AKIHIKO ANOO
ENGENHEIRO-AGRÔNOMO

Instrutor do Departamento de Genética,
da Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz", da Universidade de São Paulo

EFEITO BIOLÓGICO DA COMBINAÇÃO DE TRATAMENTOS COM RAIOS-GAMA, CISTEÍNA E ALGUMAS SUBSTÂNCIAS ALQUILANTES SOBRE SEMENTES DE ARROZ

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor

Piracicaba - E. São Paulo
Brasil - 1970

A meus pais
e a minha espôsa
dedico.

AGRADECIMENTO

Expressamos os nossos sinceros agradecimentos a todos aquêles que contribuiram para a realização dêste trabalho, particularmente às seguintes pessoas e Instituições:

Prof.Dr. A.BLUMENSCHEIN, ORIENTADOR, Chefe do Departamento de Genética, pelo estímulo e dedicação sempre demonstrados durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Prof.Dr. F.G.Brieger, orientador inicial, pelo apoio constante.

Prof.Dr. R.Vencovsky, pelas sugestões e críticas valiosas na análise estatística.

Profs. Drs. J.T.A.Gurgel, J.L. de Azevedo, P.S.Martins e Srta. Lúcia V. de A. Botelho, pelas sugestões construtivas na leitura do manuscrito.

Dr. N.V.Banzatto, pelo fornecimento do material.

Funcionários e bolsistas do Departamento de Genética, entre êles Eng.Agr. A.Tulmann Neto e Sr. W.Spruck pelo auxílio na coleta dos dados, Sr. A.Rasera e o acadêmico Sr. Natal A.Vello pelo auxílio no cálculo dos dados, Sr. W.B.Bortolazzo pela confecção das figuras, Srta. Maria de Lourdes D'Abronzo pelo trabalho de datilografia e Sr. José Bróglio pelo serviço de impressão.

Agência Internacional de Energia Atômica e Comissão Nacional de Energia Nuclear pelos recursos financeiros necessários à realização do presente trabalho.

