

EFEITOS CITOLÓGICOS DO INSETICIDA PIRETRÓIDE DELTAMETRINA EM CEVADA (*Hordeum vulgare* L.)

KARNOPP, Loiva¹, COSTA, Fernando L. C. da¹, LOECK, Alci E.², AMARAL, Carlos O.¹

¹UFPEL, Depto. de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Campus Universitário, Pelotas, RS, CEP 96001-900.

²UFPEL-FAEM, Depto. de Fitossanidade, Campus Universitário, Pelotas, RS, CEP 96010-900
(Recebido para publicação em 08-01-1999)

RESUMO

Avaliou-se os efeitos citológicos provocados pelo inseticida piretróide deltametrina em cevada (*Hordeum vulgare* L.), cultivar MN 599. O inseticida foi aplicado em sementes pré-embebidas e seus efeitos comparados à aplicação dos mutagênicos químicos EMS (2,5% em volume) e MMS (0,1% em volume) aplicados em sementes secas e sementes pré-embebidas. Placas metafásicas com grau de condensação e espalhamento adequados foram obtidas através de pré-tratamento com paradichlorobenzene (PDB) de 4 a 5°C por 30 a 40 minutos e à temperatura ambiente por 6 horas, hidrólise com HCl 1N a 60°C por 6 minutos, esmagamento comorceína acética 1% e posterior imersão da lâmina em solução de Giemsa 2% por 7 minutos. O índice mitótico (IM) apresentou-se diminuído em células meristemáticas que receberam tratamento dos agentes alquilantes EMS e MMS e da deltametrina durante 2 horas. Quando o tratamento de sementes foi de 1 hora o IM das células meristemáticas de cevada tratadas com deltametrina foi maior do que com 2 horas de duração. Os agentes alquilantes EMS e MMS, bem como a deltametrina, induziram aberrações cromossômicas estruturais e numéricas em pontas de raiz de cevada.

Palavras-chave: efeitos citológicos, inseticida piretróide, agentes alquilantes, cevada (*Hordeum vulgare* L.).

ABSTRACT

CYTOLOGICAL EFFECTS OF PYRETHROID INSECTICIDE DELTAMETHRIN IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.). An evaluation was made of the cytological effects caused by a commercial pyrethroid insecticide with deltamethrin as the active principle on barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar MN 599. This insecticide was applied to pre-soaked seeds and the effects compared to the chemical mutagens ethyl methanesulfonate (2.5% by volume) and methyl methanesulfonate (0.1%) applied to dry and pre-soaked seeds. Metaphasic plates with the greatest degree of condensation and adequate spread were obtained by pre-treatment with paradichlorobenzene (PDB) at 4-5°C for 30-40 minutes, followed by six hours at room temperature, hydrolysis 1N with HCl at 60°C for 6 minutes, squashing with acetic orcein 1% and, finally, immersion of the slides in 2% Giemsa solution for seven minutes. The lowest mitotic index (MI) occurred in the meristematic cells that received alkylinte treatment with EMS (ethyl methanesulfonate) and MMS (methyl methanesulfonate) and deltamethrin for two hours. When the seed treatment lasted one hour the MI of barley meristematic cells treated with deltamethrin was higher than in the two-hour treatment. The alkylinte agents EMS and MMS, as well as deltamethrin, induced structural and numerical chromosomal aberrations in the barley root tips.

Key words: cytological effects, pyrethroid insecticide, alkylinte agents, barley (*Hordeum vulgare* L.).

INTRODUÇÃO

Conforme GAUL (1977), os tratamentos mutagênicos resultam em efeitos que podem ser observados

citologicamente. Depois do tratamento das sementes, a análise do primeiro ciclo mitótico das células meristemáticas da raiz pode ser realizada, sendo porém, teste mais laborioso que a medição da altura da plântula.

Os piretróides sintéticos foram desenvolvidos a partir da estrutura química do piretro e representam um quarto dos inseticidas utilizados na agricultura em todo o mundo. Os derivados de piretrinas naturais têm uso limitado na agricultura devido a baixa fotoestabilidade, enquanto os piretróides sintéticos de segunda e terceira geração são fotoestáveis, altamente efetivos contra um largo espectro de insetos e mostram baixa toxicidade para mamíferos (MIADOKOVÁ *et al.*, 1992).

