

Bioensaios de Toxicidade Genética com Plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), Milho e Soja



Geraldo Stachetti Rodrigues

Embrapa

Meio Ambiente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Marcus Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

Embrapa Meio Ambiente

Chefe Geral: Bernardo van Raij

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise M. Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto

ISSN 1516-4683

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Meio Ambiente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

**Bioensaios de toxicidade genética
com plantas superiores *Tradescantia*
(MCN e SHM), milho e soja**

Geraldo Stachetti Rodrigues

Jaguariúna, SP
1999

EMBRAPA MEIO AMBIENTE – Circular Técnica, 02.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP-340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69 13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (19) 867-8700 Fax: (19) 867-8740

e-mail:sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações: Aldemir Chaim, Célia M. M. de S. Silva, Franco Lucchini, Julio F. de Queiroz, Magda A. de Lima e Maria Cristina Tordin

Revisão: Denise Moraes de Oliveira.

Normalização: Maria Amélia de Toledo Leme

Produção Gráfica: Regina L. Siewert Rodrigues e Franco Ferreira de Moraes.

Tiragem: 500 exemplares

RODRIGUES, G.S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 30p. (Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica, 02).

CDD 581.15

©EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 1999

SUMÁRIO

Resumo.....	05
1. Introdução.....	07
2. <i>Tradescantia</i> e o bioensaio do micronúcleo na célula mãe do pólen.....	08
2.1. Linhagem de <i>Tradescantia</i> : manutenção e condições gerais de experimentação para o ensaio Trad-MCN.....	09
3. <i>Tradescantia</i> e o bioensaio do pêlo estaminal	13
3.1. Trad-SHM: Fundamentos e desenvolvimento do bioensaio.....	13
3.2. Condições gerais de experimentação para o ensaio Trad-SHM.....	13
4. Bioensaio do mosaico em folhas de soja (<i>Glycine max</i> {L.} <i>Merr.</i>)	16
5. Bioensaio do pólen ceroso em milho	17
5.1. Linhagens vegetais, multiplicação e manutenção.....	19
5.1.1. Soja	19
5.1.2. Milho	20
5.2. Exposição, amostragem e avaliação	20
5.2.1. Ensaio do mosaicismo em folhas de soja.....	20
5.2.2. Ensaio da mutação direta para pólen ceroso em milho.....	22
6. Conclusão	25
Referências Bibliográficas	27

Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja¹

Geraldo Stachetti Rodrigues²

Resumo

A avaliação da toxicidade genética presente em certas situações ambientais e de compostos selecionados é uma área de crescente interesse em ecotoxicologia. Bioindicadores vegetais vêm sendo apontados como especialmente adequados para essas avaliações. Nesse trabalho, são descritos quatro bioensaios vegetais de interesse para a avaliação de genotoxicidade *in situ* em ambientes agrícolas. O ensaio do micronúcleo em célula mãe do pólen de *Tradescantia* (Trad-MCN) é um teste de clastogênese extremamente sensível, de exposição curta (desde apenas 6 horas) e avaliação simples. O ensaio do pêlo estaminal (Trad-SHM) é um teste de mutação pontual, no qual se observa alteração de cor nas células do estame. A avaliação é simples, mas laboriosa. O bioensaio do pólen ceroso em milho tem como principal vantagem a sua potência estatística, já que, literalmente, centenas de milhares de grãos de pólen são avaliados em cada tratamento experimental. Há linhagens precoces propícias para experimentação, permitindo que se obtenham resultados de exposições *in situ*, em períodos inferiores a quarenta dias. O bioensaio é

¹ Apoio CNPq. Processo número 520693-98-1

² Ecólogo, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente, caixa postal 69 - cep 13820-000 Jaguariúna, SP.

de realização simples, pouco exigente em materiais de laboratório e apresenta baixo custo, mas é consideravelmente laborioso. Plantas de soja geneticamente clorofila-deficientes permitem a avaliação de eventos mutagênicos por simples observação de padrões de coloração foliar, denominados mosaicismo. Plantas heterozigotas apresentam coloração verde-clara intermediária ao amarelo letal aclorofilado e ao verde-escuro não deficiente. Mutações que alterem a expressão dos genes no embrião em crescimento serão manifestadas como manchas de coloração alterada nas folhas primordiais, permitindo a avaliação de mutagênese por simples observação de padrões de coloração nessas folhas. O bioensaio não exige qualquer instrumentação sofisticada e é adequado para experimentação *in situ*. Esses bioensaios vêm sendo empregados com sucesso nas mais diversas situações de contaminação ambiental e para estudo de compostos selecionados, e os resultados indicam que esses testes são adequados para o monitoramento extensivo de mutagênese ambiental.

1. Introdução

Para avaliar e prevenir a presença de agentes mutagênicos no ambiente são necessários indicadores sensíveis que permitam detectar todo o espectro de ação desses compostos. Tais sistemas indicadores têm sido definidos como testes de mutagênese de tipo II (Ennever et al., 1988), ou seja, aqueles que apresentam alta sensibilidade e baixa especificidade. Evidentemente, esses testes tendem a permitir a detecção de quaisquer compostos potencialmente mutagênicos, dada sua alta sensibilidade. Contudo, compostos não mutagênicos podem também produzir resultados positivos, dada a relativa baixa especificidade dos testes. Conseqüentemente, muito embora tais sistemas possam produzir resultados falso-positivos, indicando como mutagênico um agente não mutagênico, esses seriam os testes mais apropriados para programas de avaliação que sejam avessos a risco, já que resultados falso-negativos seriam mormente evitados. A maioria dos bioensaios vegetais é considerada como testes do tipo II, com especial referência para os ensaios do micronúcleo e do pêlo estaminal em *Tradescantia* (comelinacea) e o ensaio do grão de pólen ceroso em milho (Ennever et al., 1988). Outro bioensaio de interesse para o monitoramento de agentes mutagênicos ambientais é o teste do mosaicismo em soja, que permite especulação sobre o mecanismo genético envolvido. Este texto apresenta uma breve introdução a esses testes e uma avaliação de sua aplicabilidade no monitoramento ambiental.

2. *Tradescantia* e o bioensaio do micronúcleo na célula mãe do pólen.

Desde os primórdios dos estudos da atividade genética de compostos químicos e agentes físicos, várias espécies e clones do gênero *Tradescantia* têm sido utilizados como organismos experimentais, em virtude de uma série de características genéticas favoráveis. Apresentando apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis, células de quase todas as partes da planta, da ponta da raiz ao tubo polínico em desenvolvimento, fornecem material excelente para estudos citogenéticos (Ma & Grant, 1982).

