

Manual prático para utilização de *Tradescantia* como biomonitor & bioacumulador, *Allium cepa* L. (cebola) e pollen abortion.

*Débora-Jã de Araujo Lobo*



Foto 1: Flor de *Tradescantia* clone KU20 – autor: Fernando Annes

### ***Dedicatória***

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por acreditar na possibilidade inerente ao ser humano de superar seus limites. Aos meus dois irmãos (Gré de Araujo Lobo e Arã de Araujo Lobo) por alentarem sempre esse meu sonho de ser melhor.

Aos amigos de ontem, de hoje e aos que virão, por trilharem comigo esses, às vezes, pedregosos caminhos da vida.

Ao meu sobrinho Tiago Pomella Lobo pelo seu afeto.

## Índice

Introdução e algumas “dicas”	pg 03
I- Método para intoxicação	pg 06
II- Material necessário para fazer as lâminas	pg 09
III- Resumo: Intoxicação das Tradescantias	pg 10
IV- Montando lâminas de Tradescantia	pg 10
V- Formando um jardim	pg 13
VI- Quantas inflorescências coletar	pg 14
VII- Pelo estaminal	pg 17
VIII- Quantificação do número de mutações cor-de-rosa em cada pelo estaminal	pg 18
IX- Preparando o corante Carmim	pg 19
X- Solução de Hoagland	pg 20
XI- Cebolas	pg 21
XII- Utilizando a Tradescantia como bioacumulador	pg 24
XIII- Polen abortion	pg 25
Bibliografia	pg 26

### ***Introdução e algumas “dicas”***

Já desde o início do século passado (XX), por volta dos anos 30, alguns grupos iniciaram nos EUA e Europa o estudo e utilização de plantas como bioindicadoras. As plantas serviram como biomonitores em diversas situações, desde avaliação de pesticidas em campo passando por análises de solo, água e ar ou ainda detectando vazamentos em usinas nucleares. Com esse propósito foram criados vários clones em diversas partes do mundo, mas daremos maior ênfase às KU-20 e à *Tradescantia pallida*. Sobre o clone 4430 resultado de hibridização entre espécies de *Tradescantia* (*T.hirsutiflora* X *T.subacaulis*) pouco será falado, mas o procedimento é o mesmo do outro clone.

As plantas servem para se fazer uma primeira abordagem do problema que se queira verificar, pois são muito sensíveis, mas pouco específicas, ou seja, ela vai indicar o sinergismo que ocorre na solução ou meio onde está. A partir daí, pode-se fazer uma análise de conteúdo foliar por métodos mais sofisticados. Atualmente trabalhamos com os clones de uma planta : a *Tradescantia* , que apresenta excelentes resultados .

Os estudos mostraram durante todo o século XX uma ampla gama de plantas específicas para determinados poluentes que se desejava avaliar.

No Japão foram criados os clones KU-20, KU-9 e outros também KU.

Clones, são todos geneticamente iguais, e não se reproduzem por meio da meiose (ela porém acontece) e apesar de produzirem flores, estas são estéreis.

Duas espécies (KU-20 e *Tradescantia pallida*) são objetos de nossos estudos em Poluição Atmosférica, na cidade de São Paulo e outras localidades do País.

A *Tradescantia pallida* foi um achado do nosso Laboratório nos jardins da Faculdade de Medicina da USP, já que também era uma *Tradescantia*, fomos atrás de padronizar sua resposta e produziu excelentes resultados. Apesar de a *Tradescantia pallida* produzir ciclos de meiose e suas flores não serem estéreis, a variabilidade genética intrínseca a essas plantas pode ser um forte aliado, pelo fato dessas plantas poderem responder de forma mais fiel aos poluentes a que possa estar submetida.

Diga-se de passagem, que o clone 4430 não se desenvolve a contento em nosso clima tropical, o calor e a umidade facilitam o aparecimento de pragas difíceis de serem debeladas, já que venenos agrícolas (inseticidas) em plantas que vão ser utilizadas em experimentos, com certeza afetam o resultado final, por serem os pesticidas muito tóxicos. O clone 4430 é facilmente atacado por pulgões e cochonilhas, e o trabalho que se tem para manter a planta limpa não é nada compensador e deve ser feito manualmente. A alternativa é a criação do clone 4430 em casas de vegetação ou estufas, se possível, com temperatura e umidade controladas, mesmo assim não se pode descuidar da limpeza da planta no mínimo semanalmente.

