

I. BIOTECNOLOGIA/FITOQUÍMICA

DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE PROTOPLASTOS IRRADIADOS DE LARANJA 'PÊRA' ⁽¹⁾

MARIÂNGELA CRISTOFANI ⁽²⁾, BEATRIZ JANUZZI MENDES ⁽³⁾,
AUGUSTO TULMANN NETO ⁽³⁾ e AKIHIKO ANDO ⁽³⁾

RESUMO

Estudou-se a viabilidade de protoplastos de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* Osbeck), submetidos a diferentes doses de radiação gama, com a finalidade de determinar a dose letal (DL) 50 - dose que causa 50% de letalidade. Empregou-se a análise por fluorescência, utilizando-se o corante diacetato de fluoresceína (DAF): suas diluições testadas - 1:50; 1:100 e 1:150 - não mostraram diferenças significativas entre si, tendo sido possível o uso da maior diluição para a determinação da viabilidade dos protoplastos. A viabilidade mostrou-se inversamente proporcional às doses de radiação gama e a DL 50 foi cerca de 41 Gy. Os protoplastos não irradiados apresentaram até 84% de viabilidade, quando esta foi estudada logo após o isolamento daqueles.

Termos de indexação: *citrus sinensis* Osbeck, protoplastos, viabilidade, radiação gama.

ABSTRACT

DETERMINATION OF VIABILITY OF IRRADIATED 'PERA' ORANGE PROTOPLASTS

The viability of 'Pera' orange (*Citrus sinensis* Osbeck) protoplasts, submitted to different dosages of Gamma radiation, was studied to determine the lethal dose (DL) 50. The analysis by fluorescence was employed using Fluorescein diacetate (FDA). The dilutions of FDA (1:50; 1:100 and 1:150) did not show any statistical difference. Then it was possible to use the 1:150 dilution in order to determine the protoplasts viability. The viability was inversely proportional to Gamma radiation and the DL 50 was about 41 Gy. The non-irradiated protoplasts had their viability up to 84% when tested as soon after their isolation.

Index terms: *citrus sinensis* Osbeck, protoplasts, viability, Gamma radiation.

⁽¹⁾ Parte de trabalho de dissertação apresentada pelo primeiro autor para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas no Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, Piracicaba (SP). Recebido para publicação em 10 de novembro de 1992 e aceito em 2 de agosto de 1993.

⁽²⁾ Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo de Campinas, Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis (SP).

⁽³⁾ Seção de Radiogenética, Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Caixa Postal 96, 13400-000 Piracicaba (SP).

1. INTRODUÇÃO

A mutagênese em protoplastos constitui o único sistema em que o tratamento mutagênico pode ser aplicado em uma população relativamente sincronizada, de células isoladas e geneticamente homogêneas, onde existe alta probabilidade de obtenção de mutantes não quiméricos (Negrutiu et al., 1984). Segundo Szabados (1991), para o isolamento de mutantes, é necessária grande quantidade de protoplastos viáveis que devem ter a capacidade de se dividir e regenerar plantas.

O estudo da viabilidade após o isolamento e tratamento mutagênico tem grande importância na determinação da densidade de plaqueamento a ser utilizada no cultivo de protoplastos, uma vez que essa variável tem influência nos seus processos de divisão e diferenciação (Nagata & Takebe, 1971; Vardi et al., 1975; Kobayashi et al., 1985).

A viabilidade dos protoplastos pode ser determinada após sua purificação com a utilização de corantes como: Evans blue (Kanai & Edwards, 1973); fenolsafranina (Karantine & Scott, 1981); azul-de-metileno (Hooley, 1982) e diacetato de fluoresceína (DAF) (Widholm, 1972; Larkin, 1976; Burger & Hackett, 1982).

O DAF, bastante empregado em testes de viabilidade, é um composto não fluorescente, apolar e bastante permeável através da membrana plasmática. Após absorção, as esterases presentes no citoplasma dos protoplastos viáveis hidrolisam essa substância, liberando a fluoresceína. Tal composto é fluorescente, polar, e não se movimenta com facilidade através do plasmalema, acumulando-se no citoplasma da célula viva (Larkin, 1976). Mediante microscopia de fluorescência, a viabilidade pode ser detectada.

O objetivo do presente trabalho é estudar a viabilidade de protoplastos irradiados e não irradiados, isolados de calos nucleares embriogênicos de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* Osbeck) e determinar a DL 50. Essa determinação é importante, pois é adotada como parâmetro para a escolha das doses de radiação gama a serem utilizadas em futuros trabalhos de indução de

mutações em protoplastos de laranja 'Pêra'. No teste de viabilidade, utilizou-se o corante DAF.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento dos protoplastos

Protoplastos do cultivar Pêra foram isolados a partir de calos embriogênicos, utilizando-se o meio de maceração composto de metade da concentração dos macronutrientes do meio de Murashige & Tucker (1969), celulase "Onozuka" R-10 (3,076%), Macerozyne R-10 (0,306%), manitol (0,32 mol.L⁻¹) e sacarose (0,33 mol.L⁻¹).