Como consequência do uso intenso de *Tradescantia* em estudos genéticos, encontrou-se uma série de características que permitem a detecção de agentes que afetam a estabilidade do genoma. Pelo menos quatro dessas características foram selecionadas como indicadores em bioensaios de avaliação de toxicidade genética. Dois desses, o da mitose em ponta de raiz e o do tubo polínico, são ensaios de aberração cromossômica, nos quais se observam deformações morfológicas visíveis nos cromossomos (Ma, 1982). Um terceiro, o ensaio da mutação para célula cor-de-rosa em pêlo estaminal (Trad-SHM) (Underbrink et al., 1973), é um teste de mutação mitótica pontual que se baseia na expressão de um gene recessivo para cor da flor em plantas heterozigotas. O quarto ensaio é um teste citogenético que se baseia na formação de micronúcleos (Trad-MCN) que resultam da quebra cromossômica nas células meióticas geradoras do pólen (Ma, 1979). Esses dois últimos bioensaios encontram-se bem desenvolvidos e padronizados para a realização de ensaios *in situ* (Rodrigues et al., 1997).

2.1. Linhagem de *Tradescantia*: manutenção e condições gerais de experimentação para o ensaio Trad-MCN

O clone 4430 de *Tradescantia*, disponível na Embrapa – CNPMA, foi obtido da cultura do Dr. Shahbeb S. Sandhu, da Genetic Toxicology Division, Health Effects Research Laboratory, da US EPA em Research Triangle Park. O clone 4430 é um híbrido diplóide entre *T. hirsutiflora* Bush (2461C) de flor azul e *T. subacaulis* Bush (2441) de flor cor de rosa (Schairer & Sautkulis, 1982). Este clone é especialmente adequado para experimentação em laboratório e foi descrito em detalhe por Emmerling-Thompson & Nawrocky (1980). Devido ao fato de ser estéril, não há risco de se perder a identidade e pureza genética do clone 4430 por recombinação e sua heterozigose para cor da flor permite seu emprego para ambos os testes, Trad-MCN e Trad-SHM (Ichikawa, 1992; Ma, 1988).

Uma população de aproximadamente 250 plantas maduras, contendo uma média de 6 a 8 ramos em diferentes estágios de desenvolvimento, é geralmente suficiente para produzir ao menos 200 inflorescências em excelentes condições para exposição uma vez a cada duas semanas, permitindo a realização de experimentos envolvendo cerca de cinco tratamentos com duas repetições (20 inflorescências/tratamento), com avaliações bissemanais. As plantas idealmente devem ser mantidas em casas de vegetação ventiladas, de preferência com ar filtrado, com temperatura entre 21 e 28°C. Nos casos em que essas condições não sejam atendidas, há possibilidade de se obterem altas frequências espontâneas de micronúcleos, dificultando a detecção de efeitos causados por agentes ou ambientes com níveis muito baixos de atividade mutagênica. Iluminação suplementar deve ser fornecida por lâmpadas

fluorescentes e incandescentes, a fim de garantir um ciclo de 17h de iluminação diária ao longo do ano. O substrato deve conter solo fértil com boa drenagem, que pode ser aumentada com uma parte de areia grossa e matéria orgânica fornecida, preferencialmente, por material bem padronizado. Esterco de curral pode ser utilizado, desde que não apresente resíduos provenientes do tratamento sanitário dos animais. Um substrato ideal, exemplificado com o fim de fornecer uma base de comparação para a formulação de substrato alternativo é o solo-turfa de musgo-vermiculita (Cornell Mix, (Boodley & Sheldrake, 1982)). Em geral, as plantas devem ser regadas dia sim dia não, recebendo uma solução diluída de nutrientes mensalmente. Em cada colheita de inflorescências para experimentação (a cada duas semanas), todos os vasos devem ser cuidadosamente inspecionados e as plantas podadas, retirando-se todas as folhas em senescência, a fim de mantê-las limpas e livres de pragas. Nenhum pesticida deve ser aplicado sobre ou próximo às plantas durante o período experimental, sendo que a manutenção preventiva acima indicada é normalmente suficiente.

Em cada experimento, 20 inflorescências jovens (por tratamento por réplica) de *Tradescantia* são coletadas 24h antes do início dos tratamentos e transferidas para câmaras de ambiente controlado. Estas devem idealmente ser ventiladas com ar filtrado e equipadas com lâmpadas incandescentes e fluorescentes. As condições ideais para essas câmaras de cultivo são: temperaturas de $21/19 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ dia/noite, 65/70% de umidade relativa para dia/noite e um ciclo diário de iluminação de 17h.

Previamente às exposições, as inflorescências devem ser mantidas em frascos tipo beaker contendo água deionizada sob constante aeração, com ar filtrado, por um período de adaptação de 24h. Toda planta murchando deve ser eliminada nesse momento, sendo que somente

inflorescências túrgidas em expansão são tratadas. As exposições podem ser realizadas diluindo-se os agentes a serem testados em solução nutriente de Hoagland (Downs & Hellmers, 1975) triplamente diluída, a qual também corresponde ao controle negativo dos experimentos. O controle positivo pode ser representado por um tratamento de 30h (sem período de recuperação), com uma solução contendo 100ppm de metanosulfonato de etila (EMS). Exposições de 30h, seguidas imediatamente por fixação das amostras (sem período de recuperação), são apropriadas quando baixas concentrações de ingredientes ativos ou ambientes com atividade clastogênica supostamente muito baixa são testados (Ma, 1988). Para ambientes altamente contaminados ou agentes em altas concentrações pode-se expor as plantas por 6 horas seguidas, por um período de recuperação de 24 horas, em solução de Hoagland triplamente diluída em câmara de cultivo.

Após o tratamento, as inflorescências são removidas dos ramos florais e fixadas em solução 1:3 (v/v) de ácido acético:etanol por 24h e então preservadas em etanol 70% (v). Para contagem de micronúcleos, os botões jovens são dissecados e as anteras são maceradas sobre uma lâmina de microscópio em solução de corante aceto-carmim (preparado por fervura de 0,5g de carmim em 100ml de ácido acético 45% v). Após posicionar a lamínula, a lâmina é aquecida repetidamente a aproximadamente 80°C e gentilmente pressionada entre folhas de papel absorvente para remover o excesso de corante (Ma, 1988). Somente lâminas contendo tétrades intactas, com um máximo de cerca de 20% de células rompidas, devem ser avaliadas, já que estágios que não aqueles das tétrades jovens apropriadas são inadequados para correta visualização de micronúcleos. A contagem é realizada sob magnificação de 400x, anotando-se o número de micronúcleos presentes num grupo aleatório

de 300 tétrades (Figura 1), em 5 lâminas (Ma, 1979; Ma, 1981), obtendo-se uma população estatística de 1.500 tétrades por tratamento. As lâminas são sempre codificadas e analisadas pelo mesmo observador, com o código sendo revelado somente após todos os tratamentos serem contados.

