
Protocolo para avaliação dos efeitos de extratos vegetais sobre a germinação e crescimento inicial de alface em microplacas de seis poços

Priscila Torres^{1,*}
Paula Novaes¹
Janaína S. Pires¹
Fungyi Chow¹
Déborah Y. A. C. dos Santos¹

RESUMO

O principal objetivo deste estudo foi a adaptação de um protocolo para avaliar a fitotoxicidade de extratos vegetais sobre aquênios de alface utilizando placas de seis poços. O bioensaio é realizado com a adição de oito aquênios de alface em cada poço de uma microplaca de seis poços contendo papel de filtro umedecido com 1 mL de solução do controle negativo, do controle positivo ou dos extratos. Após sete dias, além de contar o número de plântulas, a microplaca de seis poços é congelada em freezer por 24h, após esse período as plântulas são descongeladas, escaneadas e, com a ajuda do programa de uso livre ImageJ®, o comprimento da raiz, do hipocótilo ou qualquer outra parte pode ser medido.

Palavras-chave: alelopatia, atividade biológica, bioensaio, ImageJ®, microplaca de 6 poços

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brasil

* E-mail: priscila.torres@usp.br

INTRODUÇÃO

A ação alelopática de uma planta só pode ser confirmada por meio de evidências em campo, com o isolamento de metabólitos responsáveis pela fitotoxicidade (aleloquímicos) e pela identificação de seus mecanismos de ação (Inderjit e Weston, 2000), parâmetros nem sempre fáceis serem determinados. Dessa maneira, alternativamente, testes de fitotoxicidade em laboratório são realizados a fim de simular o que ocorre em campo (Novaes et al., 2013). Ensaio de germinação e de análise do crescimento de plântulas em placas forradas com papel de filtro e umedecidas com soluções de extratos vegetais têm sido o tipo de teste mais tradicionalmente usado nesses experimentos, principalmente por serem simples, práticos, baratos e rápidos (Duke et al., 2000; Vyvian, 2002). Além disso, esse tipo de avaliação auxilia no biomonitoramento de cada etapa do isolamento, purificação e identificação de aleloquímicos, direcionando as ações de escolha das frações mais promissoras (Macías et al., 2000).

Nesses testes, a espécie-padrão mais comumente usada como alvo é a alface (*Lactuca sativa* L.), por apresentar alta sensibilidade a diferentes substâncias, grande facilidade de cultivo, baixo custo e um rápido e homogêneo crescimento em condições distintas de potencial osmótico e pH (Ferreira e Aquila, 2000; Simões et al., 2013). Todas estas características tornam a alface um modelo de planta terrestre bastante usado em bioensaios laboratoriais de monitoramento de substâncias ativas, visando, principalmente, a busca por novos herbicidas e/ou bioestimulantes. Apesar das críticas ao seu uso devido a sua grande suscetibilidade, testes com alface ainda são importantes, pois possibilitam a comparação dos resultados obtidos com diferentes metabólitos em diversos estudos.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para ensaio de fitotoxicidade utilizando alface como espécie-padrão alvo, que demande menor quantidade de extratos e/ou substâncias isoladas para os testes, propicie maior número de repetições em menor espaço e facilite a obtenção das medidas



relativas ao desenvolvimento inicial das plântulas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes: DMSO (dimetilsulfóxido), MES (ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico), NaOH (hidróxido de sódio), herbicida para controle positivo (no presente trabalho foi usado Glifosato Roundup®) e água ultrapura.

2. Materiais e equipamentos: aquênios de alface (variedades testadas: Boston branca, Grand rapids e Baba de verão), microplacas de seis poços com tampa, discos de papéis de filtro de 3,2 cm de diâmetro, pinças, parafilme, micropipeta e ponteiros de 1 mL, medidor de pH, escâner (equipamento usado: Epson Perfection V330 Photo®) e programa livre ImageJ® (versão usada: 1.47v).

3. Preparação das soluções:

3.1. Tampão MES/NaOH: pesar 1,95 g de MES e dissolver em volume final de 1000 mL de

água ultrapura. Em seguida, pesar 3,9 g de NaOH e dissolver em volume final de 10 mL de água ultrapura. Usar esta solução de NaOH para ajustar o pH da solução de MES até pH 6 (validade: 1 mês armazenada em geladeira).

3.2. Tampão MES/NaOH contendo DMSO 0,5%: em balão volumétrico de 100 mL adicionar 500 µL de DMSO e completar o volume com tampão MES/NaOH. Essa solução será utilizada para dissolver as amostras e como controle negativo.

3.3. Controle positivo: Usar um herbicida da sua escolha e preparar a solução na concentração recomendada pelo fabricante. No caso do herbicida glifosato é interessante prepará-lo na concentração de 0,5% conforme indicado pelo fabricante, dissolvendo a quantidade necessária em tampão MES/NaOH contendo DMSO 0,5%.