Na literatura relacionada com o uso de compostos químicos em plantas, animais, bactérias, leveduras, insetos e cultura de células de mamíferos, a maioria das pesquisas apresentam a testemunha com menor frequência de anomalias do que os tratamentos, acompanhada de uma diminuição do IM. A maior parte destes estudos em vegetais foram desenvolvidos em ponta de raiz, em várias espécies, em condições de laboratório, tais como: ação de detergentes em cebola (BELLANI *et al.*, 1991); titânio em *Crotalaria laburnifolia* (ABRAHAM & ABRAHAM, 1991); extrato de *Tylophora indica* em cebola (SAGGOO *et al.*, 1991); chumbo em cebola (LERDA, 1992); sulfato de magnésio em *Vicia faba* (ABRAHAM & NAIR, 1989); entre outros.

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar os efeitos citológicos provocados pelo inseticida piretróide deltametrina em cevada (*Hordeum vulgare* L.), cultivar MN 599.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de cevada da cultivar MN 599 foram cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT-EMBRAPA) de Passo Fundo, RS. Os agentes químicos foram os mutagênicos químicos metano sulfonato de metila (MMS)-C₂H₆O₃S, da Merck- Schuchardt, e metano sulfonato de etila (EMS)-C₃H₈O₃S da Sigma Chemical Co., ambos pertencentes à classe dos agentes alquilantes e um inseticida piretróide comercial cujo princípio ativo é a deltametrina. O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Genética do Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

Tratamento das sementes

As sementes com exceção das secas (DS), receberam pré-embebedimento, por período de duas horas e trinta minutos, em água destilada. A solução de mutagênicos químicos e dos inseticidas foram homogeneizados em agitador eletromagnético com aquecimento. As sementes tratadas com agentes químicos foram imersas na solução mutagênica, ou inseticida durante quatro horas, à temperatura ambiente (20 ± 1°C),

permanecendo na capela com exaustão de gases. A seguir, as sementes foram lavadas em água corrente por uma hora, ficando por mais trinta minutos em água parada, para eliminar os resíduos. Seguiu-se a semeadura em caixas germobox, com duas folhas de papel germoteste previamente umedecidas e, em cada germobox, foram semeadas 100 sementes. O material permaneceu no germinador com temperatura de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por sete dias. Cada experimento teve dois controles: sementes com água destilada (DO) e sementes secas (DS). As sementes do DO, após o pré-embobimento, permaneceram em água destilada por igual período em que as sementes tratadas ficaram nas soluções mutagênicas ou de inseticida. A semeadura do controle DS foi realizada no momento em que as sementes tratadas e as do DO foram colocadas no pré-embobimento.

Índice Mitótico

Para avaliar a frequência de divisão celular (índice mitótico), as raízes foram fixadas em álcool etílico e ácido acético glacial (3:1), por sete dias, à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi transferido para etanol 70% e mantido em geladeira à $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$. As raízes foram colocadas em vidro de relógio com uma mistura de nove partes de orceína acética 2% e uma parte de HCl 1N. O vidro de relógio foi aquecido levemente três ou quatro vezes, cinco a dez segundos cada vez. Os meristemas de raiz foram transferidos para lâmina e uma gota de orceína acética 1% foi adicionada para o esmagamento do material. A lâmina foi colocada e o material aquecido e prensado.

Para a contagem das células em divisão celular adotou-se o método de dividir a lâmina em quatro quadrantes. Fez-se a contagem de todas as células em divisão, por fase, e em interfase presentes em um dos quadrantes escolhido aleatoriamente, em três lâminas por repetição. O IM foi calculado como a percentagem de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) do total de células observadas.

Adequação da Técnica de Obtenção de Cromossomos Metafásicos

Pré-Tratamento

Para a obtenção de placas metafásicas com cromossomos bem espalhados e com nível de contração adequado, que permitisse boa visualização e contagem dos cromossomos, foram realizados diversos pré-tratamentos utilizando-se água destilada gelada e solução saturada de paradichlorobenzeno (PDB), como agentes inibidores do fuso.

Fixação, Hidrólise e Coloração

O processo de fixação foi realizado com álcool etílico e ácido acético glacial (3:1), após o pré-tratamento, por sete dias, à temperatura ambiente, sendo o material estocado em álcool 70% à $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para a hidrólise testaram-se duas concentrações de HCl (1N e 5N) em diferentes tempos e temperaturas. Para coloração testou-se Feulgen, Giemsa, orceína e carmim em diversas concentrações.