Neste método, cada botão contendo as tétrades jovens apropriadas para contagem (uma lâmina válida) é considerado uma população amostral, com botões das outras inflorescências representando as réplicas de um grupo experimental ou tratamento. A comparação dos tratamentos pode ser realizada por análise de variância (ANOVA) do número de micronúcleos/100 tétrades e as médias de tratamentos específicos são comparadas pelo teste t de Student, assumindo distribuição bicaudal (nenhuma tendência assumida *a priori* nos dados) e $\alpha = 0,01$.

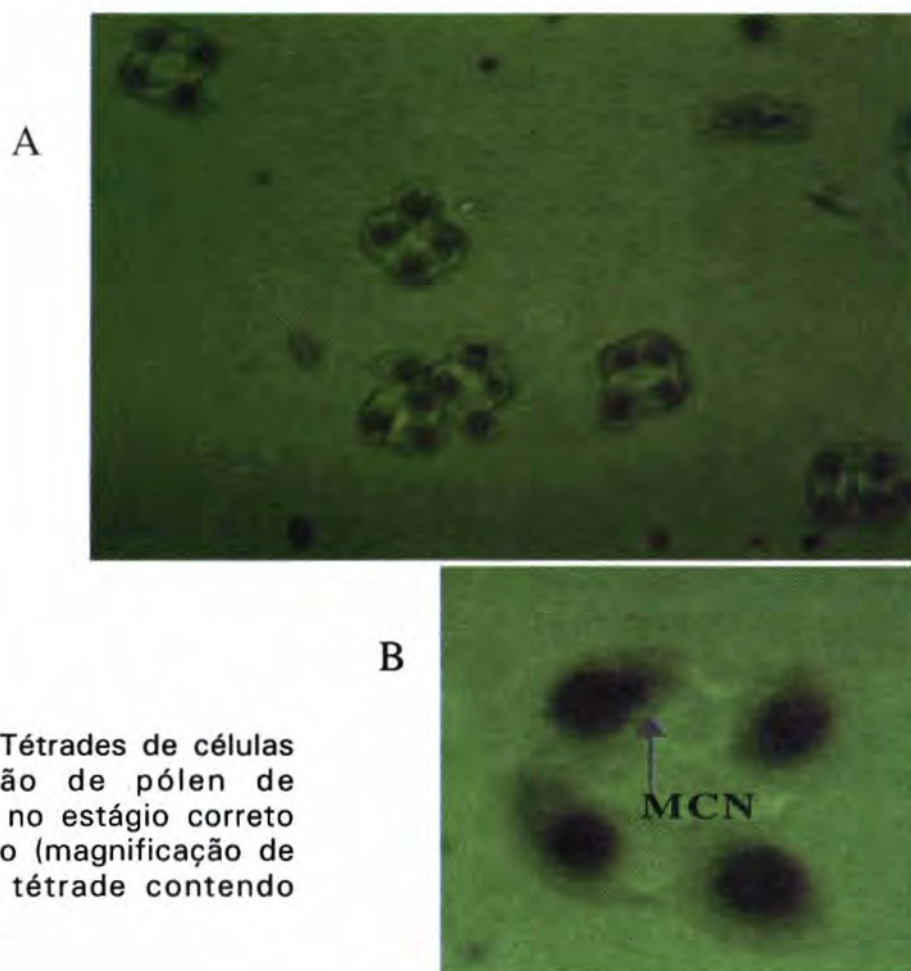


Figura 1. A) Tétrades de células mãe do grão de pólen de *Tradescantia* no estágio correto para avaliação (magnificação de 100x); e B) tétrade contendo micronúcleo.

3. *Tradescantia* e o bioensaio do pêlo estaminal.

3.1. Trad-SHM: Fundamentos e desenvolvimento do bioensaio

O ensaio da mutação em pêlo estaminal (Trad-SHM) baseia-se em mutação pontual (mitótica), na qual é suprimida a expressão do caráter azul dominante em flores de plantas heterozigotas, resultando no aparecimento da cor rosa recessiva (Emmerling-Thompson & Nawrocky, 1982; Mericle & Mericle, 1967; Mericle & Mericle, 1971; Nayar & Sparrow, 1967).

A base genética para expressão de células cor-de-rosa nos pêlos estaminais do clone 4430 de *Tradescantia* foi estabelecida por meio de cruzamentos recíprocos com a linhagem parental rosa e branca *T. subacaulis* Bush (Emmerling-Thompson & Nawrocky, 1980). Determinou-se que a pigmentação rosa era dependente de um par de alelos em um único locus, sendo azul (B) dominante sobre rosa (b), e demonstrou-se que o clone 4430 é homozigoto dominante para o locus branco. A identidade espectrofotométrica de ambos pigmentos, rosa e azul, de quatro clones diferentes de *Tradescantia* está determinada (Sanda-Kamigawara & Ichikawa, 1993). Uma revisão sobre o ensaio Trad-SHM foi recentemente publicada (Rodrigues et al., 1997).

3.2. Condições gerais de experimentação para o ensaio Trad-SHM

Para cada experimento, 25 a 30 ramos florais (por tratamento) contendo inflorescências jovens são colhidos 24h antes do início da exposição e transferidos para uma câmara de ambiente controlado (para detalhes, veja seção 2.1). Os ramos florais são mantidos em água deionizada e aerados por 24h para adaptação. Os ramos são então transferidos para vasos tipo beaker embrulhados em papel alumínio, contendo

solução de Hoagland (diluição 1/3) e expostos aos agentes ou ambientes em estudo por um período de 24 horas. Após exposição, as soluções nutrientes são substituídas por outras frescas e os ramos florais conservados sob aeração durante o período de recuperação.