4. Preparo dos extratos: dissolver os extratos em tampão MES/NaOH contendo DMSO 0,5% na concentração desejada. As



concentrações sugeridas são 0,8, 0,4 e 0,2 mg/mL para extratos e 1, 0,3, 0,1, 0,03 e 0,01 μ M para substâncias puras. A utilização de pelo menos três concentrações possibilita calcular o IC50 (concentração necessária para inibir 50% da germinação ou do crescimento inicial em relação ao controle). Observação: volume mínimo de cada solução a ser testada = 4 mL.

5. Montagem da microplaca:

5.1. Cada microplaca representará um tratamento avaliado (extratos ou controle negativo ou positivo) e cada poço da microplaca será considerado uma repetição deste tratamento (6 repetições).

5.2. Os poços devem receber um disco de papel de filtro, 1 mL das soluções do controle negativo, do controle positivo ou dos extratos, e oito aquênios. Tampar a microplaca e selar com parafilme.

5.3. Incubar as microplacas em câmara de cultivo climatizada com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C.

5.4. No sétimo dia (Fig. 1), transferir as microplacas para freezer (-20°C) por 24 h para, após o descongelamento, facilitar as medidas de crescimento inicial.

6. Medidas de crescimento:

6.1. Retirar do freezer a microplaca a ser analisada. Esperar que as plântulas descongelem ou descongele-as adicionando pequena quantidade de água em temperatura ambiente.

6.2. Com auxílio de uma pinça, secar levemente as plântulas em papel absorvente e coloca-las sobre o escâner. Escanear em 600 dpi e salvar a imagem em jpeg.


6.3. No programa ImageJ®² abrir a foto escaneada em “File” → “Open” (Fig. 2A).

² <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>



6.4. No programa, clicar em “Analyze” → “Set Scale” e preencher as informações. Em “Distance in pixels” colocar a resolução usada para escanear as plântulas; em “Known distance” colocar 2.54 (valor para converter polegadas em centímetros); “Pixel aspect ratio” = 1.0; “Unit of length” = cm (Fig. 2B).
Observação: use sempre ponto para separar os números. Clicar “OK”.

6.5. Com o botão direito do mouse clicar sobre

o ícone  e selecionar “Segmented Line”.

O ícone mudará para  (Fig. 2C).

6.6. Tracejar a porção da plântula que quer medir com esta ferramenta. O exemplo mostra a mensuração da raiz (Fig. 2D).

6.7. Em seguida, clicar em “Analyze” → “Measure”. Abrirá um quadro “Results” com o resultado do comprimento referido em “Length” (Fig. 2E). Após fazer as medições transferir os valores para uma planilha de dados como no Excel®.



Figura 1. Plântulas de alface (variedade: Baba de verão) cultivadas em placas de seis poços após 7 dias na câmara incubadora.

