GAO et al., 2014; ANDERSSON et al., 2016; TIAN et al., 2016). Por isso a necessidade de se estabelecer um protocolo para isolamento de protoplastos. Protoplasto é definido como uma unidade biológica composta pelo núcleo da célula e os materiais protoplasmáticos circundantes, ou ainda, simplesmente a célula sem a parede celular.

Nesse trabalho, focou-se o isolamento de protoplastos de raiz de *J. curcas* porque análises proteômicas (PINHEIRO et al., 2013) e gênicas (NAKANO et al., 2012) não encontraram a proteína ou o gene para a SC na semente, apesar de sua elevada toxicidade. Já na raiz, foi encontrada a expressão de 9 dentre os 14 genes candidatos para a enzima, mais do que na semente (1) e na folha (1), sugerindo que os ésteres de forbol e/ou seus precursores devem ser sintetizados na raiz, transportados e acumulados na semente e em outros órgãos (SOARES, 2015). É esperado que a expressão gênica dos protoplastos isolados mantenham os padrões do tecido de origem.

Portanto, pesquisas futuras poderão usar o protocolo aqui estabelecido como base para trabalhos de edição gênica de *J. curcas* através da técnica CRISPR/Cas9 (ou até mesmo outras pesquisas com o protoplasto dessa espécie). Assim, será possível otimizar o uso dessa Euphorbiaceae, ao extrair o óleo para produzir biodiesel e utilizar o “bolo” gerado para alimentar animais ou como fertilizante, e, conseqüentemente, aproveitar cada recurso oferecido pelo pinhão manso.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo para o isolamento de protoplasto a partir de raiz de *Jatropha curcas*.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar a concentração ideal de enzimas para a digestão da parede celular das raízes de *Jatropha curcas*.

Encontrar o melhor tempo de digestão para o isolamento de protoplastos de raiz de *Jatropha curcas*.

Determinar a melhor forma de crescimento de *Jatropha curcas* para isolamento de protoplastos a partir de raiz.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Jatropha curcas* J.

Jatropha curcas J. (figura 1) é altamente distribuída nos trópicos e subtropicais. É um arbusto resistente à seca, com galhos que podem se ramificar até alcançar 5 ou 6 metros de altura. Pertence à família Euphorbiaceae, representando uma planta oleaginosa (CARIOCA et al., 2009). Essas características fazem dessa espécie uma ótima alternativa para produção de biocombustível no Brasil, frente a necessidade de desenvolvimento de combustíveis alternativos causados pela crise energética mundial. A vantagem desse produto é que polui menos do que os de origem fóssil (petróleo), além de ser renovável (DRUMOND et al., 2016). *J. curcas* é também usada na produção de medicamentos, sabão e diversos cosméticos em múltiplos países tropicais.

Essa espécie, popularmente chamada de pinhão manso, possui sementes que são altamente tóxicas, mas que, ao mesmo tempo, apresentam grande potencial para extração de óleo que produz o biodiesel, especialmente em seu endosperma. O diesel misturado de *Jatropha* tem várias vantagens em relação ao diesel puro à base de petróleo, em particular devido ao seu maior número de cetano, maior ponto de fulgor e menor teor de enxofre (WEYERHAEUSER et al., 2007).

A planta como um todo pode ser usada para o controle da erosão, como cerca para gado, para fazer papel e como madeira para combustível. As folhas são usadas como anti-inflamatório, como biopolímero e como estrume orgânico. O látex é também utilizado com fins medicinais e como biopolímero. Os frutos se destacam para a melhoria do solo, para a produção de biogás e para combustão direta. As sementes são usadas como pesticida e, também, para a combustão direta, além disso, fornecem o óleo, que é usado para fins medicinais, como inseticida, para a fabricação de sabão e diversos cosméticos, para a transformação em biopolímero e, como já foi citado, para a produção de biodiesel (GÜBITZ, 1999; ACHTEN et al., 2008).

Além disso, a semente apresenta elevado conteúdo proteico, sendo comparado positivamente com a da soja, oferecendo um bom balanço de aminoácidos essenciais, com exceção da lisina (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998), e nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, zinco, cobre e manganês (MONIRUZZAMAN; YAAKOB; KHATUN, 2016). O resíduo gerado durante a extração do óleo contém entre 24 e 28% de proteína em base seca (MALVIYA et al., 2011), portanto poderia

ser utilizado para a alimentação animal, fertilização orgânica e em outros métodos sustentáveis. Entretanto, devido a presença de diterpenos tóxicos, os ésteres de forbol (FUJIKI et al., 2017), esse material não pode ser utilizado para tal fim. Embora várias técnicas de processamento tenham sido tentadas, nenhum tratamento conseguiu eliminar completamente os princípios tóxicos do “bolo” gerado após a extração do óleo de *Jatropha* (NWALA; AKANINWOR; MONANU, 2013).

3.2 Toxicidade

Quando animais consomem o bolo gerado pela extração do óleo da semente de *Jatropha*, a maioria dos experimentos mostram sintomas clínicos como diarreia, redução do consumo de água, perda de apetite, dispneia (respiração rápida e curta) e olhos encovados (RAKSHIT et al., 2008). A ingestão acidental de sementes de *Jatropha* por crianças de 3 a 5 anos levou a inquietação, vômitos severos e desidratação (LEVIN et al., 2000). Em 1987, Horiuchi e colaboradores demonstraram que uma porção purificada a partir do óleo da semente mostrou atividade que induz a promoção de tumor, em um experimento carcinogênico de dois estágios em pele de ratos.

Metabólitos secundários de plantas podem ser classificados em 3 categorias amplas: terpenos ou terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos. Os compostos classificados como terpenos, nos quais se incluem os ésteres de forbol presentes no pinhão manso, são vitais em muitos organismos exercendo controle metabólico e mediando relações inter e intraespecíficas, como, por exemplo, polinização e defesa (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010).

Mas além disso, os ésteres de forbol (figura 1) são os grandes responsáveis pela toxicidade especialmente das sementes de *J. curcas*, sua interação com a proteína quinase C afeta a atividade de várias enzimas, biossíntese de proteínas, DNA, poliaminas, processos de diferenciação celular e expressão gênica (SOARES, 2015).

Kirby e colaboradores (2010) consideram o casbeno como precursor da maioria dos diterpenos de Euphorbiaceae, baseando-se na prevalência da enzima sintase do casbeno (SC) nessa família, assim como na associação do casbeno com a via biossintética de outros diterpenos e na falta de candidatos alternativos. Do mesmo modo, a própria estrutura do casbeno ajuda nessa teoria, já que forma o esqueleto de carbono composto por quatro anéis, o tigliano, que por sua vez é o formador dos ésteres de forbol (GOEL et al., 2007).

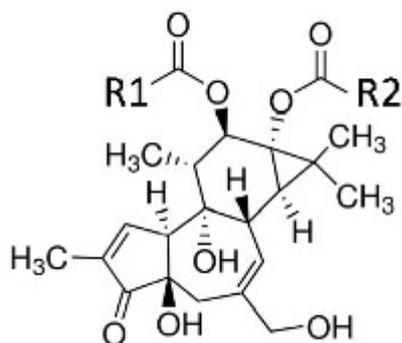


Figura 1: Estrutura dos ésteres de forbol. Fonte: Wardhani, Hidayat e Hastuti (2016).

Soares (2015) identificou 14 supostos genes para a sintase do casbeno nas sequências genômicas de *J. curcas*, baseando-se nas sequências já descritas para a enzima; Dentre esses, 3 cujos produtos gênicos foram comprovados terem atividade de sintase de diterpenos (KING et al., 2014). Portanto, a partir de estudos mais aprofundados, será possível identificar quais desses genes realmente estão envolvidos na síntese dos ésteres de forbol, para que subsequentes tentativas de silenciar tal gene sejam melhores direcionadas.

3.3 Protoplastos

O termo protoplasto foi proposto por Von Hanstein em 1880 para definir uma célula inteira, excluindo sua parede celular. Hoje, de maneira geral, é definido como uma unidade biológica composta pelo núcleo da célula e os materiais protoplasmáticos circundantes. Desde a primeira vez que foi isolado, possui aplicação em diversas áreas da biologia, em especial na biologia molecular.

