

Análise de alterações cromossômicas no Sistema *Allium cepa* causadas pela exposição de sementes a extratos brutos de *Eragrostis plana*: a principal invasora do Bioma Pampa¹

Analysis of chromosomal alterations in *Allium cepa* assay caused by the seed of exposure to crude extracts of *Eragrostis plana*: the main invasive plant in Brazilian Pampas Biome

Leonardo Luís Artico², Gizele Kömmling², Ana Paula Simões Menezes³, Ana Cristina Mazzocato⁴, Juliano Lino Ferreira⁴

¹Parte do trabalho de conclusão do curso de Farmácia, financiado pela URCAMP e Embrapa Pecuária Sul.

²Acadêmicos do curso de Farmácia – URCAMP, Bagé, RS, Brasil. Bolsista da FAPERGS. e-mail: leonardoartico@yahoo.com.br

³Professora do Centro de Ciências da Saúde/ INTEC – URCAMP, Bagé, RS, Brasil.

⁴Pesquisadores do Setor de Plantas Forrageiras – Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brasil.

Resumo: Avaliou-se o potencial citotóxico e mutagênico dos extratos aquosos de *Eragrostis plana* (raiz e parte aérea) através do Sistema *Allium cepa*. O ensaio foi desenvolvido no Instituto Biotecnológico de Reprodução Vegetal (INTEC) da URCAMP, sendo os extratos preparados com a planta seca submetida a decoções na concentração de 1:4 (planta/água destilada). Os extratos aquosos brutos de parte aérea (EAA) e raiz (EAR) foram utilizados como substrato para a germinação de sementes de *Allium cepa* (100%, 50% e 25%). As sementes (100 para cada tratamento) foram dispostas em gerbox e incubadas (BOD, 22 °C) por cinco dias, sendo o ensaio realizado em triplicata. Como controle positivo, foi utilizado o sulfato de cobre (2%) e controle negativo, água destilada. Após, foram coletadas as radículas das plântulas, fixadas em Carnoy acético e procedida à confecção das lâminas. Analisaram-se 5.000 células por tratamento em microscopia óptica (40x). Observando o IM de *A. cepa*, é possível verificar que os extratos *E. plana* nas doses mais elevadas contribuíram efetivamente para a inibição do IM, em comparação com CN tanto em parte aérea (EAA₁₀₀, EAA₅₀, EAA₂₅; P<0,001) quanto para raízes (EAR₁₀₀, EAR₅₀, EAR₂₅; P<0,001). Diferentes diluições de um mesmo extrato também mostraram associação dose-dependente, bem como a mesma dose entre os tratamentos EAA e EAR. Em relação aos dados de mutagenicidade (MN e pontes cromossômicas), não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Palavras-chave: Alelopatia, campos sulinos, capim-annoni citotoxicidade, mutagenicidade

Abstract: We evaluated the cytotoxic and mutagenic potential of aqueous extracts of *Eragrostis plana* (root - AER and shoot-AES) through *Allium cepa* assay. The test was developed in the Instituto Biotecnológico de Reprodução Vegetal (INTEC) of URCAMP, and the extracts prepared with dried plant decoctions submitted in the concentration of 1:4 (plant / distilled water). The root and shoot aqueous extracts were used as substrate for *A. cepa* seed germination (25, 50 and 100% dilutions), which were placed in gerbox boxes for germination and after incubated in BOD chamber for five days, done in a triplicate mode. As a positive control, we used was copper sulfate 2% and as negative control, distilled water. Then, the rootlets of seedlings were collected, fixed in acetic Carnoy and proceeded for confection of the slides. It was analyzed 5,000 cells by treatment with optical microscopy (40x). Noting the IM *A. cepa*, you can check that the *E. plana* extracts at higher doses effectively contributed to the inhibition of IM compared to CN both shoot (AES100, AES50, AES25; P<0.001) and for roots (AER100, AER50, AER25; P<0.001). Different dilutions of the same extract also showed dose-dependent association, as well as the same dose of AES and AER treatments. In relation to mutagenicity data (MN and chromosome bridges), there was no significant difference between treatments.

Keywords: Allelopathy, Brazilian southern fields, cytotoxicity, mutagenicity, South African lovegrass

Introdução

O Bioma Pampa apresenta uma grande riqueza de espécies vegetais com infinitas utilizações. Entretanto, possui uma vasta área dominada por gramíneas invasoras, introduzidas acidentalmente nos campos do Bioma, como é o caso do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) uma Poaceae exótica e perene cuja introdução se deu no Rio Grande do Sul na década de 50 (Nachtigal & Costa, 2010). Conforme Reis et

al. (2008), já ultrapassam de dois milhões de hectares de terra no RS que possuem o capim-annoni como espécie contaminante e/ou dominante, invasora esta que começa a se expandir para os países do MERCOSUL.