O ensaio Trad-SHM requer um período de recuperação de aproximadamente 14 dias, o tempo necessário para que os botões florais contendo pêlos estaminais primordiais ao tempo de exposição floresçam, expondo os pêlos desenvolvidos para avaliação. Durante o período de recuperação, os ramos florais devem ser continuamente aerados; as soluções nutrientes, trocadas diariamente e as folhas murchas, removidas. A partir do oitavo dia, as flores recentemente abertas são coletadas, os estames removidos são colocados em lâminas de microscopia, contendo uma gota de solução etanol: glicerina (1:1 v/v), as quais são avaliadas quanto à proporção de células rosa sob magnificação de 40x em estereomicroscópio. As flores devem ser coletadas pela manhã, já que se fecham e murcham no decorrer do dia. Para melhorar a conservação e permitir um maior tempo para as avaliações, as flores podem ser mantidas em placas de petri contendo papel de filtro umedecido, sob refrigeração a 4°C. Dessa forma, elas podem ser analisadas até 24 horas após a colheita.

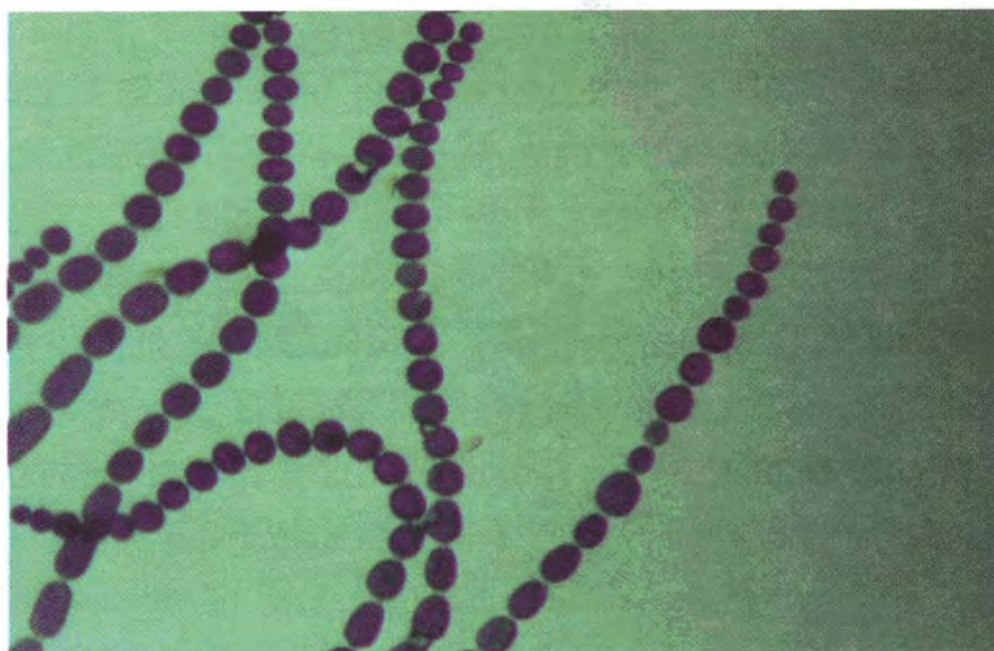
O número de pêlos por estame para cada dia de avaliação é estimado contando-se os pêlos em dois estames anti-sépala e dois anti-pétala de duas flores obtidas ao acaso (Ichikawa & Ishii, 1991). Um evento mutagênico consiste em uma ou uma seqüência de células rosas adjacentes (Figura 2), entre as células dominantes azuis, em qualquer posição no pêlo estaminal (Underbrink et al., 1973). Idealmente 10 flores são avaliadas por tratamento por dia, totalizando aproximadamente 3.000 pêlos/tratamento/dia (ou seja, cerca de 50 pêlos/estame e 6 estames por flor).

Figura 2. A) Estame de *Tradescantia* disposto de forma a permitir avaliação de mutações em pêlos estaminais (magnificação 40x); e B) detalhe de pêlo estaminal apresentando evento mutagênico, representado pela seqüência de células rosadas.

A



B



O número de eventos mutagênicos por flor é então transformado em eventos/1000 pêlos. A frequência média de mutação de cada tratamento é comparada para todos os dias em conjunto e para o dia que apresenta maior frequência total de eventos mutagênicos. Análise de variância (ANOVA) pode ser utilizada para a comparação das médias dos tratamentos; e teste t de Student assumindo variâncias equivalentes (nenhuma tendência assumida *a priori* nos dados) e $\alpha = 0,05$ empregado para a comparação entre o controle e os tratamentos.

4. Bioensaio do mosaico em folhas de soja (*Glycine max* {L.} Merr.)

Pelo menos onze loci afetam o desenvolvimento da clorofila em plantas de soja. Um desses loci, designado Y_{11} , expressa dominância incompleta e é adequado para a avaliação de eventos genotóxicos. Plantas heterozigotas ($Y_{11}y_{11}$) apresentam uma cor verde clara distinguível das apresentadas pelos homozigotos verde-escuros ($Y_{11}Y_{11}$) e amarelo esverdeado ($y_{11}y_{11}$) (Vig & Paddock, 1968). Mecanismos cromossômicos como deleção, duplicação, translocação e não disjunção podem alterar o genótipo das células primordiais das folhas no embrião ainda na semente, resultando no aparecimento de manchas verde-escuras, amarelas ou duplas sobre o fundo verde claro das folhas de plantas heterozigotas. Sementes de soja (clone T219H) tratadas com agentes genotóxicos podem apresentar aumentos na frequência de manchas (mosaicismo), especialmente nas duas folhas simples e na primeira folha composta, permitindo a avaliação de danos aos cromossomos. O tamanho dessas manchas sobre as folhas depende de quão cedo no desenvolvimento da folha o evento cromossômico causativo ocorrer, refletindo o número de

divisões celulares desde o momento da ocorrência do dano cromossômico até a compleição da expansão foliar.

Outro mecanismo importante para o desenvolvimento de mosaicismo é crossing-over somático, no qual as células sofrem homozigose complementar, resultando em imagens gêmeas verde-escuras/amarelas chamadas manchas duplas. Nem todos os eventos de crossing-over acabam como manchas duplas, devido à possível falha no desenvolvimento da atividade mitótica em uma das células filhas. Em geral, contudo, é possível especular sobre os principais mecanismos genéticos induzidos por um dado agente, com base nos tipos e proporções das manchas presentes nas folhas (Vig, 1982).