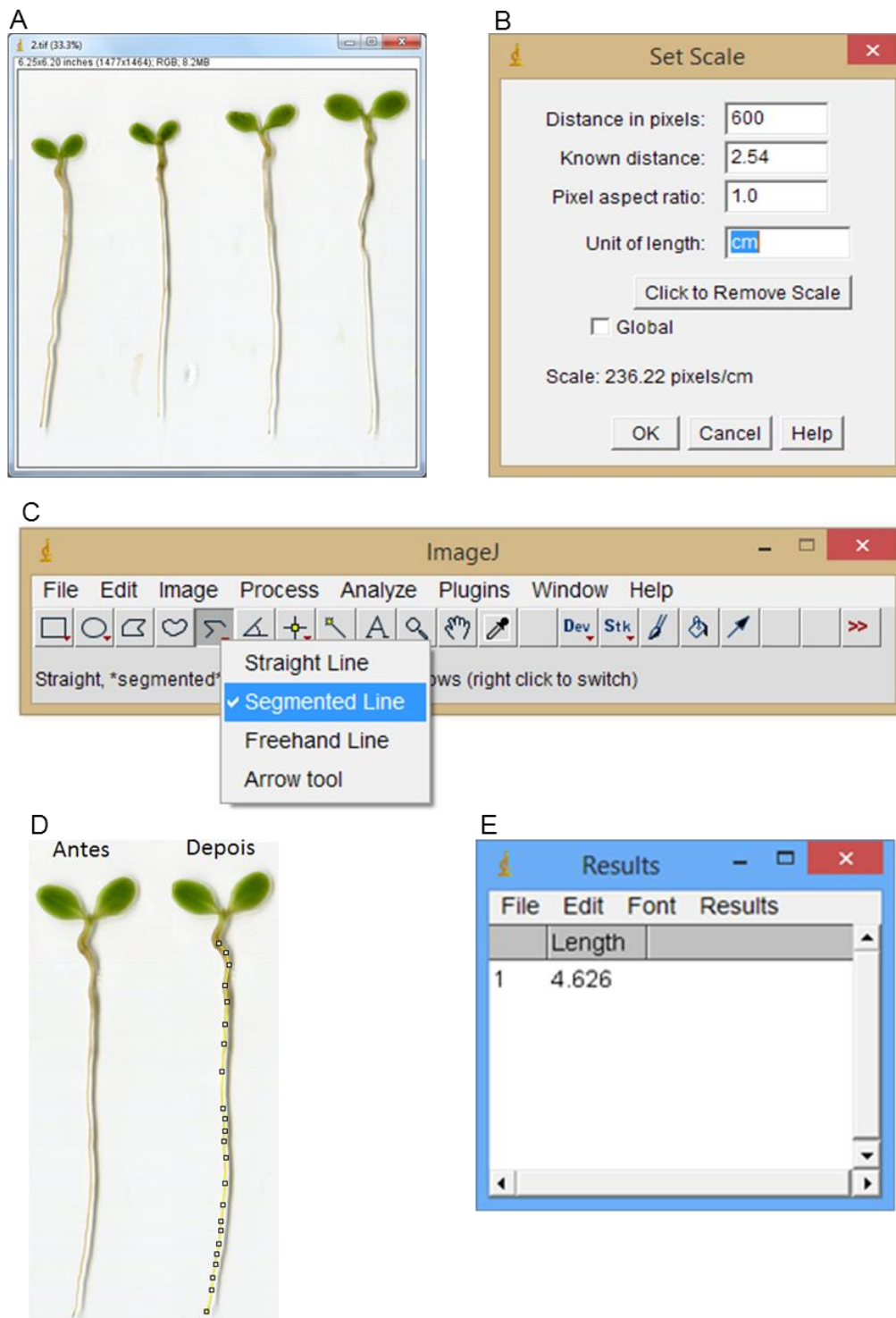


Figura 2. Etapas para as medidas de crescimento usando o programa ImageJ®. A. Imagem da janela do programa ImageJ® com as plântulas de alface escaneadas em 600 dpi; B. Imagem da janela do programa ImageJ®. Selecionando “Set Scale”; C. Imagem da janela do programa ImageJ®. Selecionando “Segmented line”; D. Plântula antes e depois do uso da ferramenta tracejar no programa ImageJ® para medida da raiz; E. Imagem da janela do programa ImageJ®. Quadro “Results”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plântulas da Figura 2A foram medidas como exemplo e os resultados estão na Tabela 1. As plântulas apresentaram comprimento médio da raiz de $4,21 \pm 0,41$ cm e de hipocótilo de $0,38 \pm 0,04$ cm.

Tabela 1. Medidas da raiz e do hipocótilo das plântulas apresentadas na Figura 2. As plântulas foram numeradas da esquerda para direita.

Número da plântula	Raiz (cm)	Hipocótilo (cm)
1	3,979	0,328
2	3,767	0,427
3	4,436	0,401
4	4,672	0,394

Tradicionalmente, os ensaios de fitotoxicidade são realizados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, usando cerca de 5 mL de solução de extratos ou de substâncias isoladas para serem testados (Weidenhamer et al. 1987; Dornbos e Spencer, 1990). Com essas placas, em uma prateleira de uma câmara de germinação convencional (por exemplo, Câmara Germinadora - Fanem® modelo 347-CDG)

podem ser abrigadas cerca de 15 placas de Petri.

Com o protocolo apresentado, o espaço ocupado pelas placas de seis poços é bastante otimizado, possibilitando a análise de um maior número de réplicas. O espaço ocupado por uma placa de seis poços é equivalente ao ocupado por uma única placa de Petri de 9 cm. Além disso, também é possível reduzir drasticamente a quantidade de solução de extratos ou de substâncias puras utilizadas. Com os mesmos 5 mL normalmente usados em uma placa de 9 cm são montadas cinco réplicas, visto ser necessário somente 1 mL de solução para cada poço.

O presente protocolo foi estabelecido utilizando-se alface como espécie alvo modelo, mas pode servir para ensaios com outras espécies que tenham sementes diminutas, tais como as analisadas por Macías et al. (2000).



AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (2013/07543-0, Biota/Fapesp 2013/50731-1) pelo suporte financeiro. PBT foi bolsista de doutorado do CNPq. JPS e PN foram bolsistas de doutorado e pós-doutorado, respectivamente, da CAPES. DYACS e FC têm bolsa de produtividade PQ-CNPq.

REFERÊNCIAS

Dornbos D, Spencer G. 1990. Natural products phytotoxicity A bioassay suitable for small quantities of slightly water-soluble compounds. *Journal of Chemical Ecology* 16: 339–352.

Duke SO, Dayan FE, Romagni JG, Rimando AM. 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research* 40: 99-111.

Inderjit, Weston L.A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? *Journal of Chemical Ecology* 26: 2111-2118.

Ferreira AG, Aquila ME. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 175-204.

Macías FA, Castellano D, Molinillo JMG. 2000. Search for standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2512-2521.

Novaes P, Imatomi M, Miranda MAFM, Gulatieri S.C.J. 2013. Phytotoxicity of leaf aqueous extract of *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) on weeds. *Acta Scientiarum Agronomy* 35: 231-239.

Simões MS, Madail RH, Barbosa S, Nogueira MDL. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. *Revista Biotemas* 26: 29–36.

Vyvyan JR. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58: 1631-1646.



Weidenhamer JD, Morton TC, Romeo JT.
1987. Solution volume and seed
number: Often overlooked factors in
allelopathic bioassays. *Journal of
Chemical Ecology* 13: 1481–1491.