Já o clone KU-20, por ser mais robusto, é menos atacado por pragas e sua utilização, mesmo computando-se as despesas de manutenção, é compensadora. O mesmo se aplica à nossa *Tradescantia pallida*, utilizadíssima na cidade de São Paulo como ornamentação em parques e jardins, necessitando de muitos poucos cuidados para seu crescimento.

Na *Tradescantia pallida*, a maceração pode ou não incluir a retirada das pétalas antes da colocação de uma pequena gota do corante Carmin, logo em seguida macerar um pouco os estames da flor e levar ao microscópio, no aumento de 10X para visualizar se existem tétrades ou não. Em caso positivo, macerar um pouco mais e só então limpar e colocar a lamínula. Nisso ela difere bastante dos clones, nos quais se as pétalas não forem retiradas antes, na hora de se retirar os “debris”, existe um “arrasto” das tétrades, junto.



Foto 2.: Hastes florais de *Tradescantia pallida* em exposição

Foto cedida pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental - FMUSP

Conjunto de *Tradescantia pallida*, expondo, observe que a solução deve ser aerada com bombinhas de aquárias e pequenas mangueiras, para que haja oxigênio para as plantas e a água ou solução de Hoagland não termine mofando, podendo alterar o resultado do experimento.

A solução de Hoagland é uma solução nutritiva de macro e micronutrientes, utilizado na dosagem de 1:3 (uma parte de solução-mãe em três partes de água). As quantidades especificadas no final do manual se referem à preparação de um litro, para obter maiores quantidades, basta manter a proporção.

Essa solução é utilizada para manter as hastes da planta híidas quando o experimento necessita de mais dias para ser feito, como por exemplo, leitura de pelos estaminais ao longo de vários dias ou transporte para campo.

### ***Método para intoxicação***

*Tradescantia pallida*: coletar cerca de 20 hastes por amostra de solução tóxica que se queira analisar, não deixar de fazer o controle negativo, o controle positivo e o “branco” (no branco, utiliza-se o veículo em que foi feita a diluição, mostrando que essa solução em questão por si só não provoca mutação). Essas hastes são também chamadas de “cuttings” e devem ter cerca de 10 a 15 cm. Colocá-las em água de torneira ou solução de Hoagland (1:3) por 24h, é a chamada fase de adaptação. Após esse período, intoxicar, transferindo as hastes para a solução que se deseja analisar, deixando por 8 horas e em seguida passar os “cuttings” para uma nova solução de Hoagland (1:3) ou mesmo água de torneira e deixar mais 24h (esse é o período de recuperação). Depois de efetuado todo esse procedimento, colocar as inflorescências no fixador (1 parte de ácido acético para 3 partes de álcool etílico a 98° e deixar por no mínimo 48h antes de iniciar a análise das inflorescências).

Nossa experiência mostrou que não há necessidade dos macro e micronutrientes na fase de adaptação que pode ser feita na água de torneira, sem prejuízo para o experimento. O mesmo se aplica para a fase de recuperação.

Ver nas fotos, a fase correta quando a planta ainda está no



jardim, verifique que ela apresenta um “bercinho” como na foto mais acima, no centro do qual se encontra a inflorescência (conjunto de várias flores).



O mesmo serve para a KU-20, que tem a inflorescência no ápice da haste (observar na foto abaixo). Clone KU-20, observar que sempre existem duas folhas dispostas de modo a proteger a inflorescência.



Foto mostrando a disposição dos botões no ápice da haste floral (sem as folhas de proteção) de um clone KU-20.

Importante dizer que no clone a disposição das flores é bastante intrincada e que a fase de tétrade se encontra da 3<sup>a</sup> à 5<sup>a</sup> flor, contando de cima para baixo.

***Material necessário para fazer as lâminas***

Da esquerda para a direita: um lápis para anotações na lâmina, um isqueiro para acender a espiriteira, sob o lápis e o isqueiro, lenço de papel para absorver o excesso de carmin quando for pressionar a lamínula, após o aquecimento; mais ao fundo um pouco de carmin em frasco conta-gotas e a espiriteira, à frente da espiriteira: lamínulas 20x20mm, em frente logo abaixo uma lâmina tamanho padrão sobre um fundo escuro, ao lado direito estiletes histológicos e uma pinça.