Klercker, já em 1892, conseguiu isolar mecanicamente um número relativamente baixo de protoplastos a partir de folhas de *Stratiotes aloïde* L. (conhecido popularmente como soldados d'água) ao seccionar o tecido depois do mesmo ser plasmolisado. Mas essa técnica permaneceu pouco usada, até que em 1960 se deu o primeiro uso de enzimas para a degradação da parede celular, quando Cocking utilizou celulase fúngica em folhas de *Lycopersicon esculentum* L. (tomate), inaugurando o início de uma nova era nas pesquisas com protoplastos. Isso porque o tratamento enzimático, já que comercialmente disponível, permitiu que muitos pesquisadores tivessem acesso a um isolamento reproduzível, que logo virou rotineiro, de um número relativamente elevado de protoplastos a partir de múltiplos órgãos e tecidos de várias espécies de plantas, especialmente aquelas espécies pertencentes à família Solanaceae.

Entre as décadas de 1960 e 1970 os protoplastos isolados dispostos em meio de cultura exibiram a capacidade de formar parede celular e se submeter a subseqüentes divisões celulares que levam à formação de micro colônias, devido à aplicação combinada de citocinas e auxinas na cultura (ROEST; GILISSEN, 1989). Desde então, desenvolveram-se os experimentos pioneiros que envolviam formação de calos a partir de protoplastos isolados. Já em 1971, Takebe e colaboradores obtiveram pela primeira vez plantas completas regeneradas a partir de protoplastos, usando plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), provando a totipotência dessas células, o que significa que eles têm a capacidade de se desdiferenciar, reentrar no ciclo celular, passar por repetidas divisões mitóticas e depois proliferar ou regenerar vários órgãos.

Em 1972, Carlson e colaboradores conseguiram combinar as técnicas de isolamento de protoplastos a partir de folhas para regenerar plantas inteiras com as também já existentes técnicas para estimular experimentalmente a fusão desses protoplastos a partir de condições manipuladas, conseguindo com sucesso a regeneração das primeiras plantas híbridas interespecíficas. Ambas as espécies usadas para tal regeneração pertencem à família Solanaceae, sendo *Nicotiana langsdorffii* e *N. glauca*.

Binding, em 1985, e Maheshwari et al. em 1986, listaram cerca de 100 espécies de plantas cujos procedimentos de regeneração foram descritos com sucesso. Já em 1989, foi reportado por Roest e Gilissen que dos protoplastos de 212 espécies de plantas superiores, representando 96 gêneros de 31 famílias, foram desenvolvidas colônias de células e calos, que se regeneraram em estruturas semelhantes a embriões ou brotos. Eeckhaut et al. (2013) trazem uma tabela com 41 espécies cujo isolamento e regeneração de protoplastos estão bem estabelecidos. Não existem dados mais recentes sobre esse ponto, entretanto o fato é que a cada ano o número de espécies regeneradas com sucesso cresce, isso mostra um pouco do potencial que essas células sem parede celular possuem.

Pesquisas com espécies pertencentes à família Euphorbiaceae ainda são escassas, mas dentre as mais comuns se destacam as com mandioca, mamona e espécies do gênero *Euphorbia*, supostamente pelo potencial econômico dessas plantas. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) teve seu protoplasto isolado a partir de folha com sucesso em 1980 por Shahin e Shepard, seguido por regeneração com formação de raiz; Contrastando com essa pesquisa, em 2017, Wu e colaboradores melhoraram o protocolo disponível para a mandioca usando folhas para otimizar as concentrações de celulase e maceroryme para obter o maior número possível de protoplastos viáveis. Para a mamona (*Ricinus communis* L.), Nishimura e Beevers

(1978) preparam protoplastos a partir do endosperma isolado, tratando-o com uma mistura de enzimas comerciais que incluiu macerozyme e celulase. Já para as espécies de *Euphorbia*, em 1994, Redenbaugh e colaboradores publicaram um método para isolar protoplastos a partir de folhas de *Euphorbia lathyris* com o método enzimático, seguido de fusão com protoplastos da mesma espécie isolados através de outra metodologia. Já em 2014, Pitzschke e Persak descreveram uma técnica simples para isolamento com alto rendimento de protoplastos e subsequente transformação a partir de folhas vermelhas da Euphorbiaceae popularmente denominada papagaio ou poinsétia (*Euphorbia pulcherrima*).

Recentemente, algumas pesquisas envolvendo protoplastos de *J. curcas* vêm sendo realizadas. Em 2014, Tudses, Premjet e Premjet testaram 14 combinações de solução enzimática, tempo de incubação e concentração osmótica do meio para isolamento de protoplastos de *J. curcas* e *R. communis* tendo folhas e calos como matéria prima. Foi mostrado nesse trabalho 7 horas como o melhor tempo para a solução enzimática agir digerindo os tecidos nas duas espécies, e a melhor concentração osmótica para o pinhão manso foi manitol 0,7 M. Em 2015, o mesmo grupo testou a fusão dos protoplastos das duas espécies acima isolados a partir do mesmo método, conseguiram fusão com viabilidade entre 26 e 80%.

Entretanto, dentre as publicações sobre *J. curcas*, destaca-se a falta de pesquisas apresentando raiz como o material de origem dos protoplastos. Até mesmo dentro da família Euphorbiaceae esse déficit perdura. Portanto, dentre outros pontos, esse fato realça a importância do presente trabalho dentro do meio científico.

Grandes avanços nas áreas de genômica, proteômica e metabolômica têm estimulado um interesse renovado nessas células sem parede celular e osmoticamente frágeis. Procedimentos bem estabelecidos estão disponíveis para isolar e regenerar protoplastos de uma enorme gama de plantas, dentre essas se incluem mono e dicotiledônias. Para que expressem a totipotência e que, conseqüentemente, desenvolvam-se em plantas férteis, diversos parâmetros devem ser considerados como influenciadores no isolamento de protoplastos, em particular o tecido de origem, o meio de cultura e os fatores ambientais.

3.4 Aplicabilidade de protoplastos

Durante os últimos quinze anos, o interesse na pesquisa de protoplastos foi renovado, parcialmente devido ao antagonismo do público em relação aos organismos geneticamente modificados, já que protoplastos são usados em diversas técnicas de edições gênicas, sendo algumas dessas geradoras de organismos que não são considerados transgênicos.

Assim que o isolamento de protoplastos se tornou rotineiro para os pesquisadores, surgiram pesquisas para avaliar o comportamento da célula de acordo com diferentes concentrações osmóticas. Em 1984, por exemplo, Gordon-kamm e Steponkus mostraram que os protoplastos isolados sofrem extensas alterações volumétricas quando expostos a soluções hipo ou hipertônicas, dependendo das propriedades biofísicas das suas membranas plasmáticas, como permeabilidade à água, tensão superficial, eficiência de troca de materiais entre membrana plasmática e reservatórios de membrana, entre outras características. Outro exemplo é o trabalho de Lee, Mitiku e Endress (2001) que avalia os efeitos de Al^{3+} no comportamento osmótico de protoplastos isolados.

Em eletrofisiologia vegetal, pesquisas com protoplastos se expandiram com o surgimento da técnica patch-clamp, desenvolvida por Neher e Sakmann em 1976 que lhes rendendo o prêmio Nobel em 1991. Com esse método é possível medir, com alta sensibilidade, as correntes que passam através de uma única proteína do canal iônico celular, fornecendo informações específicas sobre os mecanismos moleculares do transporte iônico. Por exemplo, Shabala e colaboradores (1998) mediram o fluxo e a variação de íons em protoplastos isolados, utilizando H^+ e Ca^{2+} como referências principais, em diferentes tempos, posições e concentrações osmóticas.

A formação de tecidos, órgãos e sistemas também é estudada através dos protoplastos. É possível identificar, desse modo, associações entre organismos durante seu desenvolvimento que afetam as morfogêneses de cada um. Um exemplo dessas pesquisas foi publicado em 2014 por Fukui e colaboradores, sendo esse o primeiro trabalho sobre bactérias que induzem a morfogênese normal em protoplastos de plantas marinhas: foram utilizados protoplastos isolados a partir de *Pyropia yezoensis* para selecionar bactérias capazes de induzir morfogênese nessa alga vermelha.

Dentre as pesquisas sobre as características celulares, estuda-se uma etapa essencial para a regeneração de protoplastos: a formação da parede celular. Esses estudos com protoplastos em cultura permitem a análise do padrão de regeneração da parede celular (arranjo de fibras de celulose, sequência de síntese de polissacarídeo), bem como o exame de alterações na composição da mesma durante a aquisição do potencial mitótico (WISZNIEWSKA; PIWOWARCZYK, 2014).