5. Bioensaio do pólen ceroso em milho

Devido ao seu uso clássico em estudos de genética, sabe-se mais sobre a composição genética do milho (*Zea mays* L., $2n = 20$) que de qualquer outra espécie vegetal (McClintock, 1984). Com base nesse conhecimento, ao menos 13 loci específicos têm sido usados freqüentemente na avaliação de mutações em milho, envolvendo alterações na cor ou na morfologia das folhas, do endosperma e dos grãos de pólen (Plewa, 1982). Dentre essa variedade de indicadores, alterações nos grãos de pólen aparecem como o caráter mais vantajoso para estudo. Primeiramente, a natureza haplóide do pólen facilita grandemente a expressão e a detecção de mutações e outros eventos genéticos que ocorram no esporófito parental diplóide e sejam transmitidos para o microgametófito (Nilan et al., 1981). Em segundo lugar, mas não menos importante, como o dano genético é analisado diretamente nos grãos de pólen, a resolução estatística é grandemente aumentada, pois,

literalmente, milhões de sujeitos individuais podem ser observados na população de grãos de pólen derivada de uma simples planta exposta (Nilan et al., 1981).

Presente em pelo menos 15 gêneros de angiospermas (Nilan & Rosichan, 1982), o caráter mais comum que se presta para a análise de mutagênese é o locus Ceroso (*wx*), localizado no milho na posição 59 do cromossomo 9 e que controla a produção da amilose componente do amido (Plewa, 1985a). O caráter ceroso do milho foi trazido ao Ocidente da China no início desse século e logo se reconheceram suas diferenças em relação às variedades então comuns. O milho ceroso (*wxwx*) é caracterizado por só apresentar amilopectina no amido, resultando em uma aparência de cera endurecida no endosperma. Em contraste, grãos amilosos (*Wx_x*) apresentam uma mistura de amilopectina e amilose. Devido à presença de amilose, o endosperma dos grãos contendo o alelo *Wx* cora-se de preto quando reagido com iodo, enquanto os grãos cerosos produzem uma cor avermelhada. Estudos genéticos demonstraram que o alelo ceroso é recessivo ao amiloso e segrega-se como um monohíbrido Mendeliano. Logo foi descoberto que o fenótipo ceroso poderia ser detectado nos grãos de pólen com o teste do iodo. Como haplóides funcionais cujo tipo de amido é determinado pela sua própria constituição genética e não aquela do esporófito parental, grãos de pólen oferecem uma oportunidade única para a detecção de mutações que alterem a composição do amido (Plewa, 1985a).

Duas mudanças direcionais podem ser avaliadas nos grãos de pólen de milho. Uma mutação reversa de *wx* para *Wx* pode ser detectada através da visualização de grãos de pólen corados de preto por iodo, a partir de plantas homozigotas que produzam pólen avermelhado (*wxwx*). Inversamente, uma mutação direta de *Wx* para *wx* pode ser detectada

pela visualização de grãos de pólen avermelhados dentre a população de grãos de pólen corados de preto, a partir de plantas amilosas homozigotas ($WxWx$). O ensaio da mutação direta ($Wx \rightarrow wx$) é menos específico que o teste de reversão, porque nem todas as alterações genéticas em wx resultam em reversão à capacidade de produzir amilose, enquanto qualquer mutação em Wx que cause perda na capacidade de produzir amilose será manifestada como cerosa (Plewa, 1985a).

A adaptabilidade de plantas de milho a condições de campo, juntamente com a disponibilidade de variedades precoces resultantes de cruzamentos, capazes de florescer em aproximadamente 40 dias (Plewa, 1985b) e a habilidade de ativar enzimaticamente agentes pró-mutagênicos em agentes que causam mutação direta (Plewa & Gentile, 1976) fazem do ensaio do grão de pólen ceroso em milho um sistema especialmente adequado para estudos de mutagênese de pesticidas *in situ*, sob condições agrícolas (Grant, 1982).

5.1. Linhagens vegetais, multiplicação e manutenção

5.1.1. Soja

A *Glycine max* (L.) Merr. da linhagem genética T219H foi obtida da USDA-ARS Field Crops Research Unit, Iowa State University, Ames, IA, EUA do estoque do Dr. Reid G. Palmer. A linhagem T219H foi fornecida como sementes colhidas de uma população de plantas heterozigotas ($Y_{11}y_{11}$), sofrendo polinização fechada. As sementes são propagadas em casa de vegetação por seleção e cultivo somente das plantas heterozigotas (verde-claras). Estas plantas segregam como 1 verde-escura: 2 verde-claras: 1 amarelo letal. Como somente as plantas verde-claras apresentam mosaicismo, o número de sementes a serem plantadas para

experimentação deve ser o dobro do número de plantas a serem expostas e avaliadas. As sementes colhidas foram secas ao ar e estocadas em sacos de papel, em uma área bem ventilada.

5.1.2. Milho

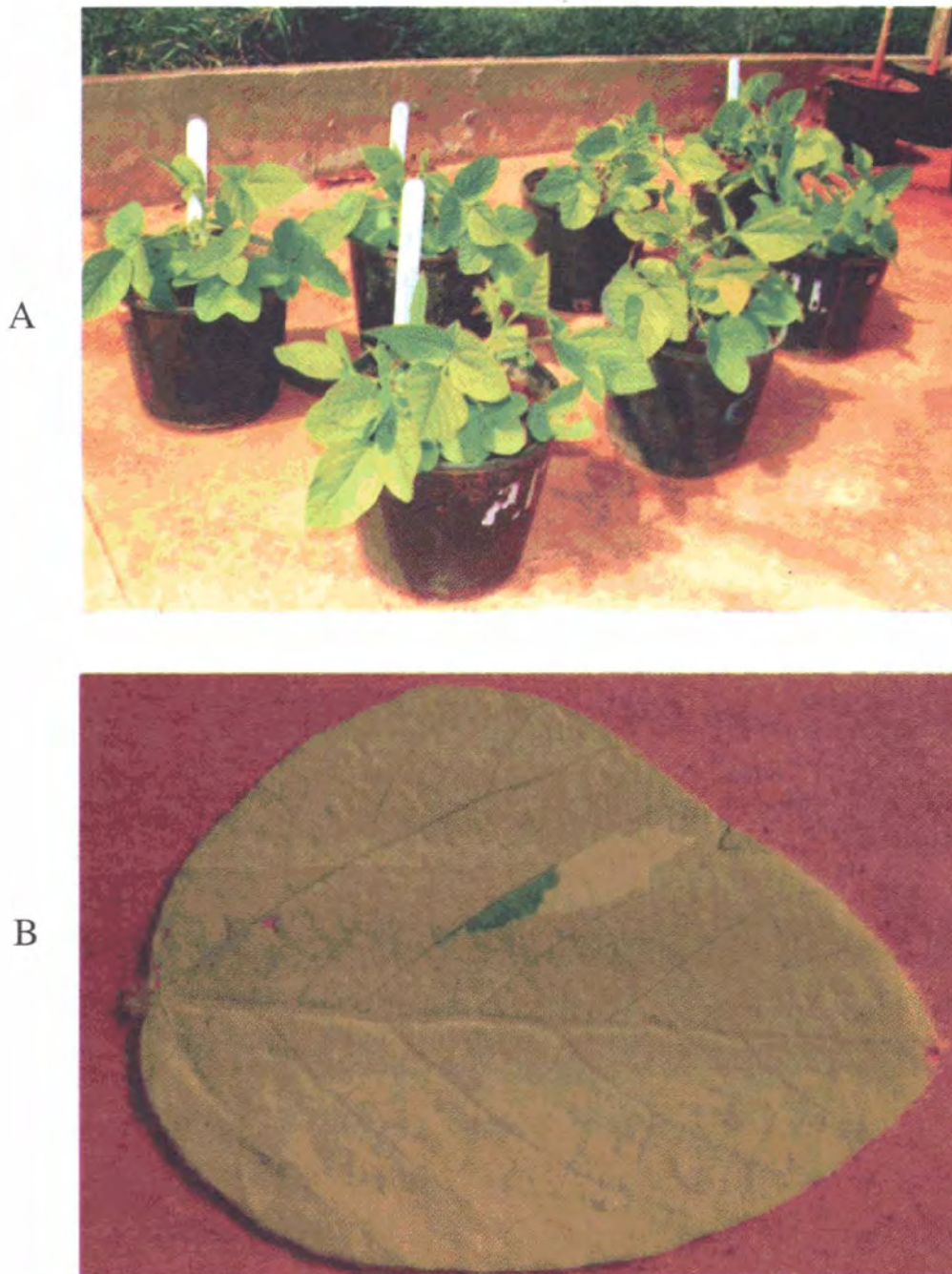
Sementes de milho (*Zea mays* L.) das variedades sintética precoce amilosa (*WxWx*) e cerosa (*wxwx*) foram obtidas do Maize Genetics Stock Center, University of Illinois at Urbana-Champaign, com o Sr. E. B. Patterson. As sementes foram propagadas em casa de vegetação, secas ao ar e mantidas em sacos de papel, em uma área bem ventilada.