## ***II- Resumo: Intoxicação das Tradescantias***

Coletar as plantas com inflorescência, deixando uma haste de cerca de 10cm.

Imergir as hastes em água (pode ser de torneira ou pode ser destilada)

Deixar por 24 horas (período de adaptação) na água

Intoxicar com o que se deseja, por 8 horas.

Deixar mais 24 horas (período de recuperação) em solução de Hoagland 1:3.(solução de micro e macro nutrientes) ou água.

Colocar no fixador de plantas (ac.acético / álcool na proporção de 1:3, também chamado Carnoy).

Montar lâminas para leitura.

## ***III-Montando lâminas de Tradescantia***

Com as inflorescências no fixador, já sem as folhas, iniciaremos o processo, colocando uma delas sobre uma lâmina.

Apenas didaticamente, apresento a inflorescência como deve ficar na hora da escolha do botão correto, três flores de tamanho pequeno, médio e maior. Restarão duas flores que em 99,99% das vezes estão muito velhas para achar tétrades, exemplificadas pela pequena haste e as duas flores que estão ao centro da foto, abaixo.

Deve-se escolher, de preferência, das médias a maior, seguindo de acordo com o que for encontrado, se muito jovem, para uma flor mais velha, se muito velha, para um botão mais jovem.

Dessa maneira evita-se muito desperdício de tempo, abrindo botão por botão aleatoriamente.



Abaixo observa-se a retirada das 3 flores de um lado, o mesmo devendo ocorrer com o outro lado, não esquecendo que aqui, a inflorescência está à fresco, e que ela fica com um aspecto translúcido depois das 48h no fixador.

Dessa forma, você acertará na primeira tentativa, na grande maioria das vezes.



Achar a fase correta, que corresponde à fase onde se encontra muitas tétrades, quando as células-mãe do grão de pólen estão encapsuladas dentro de uma membrana de celulose apresentando o aspecto de um disco de pizza cortado em 4.

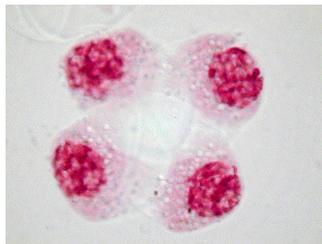


Foto no aumento de 100X, mostrando o invólucro de celulose

Macerar esse botão com um estilete histológico de ponta fina e com Carmin, pouco, o suficiente para preencher uma lamínula de 20 x 20 mm (uma pequena gota).

Limpar os “debris”, que são constituídos de pétalas e restos do botão que se macerou. Colocar a lamínula sobre o líquido que se obteve e aquecer levemente (sentir na mão uma temperatura morna) sobre a chama de uma espiriteira, para que na visualização as tétrades fiquem com o citoplasma rosado e os núcleos avermelhados, apertar um lenço de papel sobre a lamínula, para retirar o excesso e para que as tétrades que são globosas fiquem todas no mesmo plano.

Fazer a leitura dos micronúcleos (pequenas porções de material genético que são expulsas para o citoplasma) em 300 tétrades e calcular para 100 (na literatura os dados são expressos em porcentagem).

#### ***IV – Formando um jardim***

Se você precisa de inflorescências o ano inteiro, para seus experimentos, a *Tradescantia pallida* é uma excelente opção, pois tirando os meses de inverno, quando existe uma dormência natural da planta devido aos dias frios, ela produz muitas inflorescências durante todo o ano, sendo possível retirá-las para estudo com bastante frequência ( toda semana). Os cuidados normais de uma planta, como água para manter a terra sempre úmida e nutrientes como o NPK( Nitrogênio, Fósforo e Potássio) aplicados a cada mês são bem vindos, mas não imprescindíveis para nossa robusta *Tradescantia pallida*, que aguenta extremos de ausencia de água inacreditáveis, ficando porém, estiolada e com folhas fechadas e finas e bem compridas, como às vezes acontece no nosso inverno, quando há estiagem por longos períodos de 3-4 semanas sem chuva.