Protoplastos podem ser usados ainda para estudar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos de vegetais. Em 1975, Nishimura e Akazawa publicaram um trabalho em que

mostram a relevância de protoplastos de espinafre (*Spinacia oleracea* L) para se estudar mecanismos de fotossíntese e fotorrespiração, com uma grande vantagem de poder manipular “células nuas da folha” para a preparação de tais estudos. O mesmo time de pesquisadores publicou no ano seguinte uma metodologia para isolar cloroplastos e outras organelas de protoplastos de folhas de espinafre, sendo um dos primeiros a conseguir protoplastos intactos, dada a fragilidade de tais materiais celulares (NISHIMURA; GRAHAM; AKAZAWA, 1976).

Outra utilização dessa célula é a fusão de protoplastos ou fusão somática. Esse fenômeno fisiológico ocorre quando protoplastos de duas ou mais espécies entram em contato e aderem um ao outro, seja espontaneamente ou através de soluções que induzam esse acontecimento. Após a adesão, gradativamente as membranas dos protoplastos se fundem em algumas áreas até que eventualmente os citoplasmas se misturam. Essa fusão gera hibridização das espécies e tem se tornado uma importante ferramenta para a manipulação da ploidia em esquemas de melhoramento vegetal, possibilitando que células somáticas de diferentes cultivares, espécies ou gêneros sejam combinada, resultando em novas combinações genéticas alotetraplóides e autotetraplóides (GROSSER; GMITTER, 2010).

A fusão de protoplasto é um método comum no melhoramento de microrganismos, e pode superar algumas dificuldades na construção de células geneticamente modificadas (WANG et al., 2009). Para a área de controle de poluição ambiental, a fusão somática é considerada uma técnica nova e reformadora (CHEN et al., 2012). Por exemplo, Chen e colaboradores (2012) publicaram um trabalho cujo foco foi isolar protoplastos da bactéria *Pseudomonas putida* e do fungo *Psathyrella candolleana* e, em seguida, fundi-los para aprimorar a degradação de clorofenóis nos descendentes.

Protoplastos são utilizados também para a modificação genética de plantas, uma ferramenta que se desenvolveu de forma promissora para a biotecnologia. A entrega do gene para a planta, envolvendo a introdução de genes exógenos às células vegetais, possui vários métodos, como, por exemplo, transformação mediada por Agrobactéria, mediada por vírus, bombardeamento biobalístico e método de eletroporação. Entretanto, a maioria desses métodos sofre com algumas limitações, incluindo a baixa eficácia de transferência, o alto custo e certas restrições de espécies possíveis de serem utilizadas (ZHENG et al., 2017). Em 1979, Motoyoshi e Oshima já descreviam condições ótimas para inocular protoplastos de tomate com RNA do vírus mosaico do tabaco.

Desde a primeira vez que foi demonstrado que a técnica CRISPR/Cas9 é capaz de cortar a fita dupla de DNA em posições precisas (GARNEAU et al., 2010), as pesquisas nessa área estão cada vez mais comuns. Vale citar que uma das vantagens de usar essa técnica de modificação é que nenhum DNA recombinante é introduzido ou mantido nos cromossomos da planta, gerando uma discussão se essas técnicas resultam em eventos que deveriam ou não ser regulados como Organismos Geneticamente Modificados (OGM) (WALTZ, 2016). Atualmente, os protoplastos estão sendo utilizados para a realização dessa edição genética. Por exemplo, Tian et al. (2016) reportam com sucesso uma mutação de knock-out em protoplastos de melancia (*Citrullus lanatus*) através de CRISPR/Cas9. Já Andersson et al. (2016) conseguiram completo knock-out do gene GBSS em batata (*Solanum tuberosum*) com CRISPR/Cas9, através de expressão transiente e regeneração de protoplastos isolados. Gao e colaboradores (2014), utilizando a mesma técnica, descreveram a aplicação de CRISPR/Cas9 para mediar mutagênese alvo em *N. tabacum*, sem acontecer mutações fora do alvo.

No caso do presente trabalho, um objetivo futuro seria utilizar a técnica CRISPR/Cas9 para bloquear a síntese de ésteres de forbol através do bloqueio do gene (ou dos genes) da sintase do casbeno. Por isso a importância do estabelecimento de um protocolo para isolar protoplastos de raiz de *J. curcas*.

3.5 Comparação entre raiz e folha de *Jatropha curcas*

Apesar das sementes apresentarem altas concentrações de ésteres de forbol, através de análises proteômicas (PINHEIRO et al., 2013) e gênicas (NAKANO et al., 2012) não foram encontradas nela a expressão nem da proteína, nem do gene para a SC. A partir disso, existe a possibilidade de que os ésteres de forbol sejam sintetizados em outros órgãos da planta e transportados para a semente.

Através de análise da expressão dos genes por meio de qPCR (PCR em tempo real), Soares (2015) encontrou a expressão, dos 14 genes candidatos, 9 desses na raiz, 1 na folha e 1 no embrião, indicando que os ésteres de forbol e/ou seus precursores podem ser sintetizados na raiz, transportados e acumulados na semente.

Portanto, apesar da maioria dos protocolos estabelecidos para protoplastos focar no isolamento a partir de folhas, nesse trabalho se objetivou o isolamento a partir de raízes, baseando-se na expressão gênica e proteômica descritas por outros autores. Isso é importante para que pesquisas futuras possam utilizar o protocolo aqui estabelecido para isolar protoplastos

e editá-los para silenciar genes referentes a SC, pois se espera que a expressão desses genes no protoplasto siga os modelos do tecido de onde foram isolados, ou seja, da raiz.

3.6 Isolamento de protoplastos

Para um protoplasto ser isolado, é necessário que as células sejam separadas do tecido e das junções celulares, como também é preciso digerir a parede celular que circunda as células vegetais. Para melhor rendimento, aconselha-se o uso de materiais jovens, pois as células ainda estão crescendo, portanto, a parede é tipicamente uma camada delgada e flexível (0.1–1 μm) (COSGROVE, 2005), sendo sua digestão mais fácil.

Apesar de ser fina, a parede celular forma uma conexão que funciona como um cinto, comprimindo e dando forma ao protoplasto interior. Essa parede consiste primariamente de polissacarídeos complexos e uma pequena quantidade de proteínas estruturais (COSGROVE, 2005), com composição de fibras de celulose (15-40%) formando uma rede que está embutida na matriz de pectina; as células adjacentes estão ligadas pela lamela média composta principalmente de pectina (COSGROVE; JARVIS, 2012). Para remover essa estrutura e isolar os protoplastos existem dois métodos: o mecânico e o enzimático.

No método mecânico, as células são primariamente plasmolisadas para retrain a membrana plasmática da parede celular, resultando em células com formatos diferentes dependendo da origem do tecido que está passando pelo tratamento. Quando essas células plasmolisadas são cortadas, as vezes é possível cortar através da parede externa sem danificar as estruturas internas e, como resultado, têm-se protoplastos isolados mecanicamente (COCKING, 1972). Esse foi essencialmente o método usado em 1892 por Klercker para o primeiro isolamento de protoplastos, como já citado. Entretanto, esse método não é muito utilizado atualmente, já que apenas quando os tecidos são plasmolisados por longos períodos há alguma chance de se obter protoplastos, não sendo possível utilizá-lo para células mais meristemáticas. Sua única possível vantagem seria a ausência de efeitos danosos das enzimas adicionadas (no método enzimático) na estrutura e na atividade metabólica dos protoplastos isolados (COCKING, 1972).

Já o método enzimático, muito mais utilizado (como foi o caso dessa pesquisa), tem como uma das vantagens ser aplicável em muitas instâncias de ambas células vegetais maduras e meristemáticas. Nesse método, o tecido é primeiramente cortado para expor maior área superficial, é em seguida plasmolisado (não por longos períodos) para depois ser digerido com uma solução enzimática. É possível utilizar uma variedade de enzimas combinadas, dentre elas

a celulase que geralmente é atrelada à pectinase e/ou macerozyme (COCKING, 1972). Ruesink (1971) listou três grandes vantagens para o uso do método enzimático ao invés do mecânico: (a) um número maior de protoplastos são obtidos; (b) é necessário menos encolhimento osmótico do citoplasma; e (c) as células não são quebradas como resultado de cortes.

A quantidade e a viabilidade dos protoplastos isolados depende enormemente do tecido de origem escolhido (KRENS; JAMAR, 1989). O isolamento pode ser feito diretamente através de partes diferentes da planta inteira com regiões de tecido parenquimatoso macio (como folhas jovens completamente expandidas ou raízes recém-formadas), ou indiretamente através de tecidos cultivados *in vitro* (como calos). Suspensões celulares também podem ser usadas.