Efeito aditivo de agentes químicos e colchicina

A fim de averiguar o efeito combinado de agentes químicos e colchicina, foi realizado tratamento de plântulas. O experimento foi conduzido com 100 sementes por germobox e três repetições de cada concentração. Os seguintes agentes químicos e concentrações foram utilizados: MMS (0,1%), EMS (2,5%), deltametrina (2,0%), colchicina (0,05%) e testemunha. O experimento foi dividido em dois grupos. Grupo I: 40 horas após a semeadura, as soluções de tratamento foram adicionadas ao germobox onde permaneceram por duas horas. Ao final deste período os agentes químicos foram removidos, com o auxílio de um sugador e o material foi lavado e reconduzido ao germinador. Imediatamente após o término do tratamento, uma amostra foi fixada (testemunha), sendo que as demais receberam colchicina e foram coletadas em diferentes períodos de tempo, variando entre duas e 48 horas após o término do tratamento. Grupo II: a metodologia utilizada foi praticamente a mesma, com alteração do intervalo entre semeadura e aplicação dos produtos químicos (47 horas), no tempo de exposição aos produtos químicos (uma hora) e no intervalo de tempo entre as amostras coletadas que variou de uma hora até 40 horas após o término do tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de cromossomos de ponta de raiz de cevada

O pré-tratamento com PDB na temperatura de 4 a 5°C por 30 a 40 minutos e temperatura ambiente por 6 horas apresentou melhores resultados. O melhor resultado para hidrólise foi obtido com HCl 1N a 60°C por 6 minutos e esmagamento com orceína acética 1% e posterior imersão da lâmina em solução de Giemsa 2% por 7 minutos.

Índice mitótico ou frequência de divisão celular

Observa-se que mais de 95% das células encontravam-se no estágio de interfase por ocasião da fixação (Tabelas 1, 2, 3).

TABELA 1. Frequência de divisão celular em células de ponta de raiz de cevada, cultivar MN 599, em todas as fases da mitose, tratadas com EMS

Fase divisão celular (Mitose)	Grupo I		Grupo II		Testemunha	
	F. Ab.	F. Rel. (%)	F. Ab.	F. Rel. (%)	F. Ab.	F. Rel. (%)
Prófase	233	1,63	142	1,48	574	2,19
Metáfase	66	0,46	20	0,21	245	0,93
Anáfase	50	0,35	23	0,24	349	1,33
Telófase	60	0,42	06	0,06	77	0,29
Total	409	2,86	191	1,99	1.245	4,75
Interfase	13.905	97,14	9.430	98,01	24.963	95,26
N total	14.314		9.621		26.208	
IM	2,86		1,98		4,75	

Estes resultados já eram esperados pois, segundo GUERRA (1988) a interfase, composta dos períodos G1, S e G2 é a fase mais longa do ciclo celular. Dentre as células em divisão mitótica, o estágio de maior frequência foi a prófase e o com menor foi a telófase, com exceção do grupo I tratado com EMS em que a fase menos freqüente foi a anáfase (Tabela 1). O tratamento com EMS reduz bastante a frequência das fases do ciclo de divisão celular (Tabela 1), redução esta que pode ser desde 1,3 vezes (anáfase do grupo I) até cerca de 5,5 vezes (anáfase do grupo II). Desta maneira o EMS consegue reduzir, praticamente pela metade, o índice mitótico: 4,74 (testemunha); 2,86 (grupo I) e 1,99 (grupo II). O tratamento com agentes químicos reduz o

índice mitótico, com exceção do tratamento com deltametrina por 1 hora que provocou um leve acréscimo do índice mitótico.

Na Tabela 2 verifica-se que a redução a nível de fases da divisão celular provocada pelo MMS é ainda mais drástica. Esta redução pode ser em cerca da metade (prófase do grupo II) ou tão drástica como a ocorrida na anáfase em que o material tratado por 1 hora com MMS é cerca de 3,2 vezes menos freqüente que a testemunha, sendo o material tratado por 2 horas cerca de 33 vezes menos freqüente. Isto leva a uma grande redução do IM do material tratado com este mutagênico químico, quando comparado com a testemunha (IM de 4,74; 1,82 e 0,47 respectivamente da testemunha, do material do grupo II e do grupo I).

TABELA 2. Frequência de divisão celular em células de ponta de raiz de cevada, cultivar MN 599, em todas as fases da mitose, tratadas com MMS

Fase divisão celular (Mitose)	Grupo I		Grupo II		Testemunha	
	F. Ab.	F. Rel. (%)	F. Ab.	F. Rel. (%)	F. Ab.	F. Rel. (%)
Prófase	60	0,38	180	0,99	574	2,19
Metáfase	06	0,04	44	0,24	245	0,93
Anáfase	06	0,04	76	0,42	349	1,33
Telófase	02	0,01	31	0,17	77	0,29
Total	74	0,47	331	1,82	1.245	4,74
Interfase	15.867	99,53	17.823	98,18	24.963	95,26
N total	15.941		18.154		26.208	
IM	0,46		1,82		4,75	

O tratamento com deltametrina por 1 hora, praticamente não reduz a frequência de células em prófase nem em telófase (Tabela 3); propicia uma pequena redução em anáfase e um incremento na frequência de células em

metáfase (testemunha 0,93 e grupo I 1,97). Já o tratamento com deltametrina por 2 horas reduz a frequência de todas as fases do ciclo mitótico (de cerca de 1,5 vezes em prófase, metáfase e telófase até 3 vezes em anáfase).