Como se dá a propagação:

No clone a propagação se dá por separação (delicadamente) das raízes e replantio nos outros vasos que se queira fazer, devendo-se esperar que cresçam e produzam inflorescências ( cerca de 1-2 meses). Elas aparecem no ápice das hastes. Dessa maneira, obtém-se um pool de plantas geneticamente iguais onde a variabilidade devida à meiose não é um fator a mais de confusão na análise posterior dos dados. Com os clones pode-se optar por fazer a técnica do micronúcleo ou a técnica do pelo estaminal, mas para uma mesma inflorescência deve-se optar por uma ou outra, não sendo possível fazer as duas ao mesmo tempo. Uma vez que tenha nascido a primeira flor da inflorescência, não é mais possível encontrar micronúcleos naquela haste ( citando palavras do Prof.Dr.Te-Hsiu Ma). Na *T.pallida*, se durante a fase de recuperação da planta, nascer uma flor, ainda será possível encontrar tétrades e micronúcleos. Observação advinda da prática em fazer lâminas, mas é mais difícil.

Controles positivos, negativos e o branco, indispensáveis para experimentos. O branco é o veículo que se utilizou para as diluições, no caso de plantas, água destilada que se opõe à água de torneira que seria o controle negativo; e o formol (1:1000ml) seria o controle positivo (pois produz micronucleos nas tétrades em numero superior ao basal da planta). Pode-se utilizar outras substancias além do formol, que produzam quebras cromossomicas, geralmente essa substancia devem ser manuseadas com cuidado pelo fato de serem cancerigenas.

Na *Tradescantia pallida* a propagação se dá cortando-se uma haste com cerca de 2 nós e enterrando-a pela base, deve-se deixar uma ou duas folhas para que a planta possa respirar melhor e aguardar que enraize. Assim, um mesmo galho pode resultar em várias novas plantas; o tempo para produzir uma nova inflorescência é cerca de 2-3 meses.

#### ***V- Quantas inflorescências coletar***

Cerca de 15 a 20 para os clones ou até mais (dependendo da disponibilidade que se tenha de plantas) e o mesmo número para a *Tradescantia pallida*, uma pessoa treinada consegue cerca de 15 lâminas no mínimo com boas tétrades para leitura. O clone precisa produzir cerca de 10 flores em cada ponto por dia.

Foto mostrando uma planta de KU-20, crescida em vaso. Observe as inflorescências e a flor, com sua cor característica.



Deve-se esperar abrir a flor das KU-20, para fazer a leitura dos pelos estaminais

Micronúcleos são pequenas porções de material genético que sofreu uma agressão por agente mutagênico e não foi reparado durante a meiose ele é, então, expulso para o citoplasma na forma de uma “bolinha” de material genético que deve apresentar a mesma coloração do núcleo, mas para contagem deve estar nitidamente separado dos núcleos e estar no citoplasma da tétrade. Pode-se se visualizar um ou mais micronúcleos em uma mesma tétrade. Quando o micronúcleo estiver sobre um dos núcleos não deve ser contado, bem como quando não se visualizar separação nítida entre o micronúcleo e o núcleo da tétrade. Deve-se ter certeza de que existe separação entre os dois, para que a contagem seja válida.

A meiose é um sistema evoluído de mistura de material genético, o que possibilita a diversidade dos indivíduos. O fato de nossas plantas serem seres superiores e dotados do processo de meiose as coloca em um patamar considerado de similaridade com seres humanos. Considerando-se o homem também como ser evoluído, pode-se traçar um paralelo entre o que ocorre na planta e o que pode vir a ocorrer no ser humano, em termos de maior similaridade, teríamos pequenos mamíferos como o camundongo e o rato.

A célula vegetal difere da célula animal basicamente pela celulose e pela clorofila, que os vegetais apresentam, sendo em quase todo o restante, muito parecidas.

Durante um ciclo de meiose que acontece na célula vegetal, se ela for exposta a um agente tóxico, isso vai se refletir em aumento de quebras cromossômicas e conseqüente aumento de micronúcleos no citoplasma da célula. Esses micronúcleos quantificados em 300 tétrades, feita a porcentagem, dá idéia do dano causado à planta e conseqüentemente ao ser humano, em termos genéticos. Se algo provoca aumento de quebras na célula vegetal, deve ser ruim também para nós.

Foto abaixo mostrando micronúcleo, aumento de 100X, essa pequena porção arredondada no citoplasma *rosado*.