5.2. Exposição, amostragem e avaliação

5.2.1. Ensaio do mosaicismo em folhas de soja

Sementes de soja são lavadas com água destilada e embebidas em água deionizada por 24h, para o controle negativo, em uma solução aquosa contendo 100ppm de EMS como controle positivo e semeadas em vasos contendo o agente a ser testado, ou semeadas diretamente nos campos a serem avaliados. Ao germinarem, as plântulas apresentando o fenótipo $Y_{11}y_{11}$ (verde-claras) são selecionadas e cultivadas, enquanto as homozigotas são descartadas. Estas plântulas são mantidas até a compleição da expansão da primeira folha composta trifoliada e avaliadas para mosaicismo com uma lente manual. A avaliação consiste em anotar, para cada planta e folha, o número e o tipo (verde-escuro, amarelo ou duplo) de todas as manchas maiores que um milímetro (Figura 3). Somente manchas evidentemente mostrando-se como um setor de células descoloradas devido a deficiência (manchas amarelas) ou excesso (verde-escuro) de clorofila são contadas, excluindo qualquer área aparentemente danificada da superfície das folhas.

Figura 3. A) Plantas de soja (linhagem T219H) heterozigotas para desenvolvimento de clorofila ($Y_{11}y_{11}$); e B) detalhe de folha contendo setor de coloração alterada, indicativo de translocação gênica ("crossing-over").



As plântulas devem ser averiguadas ao menos semanalmente, durante o desenvolvimento e dia sim - dia não, quando as folhas compostas iniciam sua expansão. Ao completar-se a expansão dessas folhas, as plântulas são avaliadas e eliminadas da população. Somente folhas com pelo menos 80% de sua superfície livre de danos devem ser consideradas na avaliação.

A análise dos dados pode ser realizada por análise de variância (ANOVA) do número total, bem como de cada tipo (verde-escuras, amarelas e duplas) de mancha. Adicionalmente, buscando-se excluir quaisquer tendências possivelmente introduzidas devido à presença de folhas com múltiplas manchas, a proporção de folhas apresentando ao menos uma mancha (resposta binomial, com ou sem evento mutagênico) e as médias dos tratamentos podem ser comparadas com o teste χ^2 .

5.2.2. Ensaio da mutação direta para pólen ceroso em milho

Sementes de milho da variedade homozigota *Wx* ou *wx* são embebidas em água deionizada (controle negativo) ou em uma solução aquosa de 100ppm de EMS (controle positivo), por 24h. Depois são lavadas em água destilada, e semeadas individualmente em vasos contendo as amostras a serem avaliadas ou diretamente no campo.

Ao tempo do florescimento, porções das inflorescências com botões fechados (pré-antese) são coletadas e fixadas em etanol 70% (v). A avaliação consiste em selecionar aleatoriamente cinco botões, lavá-los com etanol 70%, para remover qualquer grão de pólen estranho e dissecá-los para extração das anteras. Estas são então abertas em uma placa de petri contendo corante de iodo-gelatina (500mg iodeto de potássio + 95mg de iodo em 25ml de água e 1,5g de gelatina bacteriológica em

25ml de água, misturados imediatamente antes do uso) sob microscópio estereoscópico. Após remover todo fragmento das anteras, os grãos de pólen são montados em lâmina microscópica (Plewa, 1982).