O isolamento a partir de raízes foi feito inicialmente baseado no método para folhas de tabaco descrito por Power e Cocking (1968), com certas modificações. Dá-se preferência para o uso das pontas das raízes jovens, já que ali está o meristema apical, onde as células são capazes de divisão celular repetitiva das quais se originam todos os tecidos da raiz primária (DILCHER; CRONQUIST, 2018), favorecendo a regeneração dos protoplastos isolados.

Várias espécies já foram utilizadas para isolar protoplastos a partir de raiz, como, por exemplo: *Arabidopsis thaliana* (MATHUR; KONCZ; SZABADOS, 1995); milho (*Zea mays*) (GRONWALD; LEONARD, 1982); *Maesa lanceolata* (LAMBERT; GEELEN, 2010); feijão-da-china (*Phaseolus aureus*) (XU; DAVEYE; COCKING, 1981); *Brassica* (XU; DAVEYE; COCKING, 1982); várias espécies de *Citrus* (BONA et al, 2009); arroz (*Oryza sativa*), aveia (*Avena sativa*), ervilha (*Pisum sativum*) e cevada (*Hordeum vulgare*) (WAGATSUMA; AKIBA, 1989); dentre muitas outras. Os protocolos de todos esses isolamentos são bastante semelhantes ao protocolo aqui testado, podendo variar, por exemplo, alguma concentração das soluções utilizadas para a digestão das paredes celulares das raízes. Entretanto, não existe nenhuma pesquisa publicada com protoplastos de *Jatropha curcas* isolados com sucesso a partir de raiz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenvolvimento de raízes de *Jatropha curcas*

A partir de sementes de *Jatropha curcas*, foram testados 3 modos de crescimento diferentes para o isolamento de protoplastos: a) crescimento *in vivo*; b) crescimento em hidroponia; e c) crescimento *in vitro*.

Para o crescimento *in vivo*, as sementes foram colocadas em areia autoclavada em casa de vegetação. As raízes foram coletadas para os experimentos com 2 a 4 dias de germinação, quando ainda estavam pequenas e pouco lignificadas (figura 2).



Figura 2 - *Jatropha curcas* L. desenvolvida *in vivo*, com cerca de 4 dias de germinação. Fonte: elaborado pela autora.

Para o crescimento hidropônico, as sementes foram colocadas em areia autoclavada e, com 15 dias de germinação, foram transferidas para a solução de hidroponia de acordo com Hoagland (1938). As mudas foram apoiadas em suportes de isopor para permitir o contato apenas das raízes com a solução hidropônica, solução essa que ficou em constante suspensão através do uso de bomba centrífuga. As raízes foram usadas nos experimentos após 10 dias da transferência, como visto na figura 3-B.

Para o crescimento *in vitro*, as sementes foram embebidas em água destilada por 24 horas, para facilitar sua abertura. Em seguida tiveram seus tegumentos retirados (figura 4-B) para serem esterilizadas externamente com álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,1%) por 30 minutos e, por fim, lavadas com água destilada autoclavada 4 vezes. A semente foi cortada para expor cuidadosamente o embrião mediante a remoção do endosperma, colocando-se apenas o embrião e os cotilédones (figura 4-C) no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com meia força (50% da concentração dos sais). O explante se desenvolveu em um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 32°C. Os experimentos foram realizados com raízes com cerca de 10 dias.

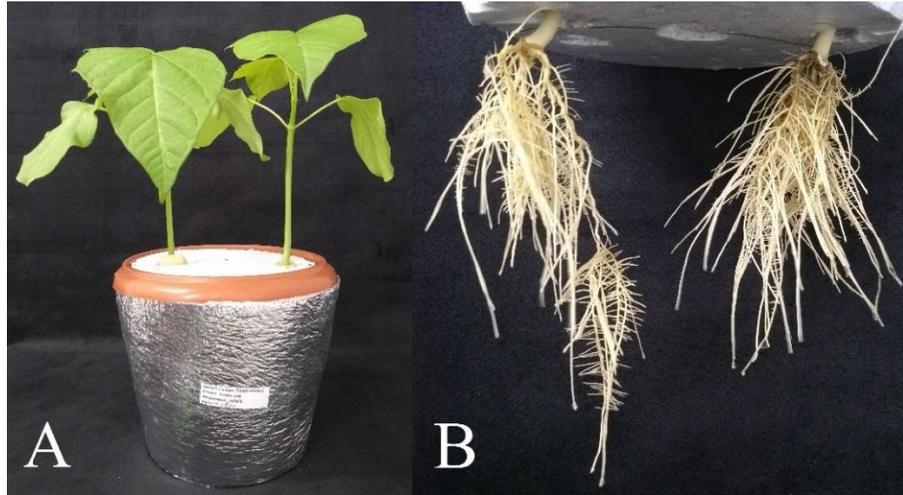


Figura 3 - *Jatropha curcas* L. em crescimento hidropônico: (A) Planta com 10 dias desde a transferência para a solução de hidroponia; (B) Detalhe para as raízes. Fonte: elaborado pela autora.



Figura 4 - Características das sementes e do embrião de *Jatropha curcas* L.: (A) Semente inteira aberta para exibir

os cotilédones; **(B)** Semente descascada; **(C)** Embrião e cotilédones. Barra de 2 mm para todas as imagens.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Isolamento de protoplastos

O isolamento de protoplastos foi baseado no protocolo de Deryckere et al. (2012) para plantas do gênero *Cichorium*, com certas adaptações para se ajustar às necessidades da *Jatropha curcas*. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril, com materiais autoclavados e/ou esterilizados.

Para o experimento, foram utilizados segmentos de 1,5 a 2 cm da extremidade da raiz (região da coifa) das respectivas formas de crescimento que, em seguida, foram cortados longitudinalmente em pedaços de 2 mm em microscópio estetoscópio, removendo o estelo central manualmente com o uso de pinça, e colocados em um tubo com solução P0 (pH 5,5) (ligeiramente modificado do protocolo original; descrito na tabela 1, cujos componentes estão descritos nas tabelas 2, 3 e 4) sem a presença de enzimas. Algumas dessas condições foram sendo modificadas a medida que novos experimentos eram realizados.

Tabela 1 – Meio P0 (pH 5,5)

Componente	Concentração
MS macro elements	0,5 x
Heller micro elements	1 x
Morel Wetmore Vitamins	1 x
Fe-Na-EDTA	18,35 mg/L
Inositol	100 mg/L
Sucrose	10 g/L
Mannitol	90 g/L

Fonte: Deryckere et al. (2012)

Tabela 2 – MS macro elements

Componente	Concentração (mg/L)
Nitrato de amônia	1650
Cloreto de cálcio hidratado	332,2
Sulfato de magnésio	180,7
Nitrato de potássio	1900

Fosfato de potássio monobásico	170
--------------------------------	-----

Fonte: Deryckere et al. (2012)

Tabela 3 – Heller Micro Elements

Componente	Concentração (mg/L)
Sulfato de manganês	0,076
Ácido bórico	1
Iodeto de potássio	0,01
Sulfato de zinco	1
Sulfato de cobre	0,03
Cloreto de ferro	1

Fonte: Modificado de Deryckere et al. (2012)

Tabela 4 – Morel Wetmore vitamins (100x)

Componente	Concentração (mg/L)
Myo-inositol	100
Hidrocloridrato de tiamina	1
Hidrocloridrato de piridoxina	1
Ácido nicotínico	1
Biotina	0,01

Fonte: Deryckere et al. (2012)

Os pedaços permaneceram na solução P0 por 1 hora, para plasmolisar as raízes com a solução antes da digestão da parede celular das células. Depois, deu-se a digestão propriamente dita, quando as raízes foram colocadas em nova solução P0 (pH 5,5), agora com 1% de celulase “Onozuka RS” e 0,5% de macerozyme “R-10”. Esse tubo foi colocado no vácuo por 2 minutos, para favorecer a entrada da solução no espaço entre as células das raízes. A digestão ocorreu durante 16 horas (overnight) com leve agitação (25 rotações por minuto), no escuro e em temperatura ambiente. Durante a digestão, foram coletadas amostras da solução a cada 2 horas, para identificar o tempo com melhor rendimento.

Após a digestão, os protoplastos foram purificados por filtração através de uma peneira com poros de 70 µm. A solução filtrada foi centrifugada a 50 g por 10 minutos, sendo

o sobrenadante descartado. O pellet enriquecido de protoplastos foi lavado com solução MC2 (pH 5,5) (tabela 5) e centrifugado a 100 g por 10 minutos. Esse processo foi repetido duas vezes.