Índice

Página

1. Introdução 1

2. Revisão da literatura 4

2.1. Radiação e protetores químicos 4

2.2. Mutagênicos químicos 7

2.3. Combinação de tratamentos de radiação e mutagênicos químicos 10

2.4. Ontogenia das sementes dormentes 11

3. Material 13

3.1. Sementes 13

3.2. Protetor químico 13

3.3. Substâncias alquilantes 13

4. Métodos 14

4.1. Uniformização do conteúdo de água nas sementes 14

4.2. Determinação do "consumo" de cisteína e do tempo de tratamento 14

4.3. Tratamentos 15

4.3.1. Irradiação 15

4.3.2. Tratamentos químicos 16

4.3.2.1. Tratamento com cisteína 16

4.3.2.2. Tratamento com substâncias alquilantes 16

4.3.3. Combinação fatorial dos tratamentos 17

4.4. Semeadura e observações na casa de vidro 19

4.5. Transplante e observações no campo 19

4.6. Determinação da fertilidade 19

4.7. Determinação da freqüência de mutação de clorofila . 20

4.8. Análise do espectro de mutação de clorofila 20

4.9. Cálculo da taxa de segregação 21

4.10. Teste de sinal ("sign test") 21

4.11. Teste de homogeneidade 21

4.12. Teste não paramétrico de Friedman 22

4.13. Cálculo de coeficiente de determinação (R^2) 22

4.14. "Sib method" de Fisher 22

5. Resultados obtidos 23

Página

5.1. Determinação da relação entre o tempo de tratamento e "consumo" de cisteína 23

5.2. Dados sôbre caracteres em R_1 e freqüência de mutação de clorofila em R_2 23

5.2.1. Experimento 1 23

5.2.1.1. Germinação 24

5.2.1.2. Altura das plântulas 24

5.2.1.3. Sobrevivência 24

5.2.1.4. Fertilidade 25

5.2.1.5. Freqüência de mutação de clorofila. 25

5.2.2. Experimento 2 25

5.2.2.1. Germinação 26

5.2.2.2. Altura das plântulas 26

5.2.2.3. Sobrevivência 26

5.2.2.4. Fertilidade 26

5.2.2.5. Freqüência de mutação de clorofila 27

5.2.3. Experimento 3 27

5.2.3.1. Germinação 27

5.2.3.2. Altura das plântulas 28

5.2.3.3. Fertilidade 28

5.2.3.4. Freqüência de mutação de clorofila 29

5.2.4. Experimento 4 30

5.2.4.1. Germinação 30

5.2.4.2. Altura das plântulas 30

5.2.4.3. Fertilidade 31

5.2.4.4. Freqüência de mutação de clorofila 31

5.3. Médias ponderadas dos caracteres medidos em R_1 dos tratamentos com raios-gama 32

5.4. Espectro de mutação de clorofila 32

5.4.1. Dosagens ou concentrações diferentes dos mutagênicos e espectro de mutação de clorofila . 33

5.4.2. Ambiente diferente e espectro de mutação de clorofila 33

5.4.3. Mutagênicos químicos diferentes e espectro de mutação de clorofila 34

5.4.4. Pós-tratamento com cisteína e espectro de mutação de clorofila 34

5.4.5. Tratamentos combinados com raios-gama e mutagênicos químicos e espectro de mutação de clorofila 34

Página

5.4.6. Tratamentos combinados com cisteína e mutagênicos químicos e espectro de mutação de clorofila 35

5.4.7. Tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e mutagênicos químicos, e espectro de mutação de clorofila 35

5.5. Taxa de segregação 36

5.5.1. Dosagens ou concentrações diferentes dos mutagênicos e taxa de segregação 36

5.5.2. Ambiente diferente e taxa de segregação 36

5.5.3. Pós-tratamento com cisteína e taxa de segregação 37

5.5.4. Tratamento intercalado com cisteína e taxa de segregação 37

6. Discussão 38

6.1. Efeito da dosagem ou concentração dos mutagênicos sôbre os caracteres em R_1 e a freqüência de mutação de clorofila 38

6.2. Efeito do pós-tratamento com cisteína 40

6.3. Efeito da combinação de tratamentos com raios-gama e mutagênico químico 41

6.4. Efeito da combinação de tratamentos com raios-gama, cisteína e mutagênico químico 43

6.4.1. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+EO .. 44

6.4.2. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+EI .. 45

6.4.3. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+EMS .. 45

6.4.4. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+DS .. 46

6.5. Espectro de mutação de clorofila 46

6.6. Alguns aspectos da ontogenia da semente de arroz ... 48

7. Resumo e conclusões 53

8. Summary and conclusions 57

9. Literatura citada 61

Tabelas 70

Figuras 99

1. Introdução

Na história da indução de mutação, destacam-se dois acontecimentos importantes que marcaram época. Um foi a descoberta de MULLER em 1927, mostrando que raios-X provocavam mutações em Drosophila, e o outro de AUERBACH e ROBSON em 1942, mostrando que o gás mostarda também induzia mutações em Drosophila.

Depois que a energia nuclear passou a ser usada na pesquisa, particularmente após a segunda guerra mundial, têm sido feitos vários trabalhos com a finalidade de induzir mutações nos organismos por meio de radiação.

No campo de melhoramento de plantas, têm sido empregadas as radiações ionizantes em diversos países a fim de obter mutações desejáveis em várias plantas cultivadas, e já foram obtidas até hoje dezenas de linhagens ou variedades melhoradas.

Por outro lado, com o avanço recente da pesquisa sôbre o efeito biológico das radiações, está se tornando cada vez mais importante a pesquisa sôbre a recuperação dos organismos irradiados, afetados pelos danos causados por radiações. Várias substâncias químicas já foram descobertas com funções protetoras que recuperam ou diminuem os danos fisiológicos nos organismos irradiados. Dentre elas destacam-se os compostos sulfidrílicos.

É bem conhecido que a freqüência de mutação aumenta linearmente com o aumento da dosagem de radiação. Porém, com o aumento da dosagem de radiação, também aumenta o efeito fisiológico, causando a morte dos organismos irradiados quando a dosagem fôr suficientemente alta. Conseqüentemente, o número das mutações observadas é bastante reduzido, e a freqüência de mutação deixa de aumentar linearmente. Aumentar a freqüência de mutação nas sementes irradiadas é muito interessante não só para os geneticistas como também para os melhoristas, e várias tentativas têm sido feitas neste sentido.