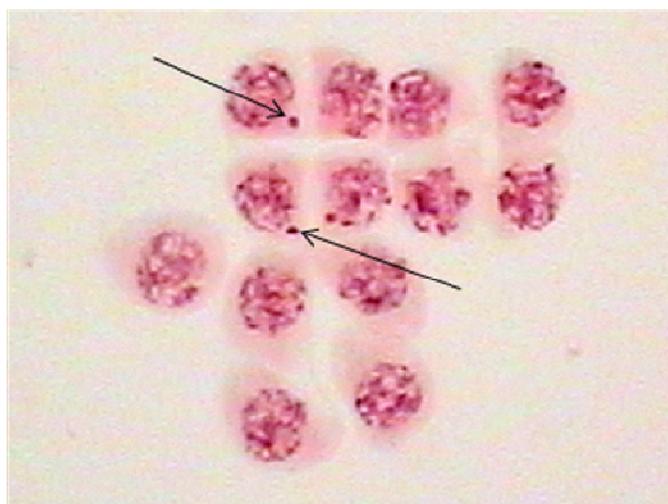


Foto acima mostrando dois micronúcleos bem separados dos núcleos (portanto contáveis) e um micronúcleo onde não há separação com o núcleo, mais à direita, na mesma tétrede (portanto descartável na contagem).

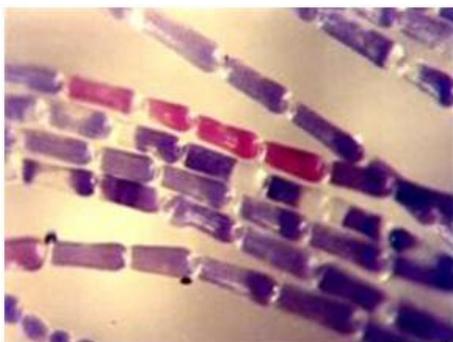


Foto Paulo Urbinatti

#### ***IV – Pelo estaminal***

Coletar flores do clone KU20 ou do clone 4430, pela manhã pois a partir do meio dia elas começam a se fechar e a leitura fica prejudicada pelo emaranhado de pelos estaminais. Se não for possível (a leitura na hora) colocar em geladeira, numa placa de petri com filtro no fundo, apenas umedecido, para formar uma câmara com vapor (saturada ) de água, assim dura cerca de 3 a 4 horas, às vezes um pouco mais.

A leitura se faz ordenando os pelos, para contagem dos mesmos e procurando pela mutação cor-de-rosa. Os pelos geralmente tem cor roxa, mas a presença de algum tóxico faz com que o recessivo rosa para cor do pelo apareça, e é uma cor realmente “Pink”.

Existem outros tipos de mutação que não são quantificadas como tal, pois apenas a mutação cor-de-rosa interessa, para que se possa comparar e repetir, se for o caso, trabalhos em Países diferentes. Mas poderiam ser bifurcações, ou ausência de cor.

### ***VII- Quantificação do número de mutações cor-de-rosa***

A observação do pelo estaminal deve ser feita em lupa, no aumento mais confortável para visualização das mutações, sendo que a lupa deve obrigatoriamente apresentar luz transmitida (de baixo para cima), sem a qual a visualização fica muito prejudicada.

Para facilitar faz-se uma média dos 2 primeiros estames ( número de pelos) das duas primeiras flores e extrapola-se para os 6 totais.

Didaticamente pode-se dizer que a partir do terceiro estame e da terceira flor só se conta as mutações.

O numero de mutações é expresso por 1000 pelos, regra de três para saber se em X pelos tem Y mutações, quantas mutações tem em 1000 pelos, para cada flor.

Um N de 10 flores por amostra diariamente é suficiente para apresentar resultado.

### **VIII-Preparando o corante C A R M I N**

Fazer uma solução saturada de ácido acético a 45%, para tanto, utilizar 2g de carmin em pó, para cada 300 ml da solução. Completar com água destilada.

Fazer dentro da capela.

Deixar agitando e fervendo por cerca de 1 hora.

Esperar esfriar, filtrar, após o processo de filtração, voltar a solução ao béquer e acrescentar alguns pregos de **ferro** para que ajam como “mordente” ( não aquecer novamente).

A solução estará boa para usar, se estiver vermelho-sangue, e escurecida.

Não esquecer de colocar papel alumínio sobre o béquer quando a solução estiver fervendo para não evaporar tanto.