Tabela 5 – Meio MC2 (pH 5,5)

Componente	Concentração
MS macro elements (sem NH ₄ NO ₃ ; sem KNO ₃)	0,5 x
Heller micro elements	1 x
Morel Wetmore Vitamins	1 x
Fe-Na-EDTA	18,35 mg/L
Inositol	100 mg/L
Sucrose	10 g/L
Mannitol	60 g/L
IAA	0,5 mg/L
BAP	0,5 mg/L

Fonte: Deryckere et al. (2012)

Após a remoção do sobrenadante, os protoplastos foram diluídos em 3 ml de solução MC2 para visualização no microscópico óptico.

4.3 Quantificação dos protoplastos

A quantificação foi feita através de um hemocitômetro denominado câmara de Neubauer. Esse método de contagem já está bem estabelecido desde o início de seu uso (STODDART, 2011).

Colocou-se 10µl da amostra na câmara de Neubauer e cobriu-se com uma lamínula. Após esperar 2 minutos para a amostra sedimentar, as células de 5 quadrados grandes foram contadas, a partir de um ziguezague nos 16 quadrados pequenos (no interior dos grandes), para estipular a concentração da solução.

Como um quadrado grande tem área de 0,01 cm² e profundidade de 0,01 cm, seu volume é 0,0001 cm³ (ou ml) que equivale a 0,1 µl. Portanto, a fórmula para calcular a concentração dos protoplastos por ml é a seguinte:

$$\text{Células/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10000}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrados contados}}$$

5 RESULTADOS

A obtenção de protoplastos é uma técnica utilizada na biologia molecular para a modificação genética das plantas, por exemplo, através da técnica CRISPR/Cas9. Para isso, são utilizados protocolos baseados na hidrólise de polímeros da parede celular dos tecidos selecionados.

O protocolo descrito na metodologia foi empregado para a obtenção de protoplastos de raízes, sendo os resultados obtidos descritos abaixo:

Inicialmente, foram realizadas três repetições do protocolo descrito com plantas germinadas *in vivo*, utilizando plantas de *Jatropha curcas* entre 3 e 5 dias de germinação (emissão de folhas cotiledonares).

- a) no primeiro teste, foram utilizadas raízes cortadas longitudinal e transversalmente para determinar o melhor corte, a plasmólise ocorreu overnight (16 horas) para favorecer o equilíbrio osmótico, a solução enzimática usada foi 1% celulase e 0,5% macerozyme;
- b) no segundo teste, foram utilizadas apenas entre 1,5 e 2 cm da região da coifa das raízes, que por sua vez foram cortadas em pedaços de 2 mm para aumentar a superfície de contato com a solução enzimática, a plasmólise ocorreu durante 2 horas, as raízes cortadas foram colocadas juntamente com a solução enzimática (1% celulase e 0,5% macerozyme) no vácuo durante 2 minutos para favorecer sua penetração entre as células, as raízes foram gentilmente apertadas durante a filtração para facilitar a soltura de protoplastos que por ventura tenham ficado presos entre o material;
- c) no terceiro teste, as raízes foram cortadas em microscópio estereoscópio para remover a região do estelo e cortá-las tanto longitudinal como transversalmente para aumentar ainda mais a superfície de contato, a concentração das enzimas foi aumentada para 2% celulase e 1% macerozyme, foram testados tempos de 16 e 20 horas de digestão.

Após a digestão e a purificação, o resultado dessas três tentativas não apresentou diferença discrepante entre eles: presença de muitos debris (fragmentos de tecidos e de células) na solução final de protoplastos; os protoplastos isolados apresentavam parede celular apenas parcialmente digerida, portanto não eram viáveis para experimentos de regeneração; além de o rendimento ter sido muito baixo, com raros protoplastos viáveis.

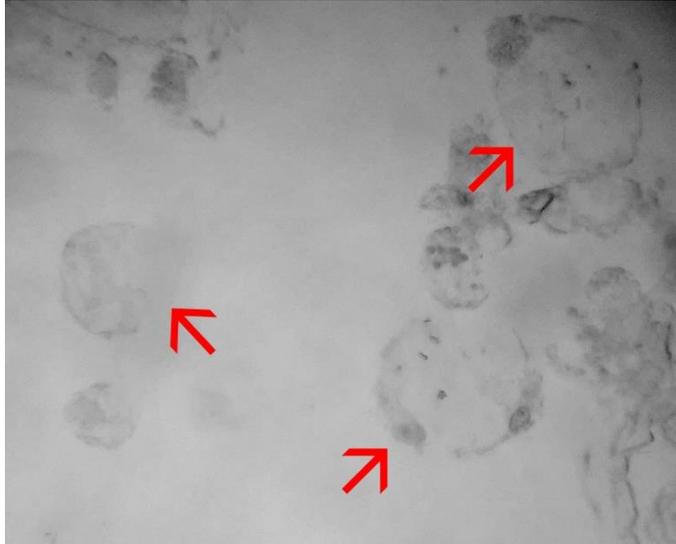


Figura 5 – Protoplastos isolados a partir de raízes de *Jatropha curcas* L.: Setas vermelhas indicam os protoplastos. Fonte: elaborado pela autora.

A partir dos resultados iniciais obtidos, o protocolo utilizado para obtenção de protoplastos foi repetido com folhas de *Nicotiana tabacum* que se desenvolveram *in vitro* para estabelecer se o protocolo era realmente replicável, já que o tabaco é uma planta cujos protoplastos de folhas já são isolados desde antes de 1969 (OTSUKI; TAKEBE, 1973), portanto representa uma espécie confiável para tal procedimento. Seguindo rigorosamente o protocolo, o experimento foi realizado com sucesso, isolando grande quantidade de protoplastos viáveis e sem a presença de muitos debris (figura 5).

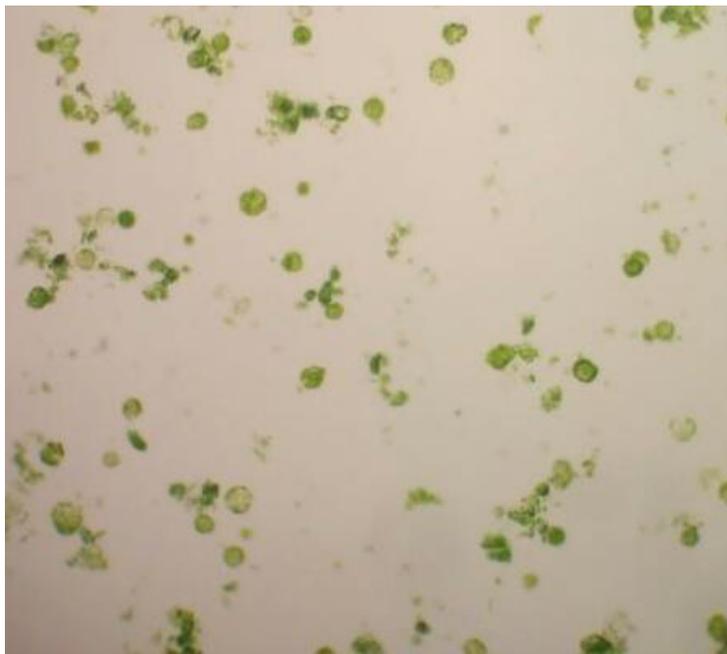


Figura 6 – Protoplastos isolados a partir de folhas de *Nicotiana tabacum* L. Fonte: elaborado pela autora.

Com base nisso, em seguida os experimentos passaram a ser realizados com plantas de pinhão manso cultivadas em meio de cultura e em hidroponia.

Foram realizados três experimentos com as raízes de *J. curcas* derivadas de plantas *in vitro*, os explantes usados tinham entre 3 e 5 dias de emissão das folhas cotiledonares:

- a) no primeiro teste foi seguido o protocolo original com digestão overnight (16h), a solução enzimática usada foi 1% celulase e 0,5% macerozyme, utilizando raízes cortadas longitudinalmente em microscópio estetoscópio;
- b) no segundo teste, as mesmas condições foram mantidas, mas as lavagens foram feitas com meio MC2 contendo 5 mg/ml de BSA (Albumina Sérica Bovina) para otimizar a separação dos debris dos protoplastos viáveis (PERLIN; SPANSWICK, 1980);
- c) no terceiro teste, novamente com as mesmas condições de digestão, repetiu-se o teste “b”, porém foi realizada uma divisão com gradiente de sacarose (com concentrações de 30, 25, 20, 21, 18 e 15%) para separar os debris dos protoplastos viáveis (SILVA JÚNIOR et al., 2012), sendo a solução de protoplastos colocada delicadamente por cima do gradiente para não perturbá-lo.