De acôrdo com ZIMMER, EHRENBERG e EHRENBERG (1957) e CONGER e RANDOLPH (1959), as radiações ionizantes provocam aparecimento de radicais livres nas sementes, e êles permanecem no embrião relativamente por longo período de tempo. Êsses radicais podem causar, posteriormente, danos fisiológicos devido à formação de peróxidos, com o oxigênio existente no material. Portanto, se eliminarmos êsses radicais do embrião irradiado, poderemos esperar maior sobrevivência e conseqüente-

mente maior número de mutações observadas nas dosagens altas de radiação. Pesquisas recentes têm esclarecido que os compostos sulfidrílicos podem agir principalmente como removedores ("scavengers") dos radicais livres formados nos embriões das sementes irradiadas.

Paralelamente ao avanço da pesquisa em relação ao efeito mutagênico da radiação nos organismos, as pesquisas sôbre mutagênicos químicos têm sido desenvolvidas, também após a segunda guerra mundial, principalmente por um grupo de pesquisadores suecos.

O emprêgo de mutagênicos químicos na indução de mutação tem sido bastante freqüente e apresenta mesmo algumas vantagens sôbre as radiações. Por exemplo:

(1) O número e tipos de mutagênicos químicos são pràticamente ilimitados, ao contrário das radiações. Na indução de mutação por radiação, são usados, principalmente, raios-X, raios-gama e nêutrons, devido à baixa penetrabilidade das outras radiações. Por outro lado, existe a possibilidade de serem descobertos novos mutagênicos químicos mais eficientes dos já existentes, e também de serem escolhidos os mais adequados conforme o objetivo do experimento.

(2) O uso de mutagênicos químicos não requer instalações complexas e nem condições especiais. O contrôle do ambiente durante o tratamento com mutagênicos químicos é relativamente fácil, o que não acontece com as radiações que exigem aparelhos e construções especiais para se evitar contaminação.

(3) Alguns mutagênicos químicos têm efeito biológico bem maior do que qualquer dos tipos de radiação. Por exemplo, a freqüência máxima de mutação de clorofila em cevada é três a quatro vêzes maior quando se trata êsse material com metanosulfonato de etila (EMS), do que quando o mesmo material é irradiado (EHRENBERG, GUSTAFSSON e LUNDQVIST, 1961).

(4) Algumas substâncias mutagênicas afetam especìficamente certos locos nos cromossomos e induzem, conseqüentemente, mutações específicas. Por exemplo, N-nitroso-N-metiluretano (NMU) induz sòmente mutações de clorofila do tipo viridis (verde claro) em cevada (TANO e YAMAGUCHI, 1969). Ao contrário, as radiações induzem mutações ao acaso, não possuindo portanto funções mutacionais específicas. A especificidade dos mutagênicos químicos tem grande importância nas pesquisas futuras da indução de mutação.

No presente trabalho, foram combinados em fatorial os

tratamentos com raios-gama, cisteína e substâncias alquilantes, a fim de observar os efeitos biológicos da combinação dos tratamentos. O pós-tratamento com cisteína foi feito com a idéia de verificar se esta reduz os danos fisiológicos nas sementes irradiadas e causa conseqüente aumento do número de mutações observadas. A combinação de radiação e substâncias alquilantes foi feita com a finalidade de observar o efeito simultâneo dos dois mutagênicos combinados. Radiação, cisteína e substâncias alquilantes foram combinados a fim de observar se o tratamento com mutagênico químico, após a possível redução dos danos fisiológicos nas sementes irradiadas por meio de pós-tratamento com cisteína, aumenta ainda o número das mutações observadas, e, ao mesmo tempo, a fim de verificar se existe alguma interação entre tratamentos com cisteína e substâncias alquilantes, nos caracteres em R_1 (primeira geração tratada) e em R_2 (geração seguinte de R_1).

2. Revisão da literatura

A revisão da literatura será apresentada em quatro partes. Na primeira, será feita a revisão dos trabalhos sôbre radiação como mutagênico físico e protetores químicos, principalmente cisteína, que é um dos compostos sulfidrílicos. Na segunda e na terceira parte serão revistos os trabalhos referentes aos mutagênicos químicos, principalmente os compostos alquilantes, e à combinação dos tratamentos com radiação e mutagênicos químicos, respectivamente. Finalmente, na quarta parte, será feita a revisão dos trabalhos sôbre ontogenia das sementes irradiadas.