Fazer em béquer com capacidade superior à que se deseja no final, pois com a agitação e a fervura a solução se eleva de até 150ml.

Obtém-se cerca de 200 ml de Carmin, ao final.

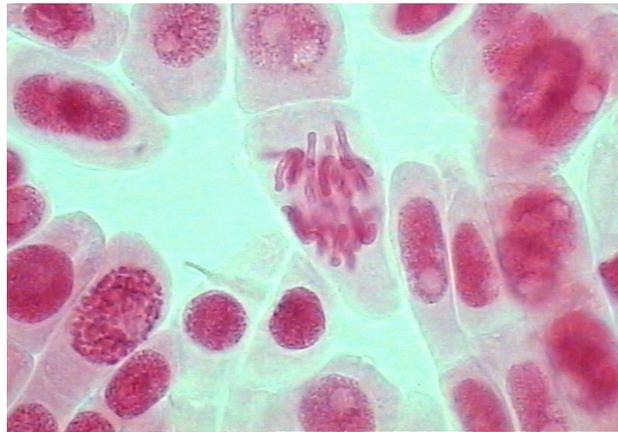
#### **Especificação do Carmim:**

Carmin (Alum Lake)	E380-03
“Baker”	
CI 75470	25g

***IX-Solução de Hoagland***

Solução 1	KNO <sub>3</sub>	(1M)	6,0 ml/
Solução 2	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	(1M)	4,0 ml/
Solução 3	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(1M)	2,0 ml/
Solução 4	MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	(1M)	1,0 ml/
Solução 5	KCl	(50mM)	1,0 ml/
Solução 6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	(25mM)	1,0 ml
Solução 7	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	(2mM)	1,0 ml/
Solução 8	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	(2mM)	1,0 ml/
Solução 9	CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	(0,5mM)	1,0 ml/
Solução 10	H <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> (85%MoO <sub>3</sub> )	(0,5mM)	1,0 ml/
Solução 11	Fe-EDTA	(20mM)	1,0 ml

Essas quantidades são para um litro de solução final da solução de Hoagland, aquela chamada de solução-mãe e que dará origem às (1:3) que se usa para as fases de adaptação e/ou recuperação quando necessário.



### ***X-Cebolas (Allium cepa L.)***

As cebolas, na impossibilidade de se possuir uma plantação, podem ser compradas no mercado e levadas para o laboratório. Conseguem-se excelente resultado se as cebolas forem orgânicas.

Cortar as raízes que por acaso tiverem, nem tanto que se tire o meristema que dá origem a novas raízes, nem tão pouco que não elimine as já secas e tratadas com produtos que evitam o brotamento. Não lavar as cebolas sob água pois por algum motivo elas parecem demorar mais a crescer. Posicionar as cebolas de modo que o meristema radicular fique em contato com água de torneira, apoiado nas bordas do recipiente (pequeno) do qual se vai fazer uso para que a cebola desenvolva novas raízes. Se os potes onde a cebola for colocada forem escuros, devido ao fototropismo negativo das raízes, elas crescem melhor.

Aguardar cerca de 3-4 dias para que as raízes cresçam, quando estiverem com cerca de 1 cm ou 1,5 cm, colocar as raízes em contato com a solução que se quer avaliar.

Deixar por 48 horas.

Cortar as raízes da cebola dentro do recipiente em que se vai guardá-las, cobrir com solução de Carnoy (ácido acético e álcool na proporção 1:3).

### ***Procedimentos para montar as lâminas..***

Lavar em água corrente por 5 minutos, a amostra de raízes que se deseja preparar, tendo o cuidado de cobrir com gaze e fixar a gaze com elástico. Escorrer a água ao final desse tempo.

Colocar uma solução de ac.clorídrico (1N) sobre as raízes, dentro dos potes e levar à estufa que deve estar de 60 a 80 graus celcius por 8 a 10 minutos. Retirar e deixar lavando por 10 minutitos em água corrente.

Para montar as lâminas: com um objeto bem afiado, cortar a coifa ( a coifa é uma membrana muito delicada que reveste a ponta das raízes, e serve, entre outras coisas, para evitar o choque mecânico durante o crescimento terra adentro), pegar 2 mm para cima do corte, numa região de cor branco-leitosa, cortar novamente e macerar esse pedacinho de raiz com carmin, colocar a lamínula e bater sobre ela com a borrachinha de um lápis ( que deve ter um corte reto para não quebrar a laminula) e deve estar sempre em posição vertical, para que saiam as bolhas de ar e as células se espalhem pela lâmina

Aquecer sobre a chama de uma pequena espiriteira, para que o carmin tinja melhor as células, a temperatura deve ser de morno-quente a quente para se fazer uma boa lâmina.