Os resultados continuaram como nos testes iniciais: rendimento baixo de protoplastos viáveis e muita concentração de debris. No teste b, em que as lavagens foram realizadas com BSA, houve uma ligeira diminuição na quantidade de debris, mas continuou sendo uma limpeza ineficaz. No teste c, os protoplastos viáveis deveriam estar numa interfase, porém várias fases do gradiente foram testadas e tais células não foram encontradas.

Foram realizados dois experimentos com as raízes de *J. curcas* derivadas de crescimento em hidroponia.

- a) no primeiro teste foi seguido o protocolo original para plasmólise e digestão da parede celular; a solução enzimática P0 foi usada com 1% de celulase e 0,5% de macerozyme; a digestão aconteceu durante 16 e 20h.
- b) no segundo teste, as mesmas condições foram mantidas, com solução enzimática P0 com 3% de celulase e 1,5% de macerozyme; a digestão novamente ocorreu durante 16 e 20h.

Em ambos os testes foram usados 0,05% de BSA e 0,5mM de DTT (ditiotretitol) junto à solução de digestão, como sugerido por Gronwald e Leonard (1982). Além disso foram usadas grandes quantidades de coifas, já que o desenvolvimento em hidroponia favorece a multiplicação das raízes. Entretanto, os resultados seguiram o mesmo padrão já observado, com pouco rendimento de protoplastos viáveis e muita concentração de debris. Aparentemente o teste b apresentou rendimento ligeiramente maior, o que pode ser explicado pela concentração elevada de enzimas aliada às substâncias protetoras (BSA e DTT).

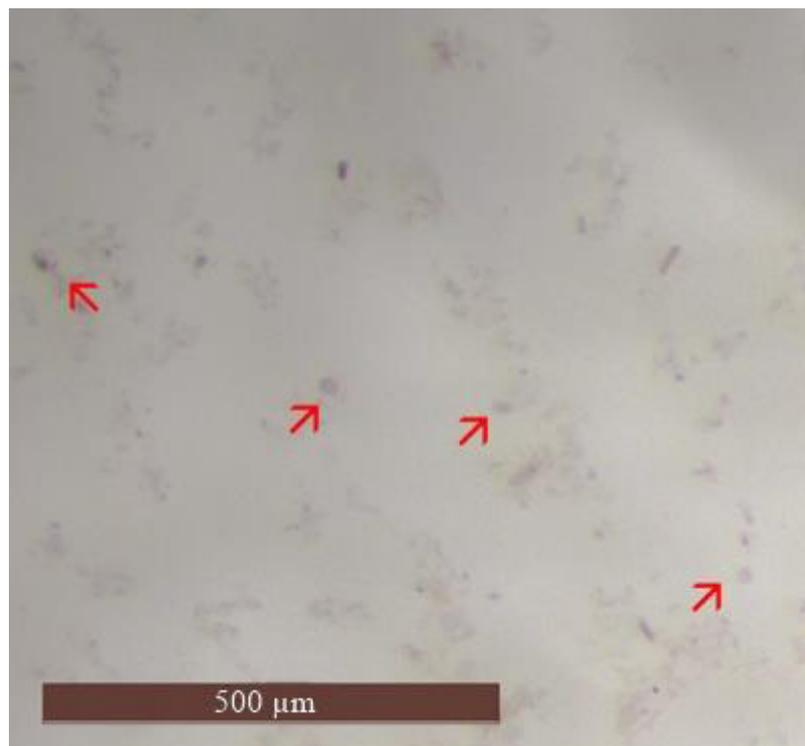


Figura 7 – Protoplastos isolados a partir de raízes de *Jatropha curcas* L. desenvolvidas em hidroponia: Setas vermelhas indicam os protoplastos, destaca-se a presença de muitos debris. Barra de 500μm. Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

É possível que as três primeiras tentativas não tenham sido bem-sucedidas por conta de a forma de crescimento das plantas ter sido *in vivo*. A maioria das pesquisas que isolam protoplastos de tecidos, utilizam plantas cultivadas *in vitro*. Em *Prunus communis*, por exemplo, folhas que cresceram *in vitro* renderam mais que duas vezes o número de protoplastos em comparação com o resultado de material vindo do campo (OCHATT; CASO, 1986).

Como o experimento seguinte foi feito com folhas de tabaco crescido *in vitro*, resultando em um ótimo rendimento, decidiu-se repetir os experimentos com raízes de *J. curcas* que tivessem se desenvolvido em meio de cultura, para manter os explantes em condições controladas onde não sofressem eventuais estresses ambientais que o cultivo no campo pode oferecer.

Entretanto, como mostrado, os resultados para tais experimentos não foram os esperados. Os debrís continuavam em concentração muito mais elevada do que os protoplastos viáveis, impossibilitando a quantificação dessas células através da câmara de Neubauer.

Para tentar diminuir a quantidade de debrís, foram realizados diferentes métodos de centrifugação que otimizasse a separação desse material. Perlin e Spanswick (1980) tiveram dificuldades em separar os debrís quando tentaram isolar protoplastos de folhas de milho, mas solucionaram tal problema ao adicionar a proteína BSA no meio de lavagem para as centrifugações. Ao testar esse procedimento com os protoplastos de pinhão manso, não houve melhora na quantidade de debrís, talvez porque o protocolo de Perlin e Spanswick eliminava principalmente cloroplastos, já que os protoplastos foram isolados a partir de folhas. Silva Júnior et al. (2012) sugerem realizar um gradiente de sacarose, onde soluções com concentrações decrescentes de sacarose são colocadas cuidadosamente em um tubo e por fim são cobertas com a solução de protoplastos sem perturbar o gradiente. As fases deveriam facilitar a separação dos debrís, porém até mesmo no artigo de Silva a limpeza não foi muito eficaz. Com os protoplastos de *Jatropha*, não foi possível essa separação, nem mesmo a recuperação dos protoplastos viáveis que deveriam se encontrar na interfase.

As raízes desenvolvidas através de hidroponia apresentaram a vantagem de fornecer muito material para os experimentos, sendo um método menos trabalhoso para realizar inúmeras repetições. Dessa forma foi utilizado muito material apenas das pontas das raízes. Isso porque as raízes se desenvolvem livremente na solução nutritiva, podendo ser coletadas apenas a região da coifa sem impedir o crescimento da planta inteira ou de novas raízes. Além disso,

outra vantagem é a coleta das raízes sem danos, como acontecia acidentalmente na retirada das raízes de plantas *in vivo*.

A visualização de protoplastos através de microscópio óptico (figura 4) sugere que esse protocolo é capaz de extrair protoplastos das células de raízes de *J. curcas*, porém como não foi possível quantificá-los, não se sabe se o rendimento é alto. Sem a quantificação, a regeneração desses protoplastos é inviabilizada, já que, para essa etapa, é preciso uma suspensão contendo 5×10^4 de protoplastos por ml em meio MC2 despejada em meio MC2 solidificado com LMPA (low melting point agarose ou agarose com baixo ponto de fusão). Nessa fase se formam as microcolônias a partir dos microcalos.

É necessário determinar três fatores para o isolamento de protoplastos: o tempo de incubação, a concentração enzimática e a concentração osmótica do meio. Em geral, o tempo de incubação varia entre 30 minutos e 20 horas (TUDSES et al., 2014). Nesse trabalho foi observado que em até 16 e 20 horas a digestão da parede celular de raízes de pinhão manso não estava ocorrendo com o sucesso observado na digestão de folhas de tabaco. Maior quantidade de horas não foram testadas já que os protoplastos perdiam a viabilidade, Liqing e colaboradores (2005) advertem que a incubação prolongada levaria potencialmente à quebra e disfunção em massa de protoplastos.

As concentrações enzimáticas usadas para a digestão da parede celular variaram entre 1 e 3% de celulase e 0,5 e 1,5% de macerozyme, mas não houve mudança observável dentre essas soluções. Os dados disponíveis sobre a enzima celulase mostram que sua atividade enzimática aumenta com 3 horas de digestão, aumenta drasticamente de 5 a 7 horas e ficam estáveis depois de 11 horas (TUDSES et al., 2014). Tudsés e colaboradores (2014) mostraram que o rendimento máximo de protoplastos de *J. curcas* e *Ricinus communis* ocorreu em um tempo de incubação de 7 horas e estes dados estão de acordo com o perfil de estabilidade da celulase. Entretanto, essa pesquisa citada foi realizada com folhas de ambas as espécies, por isso o padrão observado aqui, com o uso de raízes de *Jatropha*, diferencia-se grandemente.

