

OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE CITOGENÉTICA DE MACRÓFITA (*Eichhornia spp.*)

HENRIQUE BERLE¹; VERA LUCIA BOBROWSKI²; BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA³

¹Universidade Federal de Pelotas/FAEM – henriqueberle@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas/IB/DEZG – vera.bobrowski@gmai.com

³Universidade Federal de Pelotas/IB/DEZG – biahgr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A atividade antrópica tem aumentado a presença de agentes químicos no meio ambiente, poluindo terra, água e ar, prejudicando inúmeras espécies animais e vegetais. A água é um elemento de extrema importância para a dinâmica de sobrevivência do planeta. No entanto, são lançados diariamente nos diferentes mananciais resíduos que são considerados tóxicos por afetarem o equilíbrio do meio ambiente.

Testes de monitoramento genotóxico voltados ao ambiente têm sido utilizados por diferentes autores, permitindo avaliar anormalidades cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico (GRANT, 1994; CUCHIARA et al., 2012; FERREIRA, et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

Estudos recentes têm utilizado espécies do gênero *Eichhornia* (kunth) como bioindicadoras, pois ocupam diversos ambientes aquáticos naturais como rios, lagos, reservatórios, pântanos e piscinas sazonais, assim como também são capazes de colonizar lugares modificados pelo homem como lavouras de arroz, canais de irrigação e valas de drenagem (BARRETT, 1988).

A espécie *E. crassipes* (Mart.) tem sido usada no tratamento biológico de águas contaminadas por poluentes devido a sua capacidade de adsorver, principalmente metais, estabelecendo uma forte ligação entre o sistema aquático e o ambiente terrestre que o circunda. Autores relatam que a espécie é apropriada para avaliar substâncias com potencial genotóxico em amostras de água, através da frequência de micronúcleos e análise do índice mitótico (MISHRA; GUPTA; RAI, 2009; OLIVEIRA et al., 2012). Para determinar o efeito mutagênico de águas na cidade de Pelotas, foi feito um monitoramento com a espécie macrófita *Hydrocotyle ranunculoides*, cronicamente exposta, por determinação do índice mitótico, anomalias mitóticas, anomalias interfásicas, entre outras análises (SANTOS et al., 2009).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar metodologia empregada em citogenética vegetal para avaliar a divisão celular em espécimes de *Eichhornia* spp., visando a utilização no biomonitoramento ambiental.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no período de maio a junho de 2015, no Laboratório de Genética, localizado no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, do Instituto de Biologia, no Campus da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no município de Capão do Leão, RS.

Plantas do gênero *Eichhornia* foram coletadas na Avenida Adolfo Fetter – Recanto de Portugal (Coordenadas S 31°45'26.802" W 52°15'56.484"), nas proximidades da Praia do Laranjal, e mantidas por aproximadamente duas horas

em água até o momento da remoção de raízes. Posteriormente a classificação das raízes por comprimento em sete grupos: 0,5 à 1,4cm; 1,5 à 2,4cm; 2,5 à 3,4cm; 3,5 à 4,4cm; 4,5 à 5,4cm; 5,5 à 10cm e 10 à 20cm, as mesmas foram cortadas e fixadas em Carnoy (3:1, álcool etílico:ácido acético) por 12 horas em temperatura ambiente e transferidas para geladeira (4º a 6ºC), no próprio fixador, até o momento da preparação das amostras.

Para a análise citogenética foi usada a técnica de esmagamento de Guerra e Souza (2002), sendo as raízes lavadas duas vezes em água destilada, 5 minutos/cada, para a eliminação do fixador, hidrolisadas em HCL 5N, à temperatura ambiente, por 10 e 20 minutos. Após a hidrólise foram novamente lavadas em água destilada durante 5 minutos antes da coloração.

Com o auxílio de microscópio estereoscópico, pinças e seringas de insulina, sobre lâmina, houve a retirada da coifa e das capas mais externas de cada raiz para após a coloração do tecido meristemático com os respectivos corantes: orceína acética 2%, carmim acético 1% e carmim propiônico 1%, nos tempos de 5 e 10 minutos, em lâminas individualizadas.

Após a aplicação do corante as amostras foram maceradas e cobertas com uma lamínula, sendo o excesso de corante retirado com papel filtro. As lâminas para análise do ciclo mitótico foram analisadas qualitativamente, ao microscópio ótico, em aumento de 400x, pelo método da varredura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao comprimento das raízes da macrófita não houve diferença qualitativa até 5,4cm, com as lâminas apresentando um maior número de células em divisão. Nas raízes maiores as células apresentavam maior tamanho, com boa visualização, contudo com redução do número de divisão celular. Segundo Guerra; Souza (2002), na análise cromossômica mitótica, o maior número de células em divisão é encontrado no tecido meristemático. Esse tecido está em diferentes órgãos das plantas e caracteriza-se por não apresentar células diferenciadas (meristemas de raízes, brotos foliares, anteras, paredes de ovário, gavinhas e pétalas).

A hidrólise é uma etapa importante no processo de preparação citogenética, que objetiva o amaciamento da parede celular, sendo o melhor resultado obtido neste trabalho com HCL 5N durante 20 minutos, à temperatura ambiente.

Para a coloração, resultados satisfatórios foram os obtidos pelo esmagamento com orceína acética 2%, por 5min, pois com o tempo de 10min os citoplasmas das células coraram excessivamente, dificultando o contraste, a distinção clara do núcleo (Figura 1). Vieira et al. (2005), visando adequar metodologia para análise citogenética de mamona analisaram diferentes corantes e recomendaram o emprego da orceína acética 2% para análise de divisão celular.

