

ADEQUAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRIFLURALINA PARA USO COMO CONTROLE POSITIVO EM CÉLULAS DE BULBOS DE CEBOLA

LUANA BUENO LONGARAY¹; CAMILA SILVEIRA SINNEMANN²; VIVIANE AGUILAR VIGHI³; MAICON NARDINO⁴; BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA⁵; VERA LUCIA BOBROWSKI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – lubuelong@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sinnemann08@outlook.com

³Universidade Federal de Pelotas – vivi_vighi@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – biahgr@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – nardinomn@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – orientadora – vera.bobrowski@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* (cebola) é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade e citotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999). Esse teste é muito utilizado devido a sensibilidade, pela facilidade de obtenção do material biológico e manipulação, baixo custo, curto período de tempo de germinação das sementes e brotamento das raízes nos bulbos, e por possuir cromossomos grandes e em pequena quantidade, o que facilita a visualização (CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012).

De acordo com CONSTANTIN, OWENS (1983), os bioensaios que utilizam plantas apresentam muitas vantagens, tais como: equipamentos e materiais mais baratos, a similaridade na morfologia dos cromossomos das plantas com os de mamíferos, a resposta aos agentes mutagênicos semelhantes aos animais.

Dentre os controles positivos utilizados em bioensaios com plantas, a literatura tem registrado o uso de diferentes substâncias como cloreto de níquel, sulfato de cobre, paracetamol, etilmetanosulfonato, glifosato, trifluralina, etc., visando induzir anormalidades cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico (BRAGA; LOPES, 2015; SANTOS et al., 2018; HISTER et al., 2017). A trifluralina é um herbicida amplamente utilizado e atua sobre plantas sensíveis causando a inibição da mitose na prometáfase, pela interferência na polimerização da tubulina e na formação de microtúbulos (OVIDI et al, 2001; HESS; BAYER, 1974 e 1977).

O trabalho visa identificar a concentração adequada de trifluralina a ser utilizada como controle positivo na análise de divisões mitóticas e alterações citogenéticas nas células meristemáticas radiculares de bulbos de cebola.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, durante o ano de 2018.

Foram utilizados 40 bulbos de cebola de tamanhos similares, adquiridos no comércio local, e mantidos em geladeira por sete dias. A parte basal de cada bulbo foi imersa em recipiente contendo água destilada para o crescimento das raízes durante 72 horas. Em seguida, os bulbos foram transferidos para os tratamentos, sendo utilizado como controle negativo a água destilada e soluções

de trifluralina nas concentrações de 0,12; 0,18; e 0,24 mL/L. Para cada tratamento foram destinados dez bulbos (dez repetições/tratamento), distribuídos de forma aleatória e mantidos em temperatura ambiente, por 72 horas.

Após, os bulbos foram removidos dos tratamentos, as raízes lavadas em água destilada, seccionadas, e fixadas em Carnoy 3:1 (álcool etílico e ácido acético) até o momento das análises citogenéticas: índice mitótico (IM) e índice de alterações cromossômicas (IAC).

Para proceder a análise das lâminas foi utilizada a técnica de esmagamento das raízes (GUERRA; SOUZA, 2002), hidrolisadas em HCL 5 N durante dez minutos, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2%. Para cada tratamento foram analisadas cinco lâminas e observadas 1000 células/lâmina pela técnica de varredura, totalizando 5000 células/tratamento. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da normalidade residual. Atendendo as pressuposições foi realizada a análise de variância e de regressão linear a 5 % de probabilidade de erro utilizando o programa Statistix 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após analisadas as lâminas, observou-se que o controle negativo não diferiu estatisticamente dos três tratamentos com trifluralina, para o índice mitótico. Porém, para o índice de alterações cromossômicas houve diferença significativa entre todos os tratamentos. Os resultados da ação da trifluralina, sobre bulbos de cebola, mostram que a variável IAC apresentou uma relação quadrática com as diferentes concentrações desse herbicida, ou seja, as concentrações de trifluralina acarretaram aumento progressivo na quantidade de alterações cromossômicas (Figura 1).

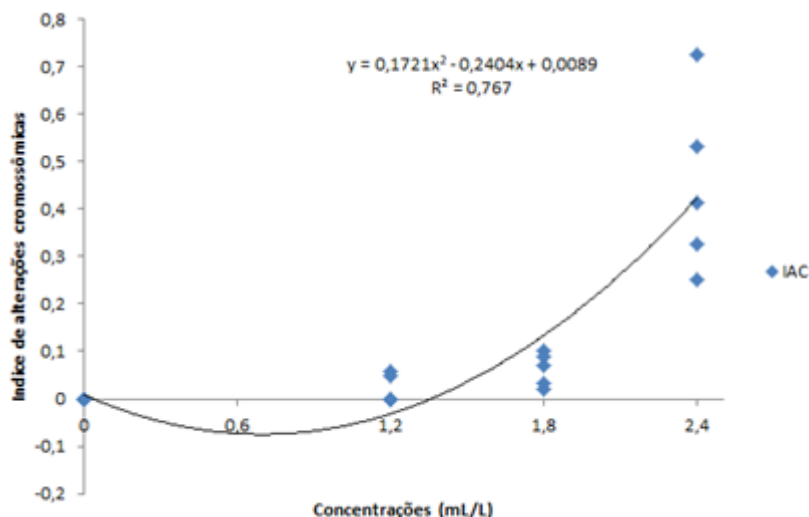


Figura 1. Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para a variável índice de alterações cromossômicas para tecidos meristemáticos radiculares de cebola tratados com diferentes concentrações do herbicida trifluralina.