O manitol é usado para manter a pressão osmótica equilibrada entre a solução e os protoplastos, assim mantendo sua estabilidade. As concentrações osmóticas mais comumente usadas ficam entre 0,3 e 0,7 M de manitol (CHAWLA, 2002), portanto justifica-se a concentração de 0,5 M usada nesse trabalho. Porém, esse pode ter sido um fator determinante para a falta de sucesso nos experimentos, já que não foram testadas diferentes concentrações além da fornecida pelo protocolo original (0,5 M) de Deryckere et al. (2012). Tudsés e

colaboradores (2014), por exemplo, testaram 14 soluções diferentes para o isolamento de protoplastos de *J. curcas* e *Ricinus communis*, variando a concentração osmótica (manitol 0; 0,3; 0,5 e 0,7 M) assim como a concentração enzimática.

Como as variáveis são muitas e as pesquisas com raízes são poucas, existe a possibilidade de um ou vários fatores estarem impedindo o isolamento bem-sucedido de protoplastos de raiz de *J. curcas*, entretanto não é possível apontar com certeza onde está o problema nesse protocolo.

Gronwald e Leonard (1982) demonstraram que a inclusão de substâncias protetoras (0,05% de BSA e 0,5mM de DTT) na solução enzimática de digestão aumentava em aproximadamente 80% a viabilidade dos protoplastos isolados de raízes de milho. Essas substâncias protetoras supostamente reduzem os efeitos deletérios de outras substâncias na preparação das enzimas de digestão e de substâncias liberadas pela quebra de células durante a produção de protoplastos. No isolamento de protoplastos de folhas de milho, foi mostrado que o BSA também aumentava a viabilidade (PERLIN; SPANSWICK, 1980).

Lambert e Geelen (2010) afirmam que isolamento de protoplastos de raízes não produzem rendimento o suficiente para experimentos de fusão ou transformação. Sugerem, ainda, que isso é provavelmente devido baixa representação relativa de células meristemáticas com paredes celulares digeríveis, portanto é indicado o uso apenas das pontas das raízes (coifa) para experimentos de isolamento de protoplastos, já que nessa região há maior representação de células meristemáticas. A separação das pontas das raízes é um processo trabalhoso e demorado, necessitando de uma grande quantidade de plantas.

Mesmo usando grandes quantidades de material das pontas das raízes, em especial com as plantas de *J. curcas* desenvolvidas em cultivo hidropônico, a disponibilidade de protoplastos no final da digestão não foi aperfeiçoada.

7 CONCLUSÃO

Cada espécie e cada tecido apresenta suas peculiaridades para o isolamento de protoplastos. Portanto, cabe ao pesquisador identificar essas especificidades, para tanto são necessários diversos testes empíricos até que essas condições sejam estabelecidas. Como não existe protocolo para isolamento de protoplastos a partir de raízes de *Jatropha curcas*, o procedimento para identificar essas peculiaridades é demorado, tempo esse que não estava disponível durante a realização dessa pesquisa.

Como o tecido alvo foi a raiz, as dificuldades encontradas foram maiores, já que a maioria das pesquisas utilizam folhas, por serem mais fáceis de se extrair protoplastos. Sendo assim, as bases científicas para a extração em *Jatropha* e a partir de raízes não foram suficientemente satisfatórias para sustentar os experimentos aqui realizados.

Esse trabalho servirá como base para futuras pesquisas com isolamento de protoplastos de raízes, indicando os problemas encontrados e os possíveis motivos para o isolamento não ter sido bem-sucedido. As perspectivas para pesquisas futuras são utilizar os dados aqui obtidos para isolar, com sucesso, protoplastos de raízes de *Jatropha curcas*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTEN, W. M. J. et al. Jatropha bio-diesel production and use. **Biomass And Bioenergy**, v. 32, n. 12, p.1063-1084, dez. 2008.
- ANDERSSON, M. et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR/Cas9 expression in protoplasts. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 1, p.117-128, out. 2016.
- BINDING, H. Plant Protoplasts. In: FOWKE, L. C.; CONSTABEL, F. **Regeneration of plants**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 21-35.
- BONA, C. M. et al. Citrus asymmetric somatic hybrids produced via fusion of gamma-irradiated and iodoacetamide-treated protoplasts. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 44, n. 5, p.454-462, maio 2009.
- CARIOCA, J. O. B. et al. The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.1043-1050, nov. 2009.
- CARLSON P.S.; SMITH H. H.; Dearing R. D. Parasexual interspecific plant hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 8, p.2292-2294, 1972.
- CHAWLA, H. S. Protoplast Isolation and Fusion. In: CHAWLA, H S. **Introduction to plant Biotechnology**. New Hampshire: Science Publishers, 2002. p. 87-109.
- CHEN, H. et al. Construction of engineering microorganism degrading chlorophenol efficiently by protoplast fusion technique. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, n. 3, p.443-448, mar. 2012.
- COCKING, E. C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. **Nature**, v. 187, n. 1, p.927-929, 1960.
- COCKING, E. C. Plant cell protoplasts-isolation and development. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 23, n. 1, p.29-50, jan. 1972.
- CONG, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p.819-823, jan. 2013.
- COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p.850-861, nov. 2005.
- COSGROVE, D. J.; JARVIS, M. C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. **Frontiers In Plant Science**, v. 204, n. 3, p.204-212, ago. 2012.
- DERYCKERE, D. et al. Low melting point agarose beads as a standard method for plantlet regeneration from protoplasts within the *Cichorium* genus. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 12, p.2261-2269, ago. 2012.
- DEVAPPA, R. K.; M., Harinder P. S.; BECKER, K. Jatropha Diterpenes: a Review. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 3, p.301-322, dez. 2010.

- DILCHER, D. L.; CRONQUIST, A. **Angiosperm**. 2018. Disponível em: <<https://www.britannica.com/plant/angiosperm/Organization-of-the-vascular-tissue>>. Acesso em: abr. 2018.
- DRUMOND, M. A. et al. PRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA BIOMASSA DE *Jatropha curcas* NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. **Cerne**, v. 22, n. 1, p.35-42, mar. 2016.
- EECKHAUT, T. et al. Progress in plant protoplast research. **Planta**, v. 238, n. 6, p.991-1003, ago. 2013.
- FUJIKI, H. et al. Phorbol esters in seed oil of *Jatropha curcas* L. (saboodam in Thai) and their association with cancer prevention: from the initial investigation to the present topics. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, v. 143, n. 8, p.1359-1369, jan. 2017.
- FUKUI, Y. et al. Isolation of *Hyphomonas* strains that induce normal morphogenesis in protoplasts of the marine red alga *Pyropia yezoensis*. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p.556-566, maio 2014.
- GAO, J. et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. **Plant Molecular Biology**, v. 87, n. 1-2, p.99-110, out. 2014.
- GARNEAU, J. E. et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. **Nature**, v. 468, n. 7320, p.67-71, nov. 2010.
- GOEL, G. et al. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **Int J Toxicol**, 26, 279-288, 2007.
- GORDON-KAMM, W. J.; STEPONKUS, P. L. The behavior of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts: Implications in freezing injury. **Protoplasma**, v. 123, n. 2, p.83-94, jun. 1984.
- GRONWALD, J. W.; LEONARD, R. T. Isolation and transport properties of protoplasts from cortical cells of corn roots. **Plant Physiol.**, v. 70, n. 1, p.1391-1395, 1982.
- GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, v. 104, n. 3, p.343-357, set. 2010.
- GÜBITZ, G. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, v. 67, n. 1, p.73-82, jan. 1999.
- HOAGLAND, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Berkeley, 1938. 32 p. (California Agricultural Experiment Station).
- HORIUCHI, T. et al. Presence of tumor promoters in the seed oil of *Jatropha curcas* L. from Thailand. **Jpn J Cancer Res.**, v. 3, n. 78, p.223-226, mar. 1987.
- KING, A. J. et al. Production of bioactive diterpenoids in the euphorbiaceae depends on evolutionarily conserved gene clusters. **Plant Cell**, 26, 3286-3298, 2014.
- KIRBY, J. et al. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p.1466-1473, set. 2010.

KLERCKER, J. Af. Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. **Ofvers. Kongl. Velensk. Akad. Forhdl.**, v. 9, n. 1, p.463-474, 1892.