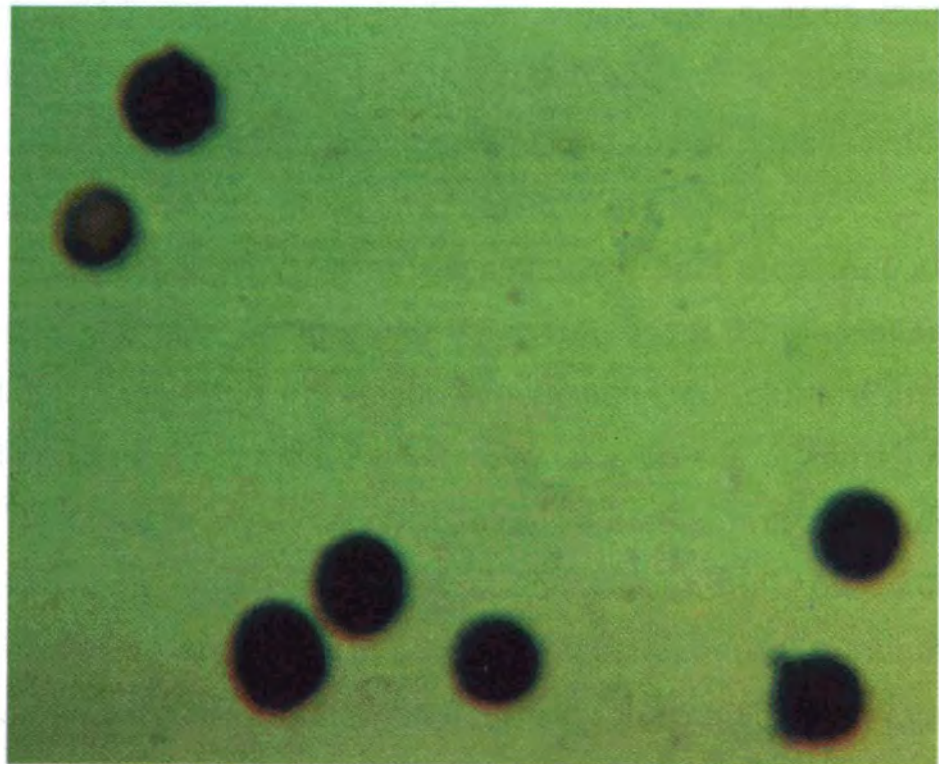
O número total de grãos de pólen por lâmina é estimado através da contagem (sob magnificação de 40x) de todos os grãos de pólen viáveis em 20 áreas de 1mm², selecionadas aleatoriamente na lâmina. Esta é então cuidadosamente observada na busca de grãos de pólen mutantes (grãos corados avermelhados entre a população de grãos não mutantes pretos para a linhagem *Wx* e o inverso para a linhagem *wx*) e abortados, que são facilmente reconhecidos por sua aparência murcha (Figura 4). Aproximadamente 20.000 grãos de pólen são examinados por inflorescência (por planta) e dez plantas por tratamento, totalizando uma média de 200.000 grãos de pólen por tratamento. A frequência de grãos mutantes é calculada por planta e a média de dez plantas comparada entre tratamentos.

Devido à presença de plantas apresentando nenhum pólen mutante (um zero ocasional entre os números normalmente grandes resultantes dos numerosos grãos de pólen em cada lâmina), uma transformação pode ser realizada nos dados antes das análises estatísticas, a fim de normalizar as variâncias. Uma transformação indicada para contagens de eventos raros (Snedecor & Cochran, 1967) é recomendada, como segue:

$$Y = \sqrt{X} + \sqrt{X + 1}$$

onde *X* é a frequência de mutações observada e *Y* é a transformada. As frequências de mutação transformadas e a taxa de abortão computadas por planta são analisadas através de ANOVA.

A



B

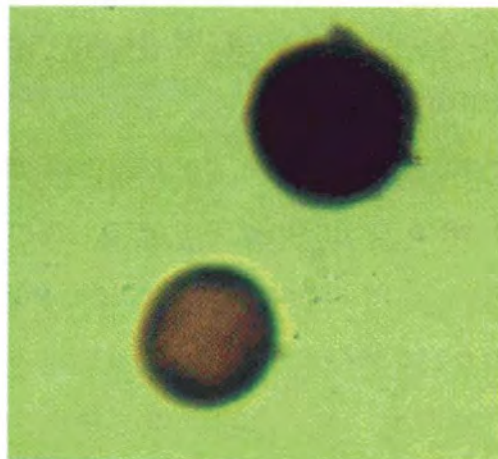


Figura 4. A) Grãos de pólen de milho da linhagem homozigota amilosa (WxWx) (magnificação 40x) ; e B) detalhe apresentando contraste entre grão de pólen amiloso (preto) e ceroso (tonalidade clara).

6. Conclusão

As abundantes informações básicas sobre a genética e o desenvolvimento de *Tradescantia* oferecem uma sólida estrutura de suporte para seu uso como um bioindicador para ensaios de toxicidade genética ambiental (Ma & Grant, 1982). Micronúcleos nas células-mães dos grãos de pólen são facilmente observáveis, permitindo um baixo grau de incerteza nas avaliações e diminuindo a subjetividade presente no reconhecimento de aberrações cromossômicas, enquanto a indução de mutações para rosa em células dos pêlos estaminais oferece um indicador somático sensível de mutagênese. Adicionalmente, os ensaios com *Tradescantia* têm se provado valiosos nos estudos de sinergismo entre agentes químicos e entre estes e outros agentes genotóxicos como radiações, uma propriedade valiosa para a avaliação de riscos genotóxicos em situações ambientais complexas (Shima & Ichikawa, 1995).

O ensaio do mosaicismo em folhas de soja tem sido esparsamente usado como indicador de mutagenicidade de pesticidas e não há dados disponíveis sobre a utilização desse sistema para a avaliação de pesticidas *in situ*. A principal restrição desse bioensaio é a dificuldade de se cultivarem plantas saudáveis no campo sem o emprego de produtos químicos para proteção contra pragas, que potencialmente interfeririam na detecção dos pesticidas em uso. Isto se deve à maior suscetibilidade das plantas heterozigotas (que apresentam menos clorofila e, conseqüentemente, crescimento reduzido) a insetos e outros organismos, quando comparadas com plantas homozigotas mais vigorosas.

As proporções dos diferentes tipos de manchas observados no ensaio do mosaicismo em folhas de soja são indicativas do mecanismo genético, mais provavelmente em efeito para a particular situação de

exposição e composto em estudo. Como regra geral, manchas simples (verde-escura ou amarela) são causadas por eventos mutacionais, como deleção, duplicação, translocação e não disjunção. Estas mutações interferem na expressão de um dos alelos do par $Y_{11}Y_{11}$, permitindo ao outro alelo predominar e determinar o conteúdo de clorofila da mancha produzida e, conseqüentemente, sua coloração. Manchas duplas, por outro lado, resultam de crossing-over, embora nem todo evento de crossing-over se manifeste como manchas duplas, devido à possibilidade de falha de umas das células primordiais que carregava o genótipo alterado em desenvolver-se.

Dessa forma, embora de difícil adaptação para condições de campo, o ensaio do mosaicismo em folhas de soja oferece a vantagem de permitir especulações sobre os mecanismos genéticos envolvidos nas alterações mutacionais observadas. Talvez o uso de barreiras físicas, como malhas de pano para proteção contra pragas, possa melhorar a aplicabilidade desse bioensaio para estudos *in situ*.