O IM é considerado um parâmetro que permite que se estime a frequência de divisão celular e a inibição dessa atividade mitótica é frequentemente usada para rastreamento de substâncias tóxicas (MUSTAFA; ARIKAN, 2008). Segundo GRIPPA et al. (2010), a inibição do crescimento da raiz é resultado da inibição da divisão celular, o que leva à diminuição do índice mitótico. Assim como os autores citados, neste trabalho não foi observada inibição do índice mitótico em *A. cepa*, e

assim como os autores podemos sugerir que a ausência de inibição pode estar relacionada às raízes já estarem em crescimento quando expostas ao agente tóxico e o tempo de exposição não ter sido suficiente para gerar inibição.

Dentre as alterações cromossômicas observadas, numa análise qualitativa, foram encontradas em ordem decrescente a presença de micronúcleos, de pontes anafásicas, cromossomos perdidos e cromossomos em anel (Figura 2). Resultados similares foram observados KARAISMAILOGLU (2014) em células de girassol, e de acordo com o autor anormalidades como distúrbios na prófase, cromossomos pegajosos e pontes cromatídicas podem ser resultados da erosão de cromátides e quebras de cromátides ou cromossomos, e representam o efeito tóxico e danos irreversíveis causados pelo agente testado. Por outro lado, c-mitose e cromossomo retardatários são produzidos como resultado da inibição da formação das fibras do fuso acromático. Já os micronúcleos são originados de fragmentos acêntricos ou tardios, os quais são excluídos do próprio núcleo durante a mitose.

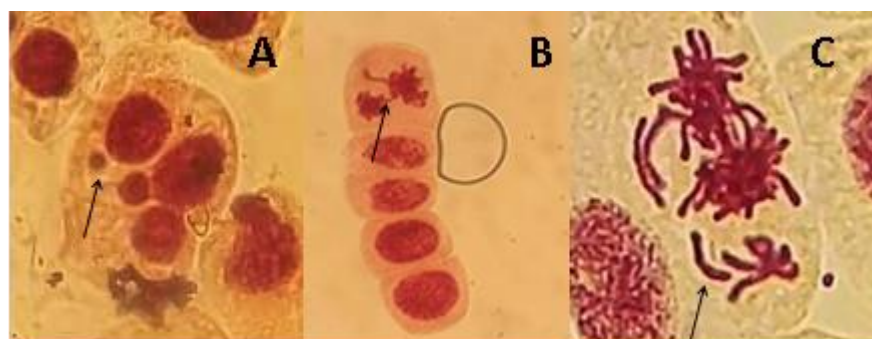


Figura 2. Células meristemáticas de raízes de bulbos de cebola tratadas com trifluralina apresentando micronúcleo (A), ponte anafásica (B), anáfase multipolar (C) (400x).

4. CONCLUSÕES

Pode-se inferir que para a variável IM todas as doses de trifluralina testadas não inibiram o crescimento das raízes dos bulbos de cebola, porém para a variável IAC houve aumento significativo na quantidade de anomalias cromossômicas nas células meristemáticas submetidas à ação do herbicida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAGA, J.R.M.; LOPES, D.M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v.10, n.1, p.130-140, 2015.
- CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v.426, p.211-214, 1999.
- CONSTANTIN, M.J.; OWENS, E.T. Introduction and perspective of plant genetic and cytogenetic assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v.99, p.13-36, 1982.

CUCHIARA, C.C.; BORGES, C. de S.; BOBROWSKI, V.L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.6, n.1, p.33-38, 2012.

GRIPPA, G.A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*, **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.23, n.1-2, p.11-16, 2010.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo, Funpec, 2002.

HESS, D.; BAYER, D. Binding of the herbicide trifluralin to *Chlamydomonas* flagellar tubulin.. **Journal Cell Science**, Cambridge, v.24, p.351-360, 1977.

HESS, D.; BAYER, D. The effect of trifluralin on the ultrastructure of dividing cells of the root meristem of cotton (*Gossypium hirsutum* L. 'acala 4-42'). **Journal Cell Science**, Cambridge, v.15, p.429-441, 1974.

HISTER, C.A.L.; PASQUALLI, M.; TRAPP, K.C.; STEFANELLO, R. et al. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp.) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L. **R. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.43-48, 2017.

KARISMAILIOGLU, M.C. Evaluation of potential genotoxic effect of trifluralin in *Helianthus annuus* L. (sunflower). **Caryologia**, Florence, v.67, n.3, p. 216-221, 2014.

MUSTAFA, Y.; ARIKAN, E. S. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Caryologia**, Florence, v. 61, n. 1, p. 45-52, 2008.

OVIDI, E.; GAMBELLINI, G.; TADDEI, A.R.; CAI, G. et al. Herbicides and the microtubular apparatus of *Nicotiana tabacum* pollen tube: immunofluorescence and immunogold labelling studies. **Toxicology in Vitro**, Amsterdam, v.15, p.143-151, 2001.

SANTOS, I.M.C. dos.; MELO, H.M. de; CARNEIRO, J.K.R.; OLIVEIRA, M.A.S. Avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica do extrato de *Morinda citrifolia* em diferentes concentrações sobre o teste *Allium cepa*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v.17, n.1, p.40-45, 2018.