KRENS, F. A.; JAMAR, D. The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Journal Of Plant Physiology**, v. 134, n. 6, p.651-655, ago. 1989.

LAMBERT, E.; GEELLEN, D. High efficiency protoplast isolation from in vitro cultures and hairy roots of *Maesa lanceolata*. **African Journal Of Biotechnology**, v. 9, n. 42, p.7071-7078, out. 2010.

LEE, Y.; MITIKU, G.; ENDRESS, A. G. Short-term effects of Al³⁺ on the osmotic behavior of red beet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. **Plant And Soil**, v. 228, n. 1, p.223-232, jan. 2011.

LEVIN, Y. et al. Rare *Jatropha multifida* intoxication in two children. **The Journal Of Emergency Medicine**, v. 19, n. 2, p.173-175, ago. 2000.

LIQING, Z. et al. Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 1, p.1-5, jul. 2005.

MAHESHWARI, S. C. Isolation and regeneration of protoplasts from higher plants. In: REINERT, J.; BINDING, H. **Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells**. Berlin: Springer-verlag, 1986. p. 3-36.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p.207-215, jun. 1998.

MALVIYA, S. N. et al. Estimation and characterization of protein present in seed extract of *Jatropha curcas*. **Arpb**, v. 1, n. 1, p.35-44, jan. 2011.

MATHUR, J.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. A simple method for isolation, Liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 1, p.221-226, 1995.

MONIRUZZAMAN, M.; YAAKOB, Z.; KHATUN, R. Biotechnology for *Jatropha* improvement: A worthy exploration. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p.1262-1277, fev. 2016.

MOTOYOSHI, F.; OSHIMA, N. Standardization in inoculation procedure and effect of a resistance gene on infection of tomato protoplasts with tobacco Mosaic Virus RNA. **J. Gen. Virol.**, v. 44, n. 1, p.801-806, jan. 1979.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAKANO, Y. et al. Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). **Plant Biotechnol-Nar**, 29, 185-189, 2012.

NEHER, E.; SAKMANN, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. **Nature**, v. 260, n. 5554, p.799-802, abr. 1976.

NISHIMURA, M.; AKAZAWA, T. Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. **Plant Physiol.**, v. 55, n. 1, p.712-716, 1975.

- NISHIMURA, M.; BEEVERS, H. Isolation of intact plastids from protoplasts from castor bean endosperm. **Plant Physiol.**, v. 62, n. 1, p.40-43, jan. 1978.
- NISHIMURA, M.; GRAHAM, D.; AKAZAWA, T. Isolation of intact chloroplasts and other cell organelles from spinach leaf protoplasts. **Plant Physiol.**, v. 58, n. 1, p.309-314, 1976.
- NWALA, O. C.; AKANINWOR, J. O.; MONANU, M. O. Nutritional Studies on Rats Fed Diets Formulated From Treated and Raw Samples of *Jatropha Curcas* Seed. **International Journal Of Engineering Science Invention**, v. 2, n. 11, p.14-19, nov. 2013.
- OCHATT, S. J.; CASO, O. H. Shoot Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplasts of Wild Pear (*Pyrus communis* var. *Pyraster* L.). **Journal Of Plant Physiology**, v. 122, n. 3, p.243-249, fev. 1986.
- OTSUKI, Y.; TAKEBE, I. Infection of tobacco mesophyll protoplasts by cucumber mosaic virus. **Virology**, v. 52, n. 2, p.433-438, abr. 1973.
- PERLIN, D. S.; SPANSWICK, R. M. Labeling and Isolation of Plasma Membranes from Corn Leaf Protoplasts. **Plant Physiol.**, v. 65, p.1053-1057, 1980.
- PINHEIRO, C. B. et al. Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L. **J Proteome Res**, 12, 5137-5145, 2013.
- PITZSCHKE, A.; PERSAK, H. Poinsettia protoplasts - a simple, robust and efficient system for transient gene expression studies. **Plant Methods**, v. 8, n. 1, p.14-20, jan. 2012.
- POWER, J. B.; COCKING, E. C. A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. **Biochem. J.**, v. 111, n. 1, p.33-34, jan. 1968.
- RAKSHIT, K. D. et al. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p.3621-3625, dez. 2008.
- REDENBAUGH, K. et al. Characterization and Separation of Plant Protoplasts Via Flow Cytometry and Cell Sorting. **Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie**, v. 107, n. 1, p.65-80, jul. 1994.
- ROEST, S.; GILISSEN, L. J. W. Plant regeneration from protoplasts: a literature review. **Acta Bot. Neerl.**, Wageningen, v. 38, n. 1, p.1-23, mar. 1989.
- RUESINK, A. W. Protoplasts of plant cells. **Methods Enzymol.**, v. 23, n. 1, p 197-209, 1971.
- SHABALA, S. et al. Protoplast ion fluxes: their measurement and variation with time, position and osmoticum. **Plant**, v. 204, n. 1, p.146-152, jan. 1998.
- SHAHIN, E. A.; SHEPARD, J. F. Cassava mesophyll protoplasts: Isolation, proliferation, and shoot formation. **Plant Science Letters**, v. 17, n. 4, p.459-465, mar. 1980.
- SILVA JÚNIOR, J. M. da et al. Protoplast production and isolation from *Etilingera elatior*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 1, p.45-50, 29 nov. 2012.
- SOARES, E. L. **Ontogenia da semente e análise proteômica do integumento interno de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae)**. 2015. 139 p. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia/fitotecnia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

- STODDART, M. J. Cell Viability Assays: Introduction. **Methods In Molecular Biology**, p.1-6, 2011.
- TAKEBE, I.; LABIB, C.; MELCHERS, G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. **Naturwissenschaften**, v. 58, n. 1, p.318-320, 1971.
- TIAN, S. et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 3, p.399-406, dez. 2016.
- TUDESSES, N.; PREMJET, S.; PREMJET, D. Establishment of Method for Protoplast Fusion with PEG-mediated between *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* L. **International Journal Of Life Sciences Biotechnology And Pharma Research**, v. 4, n. 1, p.50-56, jan. 2015.
- TUDESSES, N.; PREMJET, S.; PREMJET, D. Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations of *Jatropha curcas* L. And *Ricinus communis* L. **American- Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 14, n. 3, p.221-230, jan. 2014.
- VON HANSTEIN, Johannes. **Das protoplasma**. Alemanha: Heidelberg, 1880. 197 p.
- WAGATSUMA, T.; AKIBA, R. Low surface negativity of root protoplasts from aluminum-tolerant plant species. **Soil Science And Plant Nutrition**, v. 35, n. 3, p.443-452, set. 1989.
- WALTZ, E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. **Nature**, v. 532, n. 7599, p.293-293, abr. 2016.
- WANG, C. et al. Strain construction for enhanced production of spinosad via intergeneric protoplast fusion. **Canadian Journal Of Microbiology**, v. 55, n. 9, p.1070-1075, set. 2009.
- WARDHANI, A. K.; HIDAYAT, C.; HASTUTI, P. Enzymatic Phorbol Esters Degradation using the Germinated *Jatropha Curcas* Seed Lipase as Biocatalyst: Optimization Process Conditions by Response Surface Methodology. **Bulletin Of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**, v. 11, n. 3, p.346-353, out. 2016.
- WEYERHAEUSER, H. et al. Biofuels in China: An Analysis of the Opportunities and Challenges of *Jatropha Curcas* in Southwest China. **ICRAF Working Paper**, n. 53, abr. 2014, 20 p., 2007.
- WISZNIEWSKA, A.; PIWOWARCZYK, B. Studies on cell wall regeneration in protoplast culture of legumes – the effect of organic medium additives on cell wall components. **Czech J. Genet. Plant Breed.**, v. 50, n. 2, p.84-91, 2014.
- WU, J-Z. et al. Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Bmc Biotechnology**, v. 17, n. 1, p.40-43, mar. 2017.
- XU, Z-H.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C. Isolation and sustained division of phaseolus aureus (*Mung bean*) root protoplasts. **Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie**, v. 104, n. 4, p.289-298, nov. 1981.
- XU, Z-H.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C. Plant regeneration from root protoplasts of Brassica. **Plant Science Letters**, v. 24, n. 1, p.117-121, jan. 1982.

ZHENG, N. et al. Gene delivery into isolated *Arabidopsis thaliana* protoplasts and intact leaves using cationic, α -helical polypeptide. **Frontiers Of Chemical Science And Engineering**, v. 11, n. 4, p.521-528, jan. 2017.