Segundo Dalbosco (2013) o fato da espécie tornar-se a invasora mais agressiva dos Campos Sulinos é imposto pelas características de rápido crescimento e um longo período reprodutivo, aliadas ao seu suposto potencial alelopático. A alelopatia é usualmente definida como um processo que avalia o efeito de metabólitos secundários provenientes de algas, plantas, bactérias ou fungos sobre sistemas celulares, afetando efetivamente o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos expostos aos aleloquímicos (Ferreira et al. 2008).

Existem métodos que contribuem para a determinação de fitotoxicidade e mutagenicidade de compostos bem como ação de aleloquímicos. Nesse sentido, o Sistema *Allium cepa* baseia-se na análise de alterações do ciclo celular da espécie quando em contato com compostos potencialmente citotóxicos, o que o torna eficaz no sentido de oferecer parâmetros microscópicos como, inibição de índice mitótico, pontes cromossômicas e micronúcleos, que podem se caracterizar em evidências ou até indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular (Caritá & Marin-Morales, 2008). Desse modo, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial citotóxico e mutagênico dos extratos aquosos de *E. plana* (raiz e parte aérea) através do Sistema *Allium cepa*.

Material e Métodos

Partes aéreas e raiz de *E. plana* foram coletadas no município de Bagé-RS (coordenadas 31°31'42.13''S/ 54°04'61.74''W) em junho do ano de 2015, secas em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C por 48 horas.

O ensaio desenvolveu-se no Instituto Biotecnológico de Reprodução Vegetal (INTEC) da URCAMP, onde primeiramente realizaram-se extratos aquosos brutos de parte aérea (EAA) e de raiz (EAR) por decocção, respeitando as proporções 1:4 (planta/água de torneira). Posteriormente, foi feita uma adaptação do protocolo de Caritá & Marin-Morales (2008) para determinação do Índice Mitótico (IM). As sementes foram postas a germinar em gerbox em distintas diluições dos extratos (25%, 50% e 100%). O controle negativo (CN) foi realizado com água de torneira e o controle positivo (CP) com solução de sulfato de cobre (2%) por ter ação citotóxica comprovada.

Cada tratamento compreendeu um total de 100 sementes, as quais foram incubadas em estufa do tipo BOD por cinco dias a 22 °C, com fotoperíodo controlado de oito horas diárias. O ensaio foi realizado em triplicata. Os meristemas radiculares das plântulas de *A. cepa* foram coletados e fixados em Carnoy acético por 24 horas e, armazenadas em etanol 70%, e em seguida foi realizada a confecção das lâminas. Para isso, as células meristemáticas passaram pela técnica de *squash* e, em seguida foram coradas com solução de Schiff + *Fast Green*, sendo analisadas 5.000 células por tratamento através de microscopia óptica com aumento de 40x. Avaliou-se o total de células em divisão celular para posterior cálculo do IM, além da observação do aparecimento de Pontes Cromossômicas (PC) e Micronúcleos (MN). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPadPrism 5.1, ANOVA e teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Ao analisar os dados referentes ao IM de *A. cepa*, é possível verificar que os extratos *E. plana* nas doses mais elevadas contribuíram efetivamente para a inibição do IM, em comparação com CN tanto em parte aérea (EAA₁₀₀, EAA₅₀, EAA₂₅; P<0,001) quanto para raízes (EAR₁₀₀, EAR₅₀, EAR₂₅; P<0,001). Entretanto, levando em consideração a diferença de doses do mesmo extrato, também foi possível verificar a inibição do IM tanto para extratos contendo parte aérea de *E. plana* (EAA₁₀₀x EAA₂₅, P<0,05; EAA₅₀x EAA₂₅, P<0,05) como para extratos contendo raiz (EAR₁₀₀ x EAR₂₅, P<0,001; EAR₅₀ x EAR₂₅, P<0,001). Ao comparar o IM dos tratamentos de EAA e EAR nas mesmas doses, encontrou-se diferença significativa para as diluições de 50% (EAA x EAR 50, P<0,01) e 25% de extrato (EAA x EAR, P<0,001), não havendo significância para as diluições de 100% dos extratos. Em relação aos dados de genotoxicidade (MN e PC), não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 1).