Deve-se fazer 10 lâminas para cada amostra que se deseja avaliar, controle positivo e controle negativo das soluções. Para o controle positivo pode-se usar formol na proporção de 1: 1000ml.

Fazer a leitura que pode ser da quantidade de mitoses (no nosso caso, decidimos contar a ultima fase da mitose que corresponde à anáfase, quando os cromossomos se separam , o que dá indicação do quanto a solução é favorável ao crescimento, ou seja, quanto mais anáfases forem encontradas, mais mitoses aconteceram e mais limpa é a solução),

ou de micronúcleos, em 1000 células. As células de cebolas são utilizadas para experimentos de citogenética desde 1920 e apresentam todas as fases da mitose, pelo que é sabidamente um excelente modo de se aprender genética e a mitose em si.

Comparar os números obtidos com seu controle negativo e com o positivo.  
Fazer a estatística dos dados.



### ***XI-Utilizando a Tradescantia como Bioacumulador***

A *Tradescantia pallida* serve bem ao propósito de análise do material acumulado em suas folhas, os quais entram pelos estômatos e podem ser medidos através do aparelho chamado Espectrofotômetro de fluorescência de raios X. Nessa máquina entra a folha seca em estufa, triturada e transformada em pastilhas, dando a composição de metais presentes no interior da folha. Para um teste ainda mais acurado, temos a voltametria extrativa anódica, mais qualitativa, que nos dá até a valência dos metais presentes.

Para expor à atmosfera, devem ser feitos vasos com a planta preferencialmente vindas de um local sabidamente limpo. Das plantas devem ser retiradas as folhas que se deseja analisar coletadas em sacos de papel (os de plástico interferem na análise), cortando as folhas junto ao caule com as mãos e nunca com uma tesoura de metal (o que também interferiria na análise final). Uma boa idéia é cortar o ápice na altura de um terceiro nó, abaixo de onde está a inflorescência e deixar que creçam de novo, agindo dessa forma pode-se estimar que as folhas novas cresceram na atmosfera contaminada. Dessa forma pode-se fazer tanto a análise das folhas quanto das inflorescências crescidas no período que se deseja. Para que a planta enraizada forme novas inflorescências leva cerca de 2 meses.

### ***XII Polen abortion***

O grão de polen encontrado nos estames de flores locais pode nos dar idéia de danos sofridos devido à poluição. Basta que se colete 10 flores (preferencialmente fechadas) de uma mesma espécie, em um mesmo local que se deseje analisar. O grão de polen sofre um processo em sua formação (meiose) apresentando-se vazio (abortion) ou muito inchado em comparação com os outros grãos de pólen normais, ou ainda de tamanho pequeno. Quantifica-se esses grãos de polen em 300 grãos e faz-se a porcentagem. A maneira de fazer a lamina é semelhante à feita para micronucleos, sendo que para o pólen, o melhor é não aquecer e evitar pressionar com força excessiva a lamínula contra a lamina com papel absorvente, portanto a quantidade de carmin deve ser também, a minima possível, o suficiente para a dispersão dos grãos de polen. A pressão de estilete sobre os grãos de pólen deve ser a menor possível, apenas o suficiente para que os mesmos saiam das anteras.

**BIBLIOGRAFIA**

Exploring the Clastogenic Effects of air Pollutants in São Paulo ( Brazil ) using the *Tradescantia* Micronuclei Assay. Batalha, J.R.F.; Guimarães, E.T.; Lobo, D.J.A.; Lichtenfels, A. J.F.C.; Deur, T.; Carvalho, H.A.; Alves, E.S.; Domingos, M.; Rodrigues, G.S.; Saldiva, P.H.N.

Mutation Research, vol. 426: pp.229 – 232, 1999.

In Situ Monitoring of the Mutagenic Effects of the Gaseous Emissions of a Solid Waste Incinerator in Metropolitan São Paulo, Brazil, Using the *Tradescantia* Stamen Hair Assay. Ferreira, M.I.; Petrenko, H.; Lobo, D.J.A.; Rodrigues, G.S.; Moreira, A.; Saldiva, P.H.N.