2.1. Radiação e protetores químicos

Desde a descoberta de que os raios-X provocam mutações em Drosophila (MULLER, 1927), em cevada (STADLER, 1928a) e em milho (STADLER, 1928b), têm sido desenvolvidos numerosos trabalhos sôbre a indução de mutação em vários organismos.

A palavra mutação compreende a mutação gênica ou do ponto e também a aberração cromossômica. Porém, nesta revisão, mutação corresponderá sempre à mutação gênica.

OLIVER (1930) e DEMEREC (1933), analisando a relação entre a freqüência de mutação letal em Drosophila e a dosagem de raios-X usada, concluiram que a freqüência de mutação aumentou proporcionalmente ao aumento da dosagem. Os mesmos resultados foram obtidos por TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, ZIMMER e DELBRÜCK (1935), em trabalhos mais detalhados, resumidos por LEA (1946), da seguinte maneira:

(1) A freqüência de mutação induzida por radiação aumenta proporcionalmente à dosagem.

(2) O efeito de determinada dosagem de radiação na indução de mutação não depende da intensidade da dosagem.

(3) Considerando uma determinada dosagem, a irradiação intermitente e a irradiação ininterrupta não afetam a freqüência total de mutação.

Entretanto, RUSSEL, RUSSEL e KELLY (1958), irradiando espermatogônios e ovogônios de camundongo, mostraram que, nas células metabòlicamente ativas, não foi observado o mencionado acima em (2) e (3), indicando que a freqüência de mutação pode ser alterada por fatôres ambientais antes ou após a irradiação. Essa indicação foi extrapo

lada também para as plantas, por vários pesquisadores.

Por outro lado, quando as sementes são irradiadas com dosagens baixas, a freqüência de mutação de clorofila, calculada à base do número das inflorescências R_1 provenientes dessas sementes irradiadas, aumenta proporcionalmente à dosagem. Porém, quando as dosagens são altas, a freqüência diminui devido à morte ou eliminação das células iniciais mutadas (GAUL, 1960), ou devido ao aumento da esterilidade causada pela aberração cromossômica (MATSUO, YAMAGUCHI e ANDO, 1958). YAMAGUCHI (1961) calculou, em arroz irradiado, a freqüência de mutação de clorofila baseada nas panículas R_1 com maior fertilidade, excluindo do cálculo as panículas com maior esterilidade, e observou que a freqüência de mutação de clorofila aumentou também nas dosagens altas. A fim de aumentar a freqüência de mutação, calculada na base das panículas R_1, é necessário, portanto, aumentar o número de sobreviventes e diminuir, ao máximo, a esterilidade causada pela aberração cromossômica.

A possibilidade de reduzir os danos causados por radiação foi sugerida por BARRON, DICKMAN, MUNTZ e SINGER (1949). Êles mostraram que os ênzimos que necessitam da base sulfidrílica -SH para as suas funções enzimáticas, podem ser inativados por baixa dosagem de raios-X, e indicaram, ao mesmo tempo, que os ênzimos inativados por radiação podem ser recuperados por glutationa, sugerindo que os compostos sulfidrílicos têm efeito protetor nos organismos prejudicados pela radiação.

Por outro lado, PATT, TYREE, STRAUBE e SMITH (1949) demonstraram que o pré-tratamento com cisteína recuperou sensivelmente ratos irradiados com doses letais de raios-X, indicando que o pós-tratamento com a mesma não mostrou efeito protetor. Êste fato foi confirmado posteriormente por vários pesquisadores em camundongo (PATT, MAYER, STRAUBE e JACKSON, 1953), e em vários tecidos animais (DAVIS, CRANMORE e ALPEN, 1958), em Escherichia coli (KOHN e GUNTER, 1959; BRIDGES, 1963; STERN, VAN DILLEWIJN e JOH BLOK, 1968), em ênzimo (HAMDY, NOAMAN e CASTER, 1969). Foi observado também que a cisteína diminuiu sensivelmente as aberrações cromossômicas causadas por radiações ionizantes nas raízes de Tradescantia paludosa (MIKAELSEN, 1954 e 1955) e de Allium cepa (RILEY, 1957; DALEN e OFTEBRO, 1963).