TABELA 3. Frequência de divisão celular em células de ponta de raiz de cevada, cultivar MN 599, em todas as fases da mitose, tratadas com DECIS

Fase divisão celular (Mitose)	Grupo I		Grupo II		Testemunha	
	F. Ab.	F. Rel. (%)	F. Ab.	F. Rel. (%)	F. Ab.	F. Rel. (%)
Prófase	208	1,42	215	2,08	574	2,19
Metáfase	75	0,51	203	1,97	245	0,93
Anáfase	66	0,45	89	0,86	349	1,33
Telófase	27	0,18	24	0,23	77	0,29
Total	376	2,56	531	5,14	1.245	4,74
Interfase	14.316	97,44	9.786	94,86	24.963	95,26
N total	14.692		10.317		26.208	
IM	2,56		5,15		4,75	

O incremento de células em metáfase elevou o IM do grupo II, no entanto, o grupo I, que recebeu tratamento por 2 horas, apresenta o IM reduzido em cerca da metade. Este aumento do IM pode ter várias razões. Segundo RAO *et al.* (1988), o aumento do IM em meristema de raiz de cebola tratadas com o inseticida Endossulfam é o resultado da acumulação de configurações C-metafásicas em tempo zero de recuperação. ADAM *et al.* (1990) relatam que o aumento do IM causado pelo Malatiom não foi acompanhado pelo aumento do conteúdo de DNA, então o efeito na molécula de DNA não pode ser atribuído ao inseticida. Já SAGGOO *et al.* (1991) ressaltam que a elevação do IM pode ser devido a indução de divisão celular em células diferenciadas. Segundo WEBSTER E DAVIDSON (1969) e SHARMA

(1971), substâncias que induzem divisão celular em baixas concentrações causam depressão mitótica à concentrações altas, devido ao prolongamento da fase S e a diminuição de células em G1. Já AMER & FARAH (1983 e 1985), trabalhando com os inseticidas organofosforados Dursban e Metamidofós e AMER & MIKHAEL (1986), com rotenona, ambos em *V. faba*, registraram casos onde o IM não foi afetado.

Anomalias cromossômicas

A frequência de células em metáfase, na testemunha, é de cerca de 1%; no material tratado com os agentes químicos esta frequência é bastante reduzida, ficando em torno de 0,51 a 0,04% das células, das quais a maioria não apresenta placas

metafásicas adequadas para um estudo mais detalhado da morfologia e número cromossômico. Além disto, os agroquímicos parecem influir negativamente no estado celular geral, verificando-se que o material tratado apresenta células vazias e cromossomos desnaturados bem diferentes daqueles encontrados no material testemunha. Estes fatos impediram a obtenção de uma amostra consistente, mesmo tendo-se pré-tratado tanto as testemunhas como o material tratado com agentes químicos com diversas horas de colchicina na tentativa de obter-se um maior número de células em metáfase. Pode-se observar que tanto o material tratado com MMS, EMS e deltametrina, assim como a testemunha, apresentavam a maioria das células metafásicas normais; também normais apresentavam-se as células em prófase, anáfase e telófase. No entanto o material tratado apresentou também anomalias numéricas e estruturais como a formação de pontes anafásicas.

O presente trabalho indicou a necessidade de uma amostra bem maior para a observação de placas metafásicas a fim de verificar as anomalias cromossômicas causadas por agentes químicos. As poucas metáfases e anáfases observadas mostraram que tanto os mutagênicos químicos utilizados (EMS e MMS), como deltametrina provocam anomalias cromossômicas, anomalias estas não encontradas nas testemunhas. Estas aberrações cromossômicas, tanto estruturais como numéricas são citadas por diversos autores em várias espécies tratadas com agentes químicos: DES em *Rhizoctonia* (VERMA & JHA, 1988), EMS em *Escherichia coli* e *Zea mays* (ATHANASIOU & HEDDLE, 1980), irradiação gama, EMS, DES e EI em *Solanum nigrum* (KOTHEKAR, 1987); raios gama e EMS e NMU em tomate (JAYABALAN & RAO, 1988); raios gama e EMS em *Solanum melongena* (ZEERAK, 1991), entre outros.