O ensaio da mutação para pólen ceroso em milho tem sido extensivamente usado para a avaliação *in situ* de mutagenicidade de pesticidas, seja sozinho ou em combinação com ensaios microbianos. O curto tempo para o desenvolvimento das plantas (40 dias da semente ao florescimento) da variedade precoce empregada permite avaliações relativamente expeditas e diferenciação entre os sujeitos experimentais e variedades comerciais, quando estas são misturadas num mesmo campo.

Os bioensaios aqui descritos são adequados para a avaliação da mutagenicidade causada por agentes químicos, incluídos os pesticidas, e ambientes potencialmente contaminados, sendo que, nesse caso, as avaliações podem ser realizadas *in situ*. Com o uso desses bioensaios é

possível, portanto, selecionar produtos que não apresentem influência sobre a taxa de mutações para uso na agricultura e monitorar ambientes quanto ao seu estado de contaminação por agentes genotóxicos.

Referências Bibliográficas

- BOODLEY, J. W.; SHELDRAKE Jr., R. **Cornell peat-lite mixes for commercial plant growing**. Ithaca: Cornell Cooperative Extension Service, 1982.
- DOWNS, R. J.; HELLMERS, H. **Environment and the experimental control of plant growth**. New York: Academic Press , 1975. 206 p. (Experimental Botany, 6).
- EMMERLING-THOMPSON, M.; NAWROCKY, M. M. Genetic basis for using *Tradescantia* clone 4430 as an environmental monitor of mutagens. **The Journal of Heredity**, v. 71, p. 261-265, 1980.
- EMMERLING-THOMPSON, M.; NAWROCKY, M. M. Evidence of gametic mutation for flower color in *Tradescantia*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 22, p. 403-408, 1982.
- ENNEVER, F. K.; ANDREANO, G.; ROSENKRANZ, H. S. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. **Mutation Research**, v. 205, p. 99-105, 1988.
- GRANT, W. F. Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. In: FLECK, R.A.; HOLLAENDER, A., ed. **Genetic toxicology: an agricultural perspective**. New York: Plenum Press, 1982. p. 353-378. (Basic Life Sciences, 21).
- ICHIKAWA, S. *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its response to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found. **Mutation Research**, v. 270, p. 3-22, 1992.
- ICHIKAWA, S.; ISHII, C. Validity of simplified scoring methods of somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. **Environmental and Experimental Botany**, v. 31, n. 2, p. 247-252, 1991.

- MA, T. H. *Tradescantia* micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens. In: KOLBER, A.R.; WONG, T.K.; GRANT, L.D.; DEWOSKIN, R.S.; HUGHES, T.J., ed. ***In vitro* toxicity testing of environmental agents. Current and possibilities. Part A: Survey of test systems.** New York: Plenum Press, 1979. p. 191-214.
- MA, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. **Environmental Health Perspectives**, v. 37, p. 85-90, 1981.
- MA, T. H. *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 293-302, 1982.
- MA, T. H. **Outline of the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay.** Course handout. International Program of Chemical Safety, World Health Organization, The United Nations. 1988. Comunicação pessoal.
- MA, T. H.; GRANT, W. F. The *Tradescantias* - adventurous plants. **The Herbarist**, v. 48, p. 36-44, 1982.
- McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, v. 226, p. 792-801, 1984.
- MERICLE, L. W.; MERICLE, R. P. Mechanism of somatic mutation for flowers of hybrid *Tradescantia* (clone 02). **Genetics**, v. 56, p. 576-577, 1967.
- MERICLE, L. W.; MERICLE, R. P. Somatic mutations in clone 02 *Tradescantia*: A search for genetic identity. **Journal of Heredity**, v. 62, p. 323-328, 1971.
- NAYAR, G. G.; SPARROW, A. H. Radiation-induced somatic mutations and the loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. **Radiation Botany**, v. 7, p. 257-267, 1967.
- NILAN, R. A.; ROSICHAN, J. L. Pollen mutants and mutagenesis. In: KLEKOWSKI Jr., E.J., ed. **Environmental mutagenesis, carcinogenesis, and plant biology.** New York: Praeger Scientific, 1982. p. 55-90.
- NILAN, R. A.; ROSICHAN, J. L.; ARENAZ, P.; HODGDON, A. L.; KLEINHOF, S.

- A. Pollen genetic markers for detection of mutagens in the environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 37, p. 19-25, 1981.
- PLEWA, M. J. Specific-locus mutation assays in *Zea mays*. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 317-337, 1982.
- PLEWA, M. J. Genetic assays of maize for environment pollution control. In: ZIMMERMANN, F.K.; TAYLOR-MAYER, R.E., ed. **Mutagenicity testing in environmental pollution control**. Chichester: Ellis Horwood, 1985a. p. 147-165. (Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry).
- PLEWA, M. J. Mutagen testing with maize. In: MUHAMMED, A.; von BORSTEL, R.C., ed. **Basic and applied mutagenesis - with special reference to agricultural chemicals in developing countries**. New York: Plenum Press, 1985b. p. 323-328.
- PLEWA, M. J.; GENTILE, J. M. Plant activation of herbicides into environmental mutagens: the *waxy* reversion bioassay. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, v. 50, p. 44, 1976.
- RODRIGUES, G. S.; MA, T. H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis - a review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 4, p. 325-359, 1997.
- SANDA-KAMIGAWARA, M.; ICHIKAWA, S. Identity of normal and mutant flower-color pigments in four different *Tradescantia* clones confirmed by means of microspectrophotometry. **Japanese Journal of Genetics**, v. 68, p. 137, 1993.
- SCHAIRER, L. A.; SAUTKULIS, R. C. Detection of ambient levels of mutagenic atmospheric pollutants with the higher plant *Tradescantia*. In: KLEKOWSKI Jr., E.J., ed. **Environmental mutagenesis, carcinogenesis, and plant biology**. New York: Praeger, 1982. p.155-194.
- SHIMA, N.; ICHIKAWA, S. Mutagenic synergism detected between dimethyl sulfate and X-rays but not found between *N*-methyl-*N*-nitrosourea and X-rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. **Mutation Research**, v.331, p79-87, 1995.

- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: The Iowa State University Press, 1967. 593 p.
- UNDERBRINK, A. G.; SCHAIRER, L. A.; SPARROW, A. H. *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: HOLLAENDER, A., ed. **Chemical mutagens - principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1973. p.171-207.
- VIG, B. K. Soybean (*Glycine max* [L.] merrill) as a short-term assay for study of environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 339-347, 1982.
- VIG, B. K.; PADDOCK, E. F. Alteration by mitomycin C of spot frequencies in soybean leaves. **Journal of Heredity**, v. 59, n. 4, p. 225-229, 1968.



Meio Ambiente