Desse modo, em estudo realizado por Dalbosco (2013) onde após utilizar diferentes concentrações (100, 200, 300, 400 e 500 ppm) do óleo essencial da parte aérea de *E. plana* sobre germinação de *Ipomoea grandifolia*, verificou a inibição de germinação da espécie na maior concentração de substrato (500 ppm), além da redução de medidas de comprimento do hipocótilo e raiz comparados ao CN (água destilada). Contudo, esses dados remetem ao fato de que o óleo essencial possui ação fitotóxica na espécie receptora, corroborando com os resultados encontrados neste estudo em relação à espécie *A. cepa*.

Diferentemente do encontrado nesse estudo, Mazzocato et al. (2015) verificando a fitotoxicidade de extratos brutos de raiz e parte aérea frescas de *E. plana* na germinação de *Lactuca sativa*, não observaram diferenças significativas de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), medida de comprimento de hipocótilo e de raiz entre os tratamentos, quando comparados ao controle. A diferença de resultados entre estudos infere que as relações de alelopatia para uma mesma espécie vegetal pode ser distinta conforme modelo biológico adotado.

Tabela 1 – Avaliações de índice mitótico (IM), micronúcleos (MC) e pontes cromossômicas (PC) sobre o sistema *Allium cepa* exposto a diferentes extratos brutos aquosos de *Eragrostis plana* (extrato de parte aérea: EAA e de raiz: EAR), em diferentes diluições (100%, 50% e 25%). Bagé - RS. 2016

TRAT.	INT. (células)	PROF. (células)	MET. (células)	ANA. (células)	TELO. (células)	IM (%)	MC (m/DP)	PC (m/DP)
CN	3210	873	475	245	197	36	0,0±0,0	0,0±0,0
CP	4586	391	19	2	2	8	0,0±0,0	0,0±0,0
EAA ₁₀₀	3892	564	254	158	132	22 ^{ab}	1,4±1,2	0,3±0,5
EAA ₅₀	3884	719	202	110	85	22 ^{abd}	1,1±1,1	0,5±0,7
EAA ₂₅	3669	826	231	106	168	27 ^{ac}	1,1±1,3	0,3±0,5
EAR ₁₀₀	3749	822	201	144	84	25 ^{ac}	2,2±1,5	0,8±0,8
EAR ₅₀	3720	608	265	214	193	27 ^{ac}	1,7±2,2	0,6±1,3
EAR ₂₅	3270	927	418	209	176	34	0,7±1,1	0,1±0,3

a P<0,001 em relação ao CN

b P<0,05; c P<0,001 em relação a menor dose do mesmo extrato

d P<0,01; e P<0,001 em relação aos diferentes tratamentos (EAA, EAR) para a mesma dose

Conclusões

Esse é o primeiro estudo realizado sobre a citotoxicidade de *E. plana* provenientes dos campos sulinos envolvendo o modelo *A. cepa*. Logo, é fundamental que sejam testados outros ensaios para verificar a alelopatia do capim-annoni, além da utilização de outros solventes para confecção de extratos dessa espécie. Dessa forma, pretende-se ampliar a compreensão sobre o comportamento aleloquímico, levando em consideração o fato de ser a principal planta invasora dos campos sulinos e Bioma Pampa.

Literatura citada

- Caritá, R. and Marin-Morales, M. A. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere* 72: 722-725.
- Dalbosco, T. 2013. Avaliação do potencial alelopático dos extratos foliares brutos do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e estudo do óleo essencial. Exame de qualificação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – PPGTP, Pato Branco, PR.
- Ferreira, N. R.; Medeiros, R. B. and Soares, G. L. G. 2008. Potencial alelopático do capimannoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. *Revista Brasileira de Sementes* 30: 043-050.
- Mazzocato, A. C.; Artico, L. L.; Paranhos, J. T.; Ferreira, J. L. and Zuliani, A. J. B. 2015. Avaliação do potencial fitotóxico de extratos de *Eragrostis plana* Nees na germinação de sementes de alface. In: 16º Encontro de Botânicos do RS e 8º Encontro Estadual de Herbários. URI, Erechim.
- Nachtigal, G. F. and Costa, F. A. 2010. Modelagem de Nicho Ecológico: implicações na priorização de áreas para exploração e liberação de agentes de biocontrole do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) no Brasil. In: Documento 292 Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.
- Reis, J. C. L.; Moraes, P. V. D. and Monks, P. L. 2008. Sucessão de culturas no controle da vegetação e banco de sementes do solo de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees). *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* 14: 143-149.