CONCLUSÕES

Os agentes alquilantes MMS e EMS reduzem o IM de células de ponta de raiz de cevada tratadas tanto por 1 como por 2 horas e deltametrina reduz o IM somente após 2 horas;

O pré-tratamento das ponta de raiz de cevada com PDB propicia a obtenção de placas metafásicas com cromossomos com grau de condensação e espalhamento adequados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT-EMBRAPA), Passo Fundo, RS, pela doação das sementes de cevada; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo e ao Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S. M.; ABRAHAM, S. Studies on the influence of pollutants from the Titanium factory on growth and cells divisions in *Crotalaria laburnifolia* Linn. **Cytologia**, v.56, p.555-558. 1991
- ABRAHAM, S.; NAIR, R. B. Production of mitotic abnormalities by Magnesium Sulphate in *Vicia faba* L. **Cytologia**, v.54, p.559-563. 1989
- ADAM, Z. M.; EBAD, F. A.; ABO-EL-KHEIR, A.; EL-SHEIKH, I. Alterations in nucleic acids, protein content and mitotic division of *Vicia faba* root tips cells as affected by Malathion and Tamaron insecticides. **Cytologia**, v.55, p.349-355. 1990
- AMER, S. M.; FARAH, O. R. Cytological effects of pesticides XII. Effects of the phosphorothioate insecticide dursban on the mitosis of *Vicia faba*. **Cytologia**, v.48, p.27-33. 1983
- AMER, S.M.; FARAH, O. R. Cytological effects of pesticides XV. Effect of the insecticide Methamidophos on root-mitosis of *Vicia faba*. **Cytologia**, v.50, p.521-526. 1985
- AMER, S.M.; MIKHAEL, E. E. Cytological effects of pesticides XVI. Effect of the insecticide rotenone on root-mitosis of *Vicia faba*. **Cytologia**, v.51, p.171-176. 1986
- ATHANASIOU, K.; HEDDLE, J. A. EMS induced mutation rates and their relation to genome size. **Can. J. Gen. Cytol.**, v.22, p.455. 1980
- BELLANI, L. M.; RINALLO, C.; BENNICI, A. Cyto-morphological alterations in *Allium* roots induced by surfactants. **Environmental and Experimental Botany**, v.31, p.179-185. 1991
- GAUL, H. Mutagens effects observable in the first generation: cytological effects. In: Manual on mutation breeding. IAEA, Vienna, p.87-90. 1977
- GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**, Editora Guanabara S.A., Rio de Janeiro, p.142. 1988
- JAYABALAN, N.; RAO, G. R.. Cytological effects of single and combination treatments of physical and chemical mutagens on tomato. **Cytologia**, v.53, p.601-605. 1988
- KOTHEKAR, V. S.. Induced chromosomal aberrations in diploid and tetraploid *Solanum nigrum* L. **Cytologia**, v.52, p.107-110. 1987
- LERDA, D. The effect of lead on *Allium cepa* L. **Mut. Res.**, v.281, p.89-92. 1992
- MIADOKOVÁ, E.; VLCKOVÁ, V.; DUHOVÁ, V.; TREBATICÁ, M.; GARAJOVÁ, L.; GROLMUS, J.; PODSTAVKOVÁ, S.; VLCEK, D. Effects of supercypermethrin, a synthetic developmental pyrethroid, on four biological test systems. **Mut. Res.**, v.280, p.161-168. 1992
- RAO, B. V.; RAO, B. G. S.; SHARMA, C. B. S. R. (1988). Cytological effects of herbicides and insecticides on *Allium cepa* root meristems. **Cytologia**, v.53, p.255-261.
- SAGGOO, M. I. S.; KUMARI, S.; BINDU. Cytological effects of Indian medicinal plants I. Mitotic effects of leaf homogenate to *Tylophora indica* L. on *Allium cepa*. **Cytologia**, v.56, p.633-637. 1991
- SHARMA, C. B. S. R. Cytological effects of chemicals on mitotic plant cells. **Jour. Scientific and Indu. Res.**, v.30, p.571-587. 1971
- VERMA, B. N.; JHA, C. N. Effect of diethyl sulphate on *Rhizoclonium* Kuetz. **Cytologia**, v.53, p.283-286. 1988
- WEBSTER, P. L.; DAVIDSON, D. Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and indol-3-acetic acid in *Vicia* roots. **J. Expt. Bot.**, v.56, p.148-164. 1969
- ZEERAK, N. A. Cytogenetical effects of Gamma Rays and Ethyl Methanesulphonate in brinjal (*Solanum melongena* L.). **Cytologia**, v.56, p.639-643. 1991