Foram inoculados 500 mg de calo/10 ml do meio de maceração em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. A digestão enzimática ocorreu no escuro, à temperatura de 27 ± 1°C, a 25 rpm de agitação em agitador rotatório, por dez horas.

Após o período de incubação, a suspensão de protoplastos foi filtrada em peneiras com tela de náilon com poros de 30 e 25 µm, e o filtrado contendo protoplastos foi centrifugado a 1.000 rpm durante cinco minutos.

Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e aos protoplastos precipitados acrescentaram-se 10 ml do meio de lavagem, constituído dos sais minerais e vitaminas do meio de Murashige & Tucker (1969), manitol (0,32 mol.L⁻¹) e sacarose (0,33 mol.L⁻¹).

Os protoplastos foram ressuspensos cuidadosamente com pipeta de Pasteur e novamente centrifugados. Essa operação foi repetida por mais duas vezes.

2.2 Estudo da viabilidade

Na avaliação do número de protoplastos viáveis após o isolamento, utilizou-se o método de coloração com diacetato de fluoresceína, descrito por Widholm (1972).

Estudou-se o efeito de três diluições do DAF em meio de lavagem: 1:50; 1:100 e 1:150. A solução estoque de DAF foi preparada com

5 mg de DAF/mililitro de acetona e armazenada a 0°C no escuro. Uma alíquota de 1 ml do corante diluído foi adicionada a outra de igual volume da suspensão de protoplastos. Decorridos cinco minutos, realizou-se a contagem dos protoplastos viáveis pela microscopia de fluorescência. Três repetições foram feitas para cada diluição do corante, realizando-se, para cada amostra, uma contagem do número de protoplastos com auxílio da câmara de Neubauer.

2.3 Estudo de doses de irradiação

No ensaio de doses de radiação gama em protoplastos, utilizou-se como fonte de raios gama o irradiador (⁶⁰Co) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)/USP. As doses estudadas foram 0, 15, 30, 45 e 60 Gy, a uma taxa de dose de 970 Gy/hora.

Após a primeira lavagem da suspensão de protoplastos, alíquotas de 2,5 ml da suspensão foram transferidas para tubos de ensaio e irradiadas com as doses escolhidas. Três repetições foram efetuadas para cada tratamento.

Depois de irradiados, os protoplastos foram lavados por mais duas vezes e ressuspensos em 2,5 ml de meio de lavagem, ficando a amostra com uma concentração final de 2×10^5 protoplastos/mililitro. Após uma incubação de 24 horas no escuro e sob temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, determinou-se a viabilidade dos protoplastos por meio da técnica descrita no item 2.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo de viabilidade

Os resultados do quadro 1 mostram que as porcentagens de viabilidade obtidas logo após a purificação dos protoplastos estão dentro da faixa (79,5 a 89,5) observada por Goldman (1988), que utilizou o corante azul-de-metileno para a avaliação.

As respostas às diluições utilizadas não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%, podendo-se, portanto, utilizar a diluição de 1:150 do DAF.

Burger & Hackett (1982) obtiveram, mediante uso de DAF, 20% de protoplastos viáveis após 13 dias do isolamento, coincidindo com a eficiência de plaqueamento (outra forma de avaliar a viabilidade dos protoplastos) depois de 20 dias de cultivo. Isso mostra que o DAF é um indicador confiável da viabilidade dos protoplastos.

Quadro 1. Rendimento⁽¹⁾ e viabilidade de protoplastos em diferentes diluições de DAF

Diluição	Rendimento	Protoplastos viáveis	Viabilidade
		nº/ml	%
1:50	$1,10 \times 10^5$	$0,89 \times 10^5$	81,4
1:100	$1,05 \times 10^5$	$0,85 \times 10^5$	80,7
1:150	$1,06 \times 10^5$	$0,89 \times 10^5$	84,0

⁽¹⁾ Número de protoplastos isolados/mililitro.

3.2 Radiossensibilidade dos protoplastos analisada com DAF

O quadro 2 mostra os resultados obtidos após a exposição dos protoplastos a diferentes doses de radiação gama e a figura 1, a curva de sobrevivência dos protoplastos em relação à testemunha.

Pelo quadro 2, verifica-se que a viabilidade dos protoplastos foi inversamente proporcional às doses de radiação gama.