A cisteína é o único aminoácido já conhecido que manifesta ação protetora (BACQ, 1965). Porém, outros compostos sulfidrílicos tais como glutationa, cisteamina (beta-mercaptoetilamina ou MEA), cistamina, também mostraram efeito protetor em camundongo (SMITH, PATT,

TYREE e STRAUBE, 1950; BACQ e HERVE, 1951; STRAUBE e PATT, 1953; DAVIK e LOTHE, 1955), em células cultivadas de mamíferos (TROSKO e BREWEN, 1967), em raízes de Allium cepa (DALEN e OFTEBRO, 1963) e de Tradescantia paludosa (MIKAELSEN, 1952; MIKAELSEN e PEDERSEN, 1967), e em Neurospora crassa (KØLMARK, 1965).

Além dos compostos sulfidrílicos, vários protetores químicos tais como cianida, tiouréia, dihidrobrometo 2-aminoetilisotiouréia (AET), foram descobertos por vários pesquisadores. Um fato comum aos efeitos dêsses protetores químicos é que sòmente o pré-tratamento, e não o pós-tratamento, recupera os organismos dos danos causados pelas radiações.

Segundo ELDJARN e PIHL (1960), os possíveis mecanismos de proteção dos compostos sulfidrílicos são os seguintes:

(1) Sendo redutores, os compostos sulfidrílicos reduzem o conteúdo de oxigênio nos organismos e diminuem o efeito de oxigênio, causando o conseqüente efeito protetor.

(2) Os compostos sulfidrílicos formam dissulfêtos mistos com os grupos -SH e -S-S- de proteína. A ligação -S-S- de proteína é sensível à radiação, porém torna-se resistente quando se combina com a base sulfidrílica dos compostos sulfidrílicos.

(3) Os compostos sulfidrílicos eliminam os radicais livres formados nos organismos pela radiação. Êsses radicais são ativos e reagem, finalmente, com o DNA, causando danos. A "remoção" dos radicais livres pela base sulfidrílica causa a redução dos danos, mostrando o efeito protetor.

Todavia, os resultados obtidos por VAN BEKKUM e DE GROOT (1956)e HOLLAENDER e STAPLETON (1956) mostraram que a cisteamina recupera levedura e bactéria irradiadas, independentemente da existência do oxigênio. YAMAGUCHI (1962b) e SCHWARTZ e RICHARDSON (1967) também demonstraram que, em anóxia (ausência do oxigênio), a cisteína e cisteamina protegem sementes de arroz e células de bactéria irradiadas, respectivamente. GINSBERG e WESTER (1969) indicaram que, o DNA, apesar de não ter a base -SH nem a ligação -S-S-, pode ser bem protegido por cisteamina. Êsses resultados nos levam a crer que o principal mecanismo protetor desenvolvido pelos compostos sulfidrílicos é a eliminação dos radicais livres.

Quanto à formação dos radicais livres nas sementes sêcas irradiadas, tem sido esclarecido o seguinte:

(1) A maior parte dos radicais livres formados por radiação são encontrados no embrião (RANDOLPH e HABER, 1961; EHRENBERG, EHRENBERG e STRÖM, 1969).

(2) Os radicais induzidos permanecem nas sementes sêcas por período relativamente longo, possìvelmente por vários dias (ZIMMER et al., 1957; CONGER e RANDOLPH, 1959; RANDOLPH e HABER, 1961).

(3) Molhando as sementes irradiadas e secando-as em seguida, podem ser eliminados quase 90% dos radicais livres induzidos por radiação (HABER e RANDOLPH, 1966).

Baseando-se nessas observações, YAMAGUCHI (1962a, 1962b) irradiou sementes sêcas de arroz com raios-gama, tratando com cisteína logo em seguida, e observou o efeito protetor de cisteína em alguns caracteres R_1, e ainda observou a alteração do espectro de mutação de clorofila nas plântulas R_2.

2.2. Mutagênicos químicos

Após o sucesso de Muller e Stadler na indução de mutação artificial nos organismos superiores por meio de raios-X, surgiu a idéia de induzir mutação artificial por meio de substâncias químicas (LAW, 1938; GERSHENSON, 1939).