Journal of the Air & Waste Management Association, vol. 50: pp. 1852 – 1856, 2000.

Detection of the Genotoxicity of Air Pollutants in and Around the City of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. Guimarães, E.T.; Domingos, M.; Alves, E.S.; Caldini Jr., N.; Lobo, D.J.A.; Lichtenfels, A.J.F.C.; Saldiva, P.H.N. Environmental and Experimental Botany, 44: pp. 1 – 8, 2000.

Estudo Anatômico Foliar do Clone Híbrido 4430 de *Tradescantia*: Alterações Decorrentes da Poluição Aérea Urbana. Alves, E.S.; Giusti, P.M.; Domingos, M.; Saldiva, P.H.N.; Domingos, M.; Guimarães, E.T.; Lobo, D.J.A.

Revista Brasileira Botânica de São Paulo, vol. 24(4): pp. 567 – 576, 2001.

Pollen Mother Cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are Equally Sensitive to the Clastogenic Effects of X-Rays. Suyama, Guimarães, E.T.; Lobo, D.J.A.; Rodrigues, G.S.; Domingos, M.; Alves, E.S.; Carvalho, H.A.; Saldiva, P.H.N. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 35: pp. 127 -129, 2002.

Análise por Ativação com Neutrons da Planta *Tradescantia pallida* para uso na Monitoração de Poluentes Atmosféricos. Tavaraya, A.K.; Saiki, M.; Sumita, N.M.; Saldiva, P.H.N.

7th International Conference on Nuclear Analytical in the Life Sciences – NAMLS – 7, Antalya, Turkey , pp. 16 – 21, 2002.

INAA Applied to *Tradescantia pallida* Plant Study for Environmental Pollution Monitoring. Saiki, M.; Alves, E.R.; Sumita, N.M.; Saldiva, P.H.N.

*Czechoslovak Journal of Physics*, vol. 52(A): pp. 53 – 58; 2002

*Tradescantia pallida* cv. *Purpurea* Boom in the Characterization of Air Pollution by Accumulation of the Trace Elements. Sumita, N.M.; Mendes, M.E.; Macchione, M.; Guimarães, E.T.; Lichtenfels, A.J.F.C.; Lobo, D.J.A. Saldiva, P.H.N.; Saiki, M.

*Journal of the Air & Waste Management Association*, vol. 53: pp. 574 – 579, 2003.

In Situ Monitoring of Mutagenicity of Air Pollutants in São Paulo City Using *Tradescantia*-SHM Bioassay. Ferreira, M.I.; Rodrigues, G.S.; Domingos, M.; Saldiva, P.H.N. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 46(2): pp 253 – 258, 2003.

Evaluation of the Mutagenic Potential of Urban Air Pollution in São Paulo, Southeastern Brazil, using the *Tradescantia* Stamen-Hair Assay. Guimarães, E.T., Macchione, M.; D.J.A. Lobo; Domingos, M; PHN Saldiva.

*Environ Toxicol* 19:578-584, 2004.

Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo-SP, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. Maria Izildinha Ferreira, Marisa Domingos, Heliana de A. Gomes, Paulo H.N. Saldiva, João V. De Assunção. Environ Pollution xx(2006) 1-6.

Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. Ana C. Mielli, Marcus E.M. Matta, Armen Nersesyan, Paulo H.N.Saldiva, Gisela A. Umbuzeiro. Mutation Research 672(2009) 51-54.

Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André , SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. Eriane Justo Luiz Savóia, Marisa Domingos, Eliane Tigre Guimarães, Fabiano Brumati, Paulo Hilário Nascimento Saldiva. Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (2009) 255-260.

#### Agradecimentos finais:

Gostaria de agradecer a Ana Luiza Barreiros Silveira pela excelente qualidade das fotos deste manual e ao Sr. Paulo Urbinatti pela foto que mostra a mutação Pink, sem esquecer do Sr. Fernando Annes, responsável pela primeira de todas elas, uma foto muito apropriada, que une beleza, poesia e naturalidade da abelha sobre a flor de *Tradescantia* clone KU20.

Finalmente a *Ana Lucia Lorente* pelo entusiasmo no início deste manual, apoio sem o qual ele talvez não vingasse.