Quadro 2. Viabilidade dos protoplastos submetidos a diferentes doses de radiação gama

Doses (Gy)	Protoplastos viáveis ⁽¹⁾	Viabilidade
	nº/ml	%
0	$6,35 \times 10^4$ a	64,8
15	$5,96 \times 10^4$ ab	61,5
30	$3,92 \times 10^4$ ab	38,0
45	$3,36 \times 10^4$ ab	30,8
60	$2,08 \times 10^4$ b	20,8

⁽¹⁾ Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

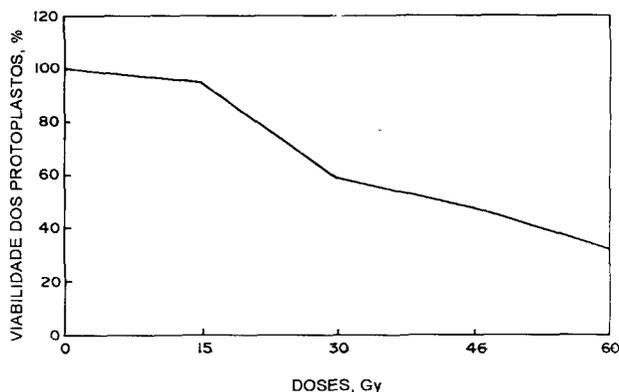


Figura 1. Representação da porcentagem de viabilidade de protoplastos em diferentes doses de radiação gama, em relação à testemunha.

O valor da DL 50 nas condições em que o experimento foi realizado situa-se ao redor de 41 Gy, dose maior que os valores de 34 e 37,5 Gy encontrados por Vardi et al. (1975) para o cultivar Shamouti e por Goldman (1988) para 'Pêra'. Assim, as doses possíveis de utilizar em futuros trabalhos com indução de mutações situam-se entre 35 e 45 Gy.

As diferenças podem ser devidas aos distintos métodos usados na avaliação da viabilidade e aos genótipos das plantas estudadas, uma vez que o genótipo é um dos fatores que influem na sensibilidade à radiação. No presente trabalho, os protoplastos foram irradiados logo em seguida, enquanto os autores acima citados o fizeram 42 horas após o isolamento. Segundo Galun & Raveh (1975), que trabalharam com protoplastos de *Nicotiana*, ocorre um aumento abrupto na radiosensibilidade dos protoplastos irradiados após um ou dois dias de isolados em relação à irradiação logo após o isolamento.

Apesar dos diferentes métodos empregados, constatou-se que as respostas à irradiação foram bastante próximas, embora uma pequena redução na radiosensibilidade tenha sido observada no presente estudo, quando comparada aos resultados de Vardi et al. (1975) e Goldman (1988).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURGER, D.W. & HACKETT, W.P. The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons (*Citrus sinensis*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **56**:324-328, 1982.
- GALUN, E. & RAVEH, D. In vitro culture of tobacco protoplasts: survival of haploid and diploid protoplasts exposed to X-ray radiation at different times after isolation. *Radiation Botany*, Oxford, **15**:79-82, 1975.
- GOLDMAN, M.H.S. *Cultura de tecidos nucleares, isolamento e radiosensibilidade de protoplastos de Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Pera*. Piracicaba, 1988. 127p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ-USP, 1988.
- HOOLEY, R. Protoplasts isolated from aleurone layers of wild oat (*Avena fatua* L.) exhibit the classic response to gibberellic acid. *Planta*, Berlin, **154**(1):29-40, 1982.
- KANAI, R. & EDWARDS, G.E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C₃, C₄ and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextranpolyethylene glycol two phase system. *Plant Physiology*, Lancaster, **52**:484-490, 1973.
- KARANTINE, S.M. & SCOTT, K.J. Mitotic activity in protoplasts isolated from *Sorghum bicolor* leaves. *Plant Science Letters*, Amsterdam, **23**:11, 1981.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I. & UCHIMIYA, H. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **4**:149-159, 1985.
- LARKIN, P.J. Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta*, Berlin, **128**:213-216, 1976.
- MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factors requirements of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, Riverside, 1968. *Proceedings*. Riverside, University of California, 1969. v.3, p.1155-1166.
- NAGATA, T. & TAKEBE, I. Plating isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, Berlin, **99**:12-20, 1971.
- NEGRUTIU, I.; JACOBS, M. & CABOCHE, M. Advances in somatic cell genetics of higher plants: the protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **67**(4):289-304, 1984.
- SZABADOS, L. Protoplast: aislamiento, cultivo y regeneración. In: ROCA, W.M. & MROGINSKI, eds. *Cultivo de tecidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, CIAT, 1991. p.239-271.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P. & GALUN, R. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Science Letters*, Amsterdam, **4**:231-236, 1975.
- WIDHOLM, J.R. The use of fluorescein diacetate and phenol-safranin for determine viability of culture plant cells. *Stain Technology*, Baltimore, **47**:189-194, 1972.