No entanto, AUERBACH e ROBSON (1942a, 1942b) foram os primeiros que conseguiram provocar mutações em Drosophila com um mutagênico químico. Êles trataram machos de Drosophila com o gás mostarda, e observaram que êste gás induziu mutações letais idênticas às induzidas por raios-X. O gás mostarda induziu, também, mutações viáveis, paralelamente às letais (AUERBACH e ROBSON, 1947). Posteriormente, HOROWITZ, HOULAHAN, HUNGATE e WRIGHT (1946), TATUM (1946), DEMEREC (1947), HOCKENHULL (1948), GUSTAFSSON e MACKEY (1948) e outros pesquisadores confirmaram o efeito mutagênico do gás mostarda em vários organismos, tanto em animais como em plantas.

Em conseqüência da descoberta de Auerbach e Robson, as pesquisas sôbre mutagênicos químicos foram iniciadas em vários países, e aceleradas, principalmente na Suécia, onde foram descobertos outros mutagênicos químicos ou, em outras palavras, substâncias radiomiméticas. Dentre êles destacam-se as substâncias alquilantes, que são muito eficientes na indução de mutação. Alquilação é o fenômeno pelo qual o grupo ativo do gás mostarda, por exemplo, reage com um receptor, tal como o grupo ácido da proteína ou o grupo fosfato do DNA (ALEXANDER, 1960).

Os epóxidos (por exemplo, óxido de etileno ou EO) e as epiminas (por exemplo, etilenoimina ou EI), derivados de etileno, são substâncias alquilantes muito poderosas. O efeito mutagênico dessas substâncias foi verificado em Drosophila (RAPOPORTO, 1948; CARDINALI, 1954), em Neurospora (WESTERGAARD, 1957), em cevada (EHRENBERG e GUSTAFSSON, 1957; EHRENBERG, LUNDQVIST e STRÖM, 1958; EHRENBERG, GUSTAFSSON e LUNDQVIST, 1959), em Pisum (BLIXT, EHRENBERG e GELIN, 1960), em arroz (KAWAI e SATO, 1965; YAMAGATA, SYAKUDO e FURUKAWA, 1965; ANDO, 1968), em trigo (KHVOSTOVA, MOZHAEVA, AIGAES e VALEVA, 1965; SCARASCIA e MONTI, 1966), e em outros organismos superiores.

EHRENBERG e GUSTAFSSON (1957) trataram sementes de cevada com EO e DB (diepoxibutano; duas moléculas de EO), e relataram que EO foi mais eficiente na indução de mutação de clorofila do que DB. De um modo geral, substâncias alquilantes monofuncionais são mais eficientes do que as polifuncionais na indução de mutação (EHRENBERG, 1960b).

Segundo EHRENBERG et al. (1959) que compararam os efeitos mutagênicos de radiação e derivados de etileno, observaram que:

(1) a freqüência máxima de mutação de clorofila induzida por EO é mais ou menos igual àquela induzida por raios-X ou nêutrons, enquanto que a induzida por EI é de três a quatro vêzes maior do que aquela induzida por raios-X ou nêutrons;

(2) EO e EI induzem maior variabilidade de mutações viáveis do que raios-X;

(3) EO e EI alteram o espectro de mutação de clorofila e produzem mais mutação do tipo viridis do que raios-X.

OSONE (1966), tratando sementes de arroz com EI e raios-X, obteve resultados mais ou menos semelhantes aos acima mencionados, e observou ainda que, com base nas dosagens que dão a mesma sobrevivência, EI dá maior fertilidade do que os raios-X nas plantas R_1. Porém, SATO (1966) não observou diferença significativa entre os espectros de mutação de clorofila por EO e por raios-X.

Comparando a eficiência de EO, EI e raios-X na indução de mutação de clorofila em arroz, KAWAI e SATO (1965) relataram que, baseando-se nas dosagens que deram o mesmo grau de letalidade, a ordem da eficiência é a seguinte: EI > raios-X > EO. Êles não observaram, contudo, diferença significativa entre os espectros de mutação de clorofila.