Na figura 2 estão representadas as fases da divisão celular, cuja visualização é importante para o teste de biomonitoramento ambiental, onde interferências no ciclo mitótico causadas por substâncias genotóxicas podem ser detectadas.

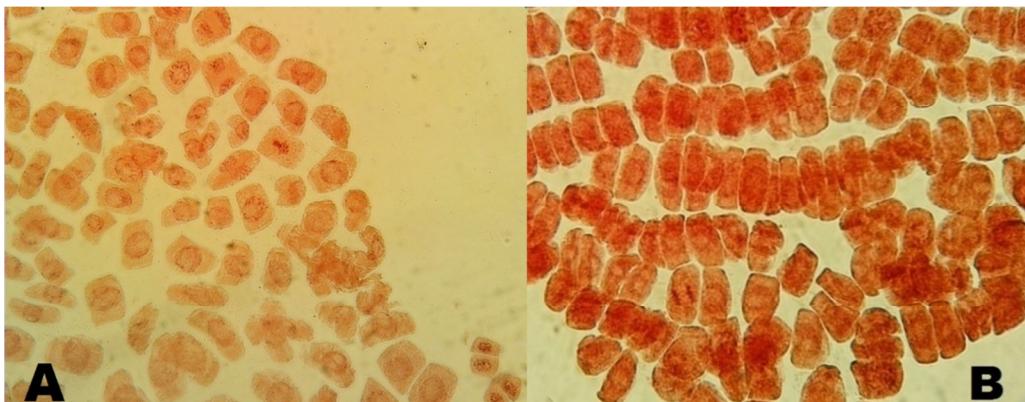


Figura 1. Células meristemáticas radiculares de *Eichhornia* (Kunth) em diferentes tempos de imersão no corante orceína acética 2%, em raízes de 4,4 a 5,4cm de comprimento. (A) Imersão por 5 minutos. (B) Imersão por 10 minutos.

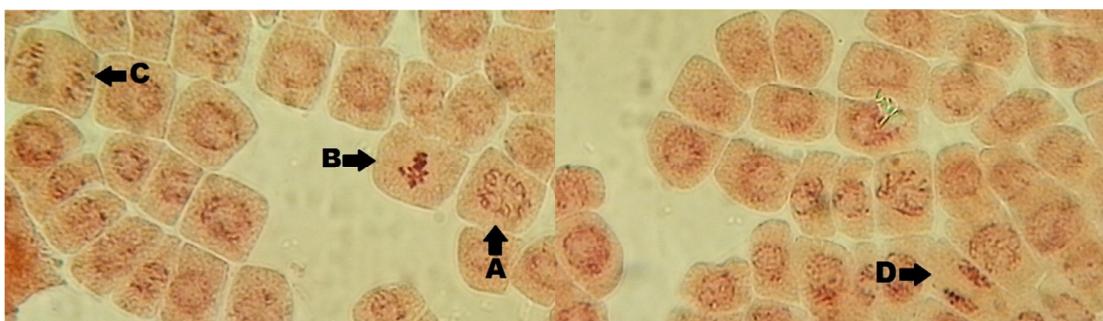


Figura 2. Fases do processo de divisão mitótica em células meristemáticas radiculares de *Eichhornia* (Kunth), hidrolisadas com HCl 5N por 20min, coradas com orceína acética 2% por 5 minutos, com 4,4 a 5,4cm de comprimento. A – Prófase, B – Metáfase, C – Anáfase e D – Telófase.

4. CONCLUSÕES

A melhor visualização das fases da divisão celular em células meristemáticas radiculares de *Eichhornia* spp. é obtida com raízes de até 5,4cm de comprimento, com tempo de hidrólise de 20 minutos e coloração com orceína acética 2% por 5 minutos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BARRETT, S.C.H. Evolution of breeding systems in *Eichhornia* (Pontederiaceae): a review. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, n. 3, p. 741-760, 1988.

CUCHIARA, C. C., BORGES, S. C., BOBROWSKI, V.L. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios, **Revista Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 19-27, setembro de 2012.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

FERREIRA, C. F. et al. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa*. L. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S.I.], v. 7, n. 2, ago. 2012. ISSN 1980-0002. Disponível em: <<http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1121>>. Acesso em: 26 Jul. 2015.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos** – Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Editora FUPEC. Ribeirão Preto. 2002. 131 p.

MISHRA, K.; GUPTA, K.; RAI, U. N. Bioconcentration and phytotoxicity of chromium in *Eichhornia crassipes*. **Journal Environment Biology**, v. 30, p. 521-526, 2009.

OLIVEIRA, J. P. W.; SANTOS, R. N. dos; PIBERNAT, C. C., BOEIRA, J. M. Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15, 2012.

SANTOS, T. C. O.; MACIEL, L. F.; LEAL, K. S.; BENDER, A. E. N.; PAIVA, T. S.; GARCIAS, G. L.; MARTINO-ROTH, M. G. Mutagenic potential of water from Pelotas Creek in Rio Grande do Sul, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 1057-1066, 2009.

VIEIRA, C. B.; CORRÊA, L. B.; VILLANOVA, L. B.; SILVA, S. D. dos A. e; ROCHA, B. H. G. Adequação de metodologia para análise citogenética de mamona. In: **XIV Congresso de Iniciação Científica e VII Encontro de Pós Graduação da UFPel**, Pelotas, 2005, **Anais...** Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2005.