Ésteres de alcanosulfonato também são substâncias alquilan

tes muito eficientes. HESLOT e FERRARY (1958), EHRENBERG (1960a, 1960b), RIEGER e MICHAELIS (1960), FAVRET (1960), e outros pesquisadores verificaram que metanosulfonato de etila (EMS), um dos ésteres de alcanosulfonato, induz menos aberrações cromossômicas e alta freqüência de mutação, quando comparado com raios-X. A freqüência de mutação de clorofila em cevada por EMS, baseada nas espigas R_1, foi calculada de 50 a 60% (GUSTAFSSON, 1960; EHRENBERG, 1960a, 1960b; EHRENBERG, et al., 1961; SWAMINATHAN, CHOPRA e BHASKARAN, 1962), de 30 a 40% (KONZAK, NILAN, HARLE e HEINER, 1961; ARNASON, MOHAMMED, KOEHLER e RENNEBERG, 1962), e 30% (GAUL, 1962).

EHLING, CUMMING e MALLING (1967) compararam mutações letais dominantes induzidas nos machos de camundongo por EMS e MMS (metanosulfonato de metila) e concluiram que MMS é mais eficiente do que EMS. LOPPES (1969) tratou Chlamydomonas com EMS, MMS e MES (etanosulfonato de metila), e chegou à conclusão de que MMS e MES são mais eficientes do que EMS na indução de mutação reversa.

EHRENBERG, LUNDQVIST, OSTERMAN e SPARRMAN (1966) relataram que EMS provoca, em cevada, espectro de mutação de clorofila diferente de raios-X.

GAUL, BENDER, ULONSKA e SATO (1966) compararam os efeitos genéticos de raios-X e EMS em cevada, medindo vários caracteres quantitativos em R_3 e R_4, e concluiram que EMS causa maior variabilidade genética do que os raios-X.

O sulfato de dietila (DS) também é uma das substâncias alquilantes e tem se destacado pela sua alta capacidade mutagênica. HEINER, KONZAK, NILAN e LEGAULT (1960) trataram sementes de cevada com DS e obtiveram alta freqüência de mutação de clorofila, indicando que o tipo viridis é mais freqüente do que albina. FAVRET (1963) observou que DS induz mutação de clorofila em cevada com o espectro diferente de raios-X. MONTI (1968) revelou que, em Pisum tratado com DS, a freqüência total de mutação de todos os tipos é três a quatro vêzes maior do que a freqüência total obtida com raios-X.

A respeito da relação entre a concentração e o efeito biológico de mutagênicos químicos, GIBSON, BRINK e STAHMANN (1950), tratando pólen de milho com diversas concentrações do gás mostarda, indicaram que existe uma relação linear entre a concentração do gás e a esterilidade causada nas plantas R_1 pelas aberrações cromossômicas. EHRENBERG e GUSTAFSSON (1957), tratando sementes de cevada com várias

concentrações de EO e DB, observaram uma relação linear entre a concentração dos mutagênicos químicos e a freqüência de mutação de clorofila baseada nas espigas R_1.

Comparando os efeitos de raios-X, EO, EI, EMS e DS, baseados nas dosagens da mesma letalidade, SATO (1966) observou as seguintes ordens da eficiência dos mutagênicos:

EO > DS > EI > raios-X > EMS em fertilidade

EI ≃ EMS > DS > raios-X > EO em freqüência de mutação de clorofila

2.3. Combinação de tratamentos de radiação e mutagênicos químicos

Vários pesquisadores relataram o efeito biológico da combinação de tratamentos de radiações ionizantes com substâncias químicas nas plantas.

MATSUO e ONOZAWA (1961), usando sementes de arroz, combinaram tratamentos de raios-X (30KR) ou nêutrons térmicos ($4,0 \times 10^{13}$ Nth/cm^2) com pós-tratamentos de diepoxibutano (0,1% por 60 min.) ou de beta-propiolactona (0,5% por 60 min.). Êles verificaram que, nos tratamentos combinados de raios-X com mutagênicos químicos a esterilidade em R_1 foi menor e a freqüência de mutação de clorofila baseada nas panículas R_1 foi maior do que a soma dos efeitos obtidos em cada tratamento isoladamente. No entanto, a freqüência de mutação de clorofila do tratamento combinado de nêutrons com mutagênicos químicos foi menor do que a soma das duas freqüências correspondentes. Porém, essa diferença não foi significativa. Quanto ao espectro de mutação de clorofila, êles não observaram alteração significativa entre os tratamentos individuais e combinados.

FAVRET (1963) mostrou que, na combinação de tratamento de raios-X (10KR e 20KR) e pós-tratamento com EMS (0,05% e 0,1%), a freqüência de mutação de clorofila em cevada aumentou aditivamente, isto é, a freqüência observada foi igual à soma das freqüências observadas em cada tratamento. No entanto, na combinação de pré-tratamento com EMS e tratamento com raios-X, não foi observado o efeito aditivo na freqüência de mutação de clorofila, e a freqüência foi menor do que a esperada.

Resultados interessantes foram obtidos em aveia por WALLACE (1965) que combinou pré-tratamento de EI (0,04% e 0,07%, por 2 hrs) ou de DS (0,50% e 0,75%, por 2 hrs) com várias dosagens de raios-gama. A combinação dos dois mutagênicos resultou na indução de mutação com freqüência muito mais alta do que a esperada, no loco Vb que controla a susceptibilidade para o fungo Helminthosporium victoriae. A

mesma interação positiva foi observada na indução de mutação de clorofila em cevada por AASTVEIT (1968), quando foram combinados raios-gama e EMS.

SIDDIQ e SWAMINATHAN (1968), irradiaram, por outro lado, sementes de arroz com raios-gama (20KRad e 30KRad) e trataram-nas em seguida com EMS (0,33% por 8 hrs a 25°C). Os resultados mostraram que a combinação dos dois tratamentos sempre resultou em menor freqüência de mutação de clorofila do que a soma das freqüências obtidas com os dois tratamentos individualmente.

DOLL e SANDFAER (1969) combinaram, em cevada, várias dosagens de raios-gama e diversas concentrações de DS ou EMS, e chegaram à conclusão de que os dois mutagênicos combinados agem aditivamente na esterilidade em R_1 e na freqüência de mutação de clorofila em R_2. Segundo êles, entretanto, a interação foi negativa sôbre a sobrevivência, quando altas dosagens de raios-gama foram combinadas com os mutagênicos químicos.

TANO e YAMAGUCHI (1970) também mostraram o efeito aditivo na indução de mutação de clorofila, quando sementes de cevada foram tratadas com raios-X (20KR) e logo em seguida com NMU (0,2mM por 3 hrs).

2.4. Ontogenia das sementes dormentes

O embrião de uma semente dormente consta, geralmente, de várias células iniciais, portanto plantas R_1 provenientes de sementes tratadas com mutagênicos são muitas vêzes verdadeiras quimeras. Uma panícula ou uma espiga, originando-se de várias células iniciais, pode ser uma quimera com um setor mutado e outro não se ocorrer uma mutação em uma das células iniciais.

Em 1930, STADLER concluiu que, no embrião de sementes de cevada, as células iniciais já estão diferenciadas, e que, portanto, a ocorrência de uma mutação afetará só uma espiga. Posteriormente, CALDECOTT e SMITH (1952) indicaram que uma espiga de cevada desenvolve-se de uma única célula inicial, com base na observação de que as células mães do grão de pólen de uma espiga mostravam o mesmo tipo de aberração cromossômica. GAUL (1959), por sua vez, observou espigas de cevada com espiguetas normais e estéreis simultaneamente, sendo que as estéreis eram devidas a uma translocação recíproca. Êle concluiu que uma espiga de cevada se origina, no mínimo, de duas células iniciais.

NISHIMURA e KURAGAMI (1952) demonstraram em arroz que, pelo menos, as cinco panículas primárias, nas sementes irradiadas com raios-X, desenvolvem-se independentemente da panícula principal. MATSUO et al. (1958) mostraram que a panícula secundária recebe a mesma alteração genética da panícula primária da qual se originou, e que, portanto, elas se originaram da mesma célula inicial. YAMAGUCHI (1962c) irradiou sementes de arroz com raios-gama e nêutrons, e observou que a taxa de segregação das panículas mutadas aumentou com o aumento da dosagem, porém, foi sempre menor do que 0,25, que é o valor esperado sob a hipótese de que o primórdio consta de uma única célula inicial, quando o material foi irradiado. Êle concluiu que esta diferença era devida à formação da quimera nas panículas R_1, e calculou o número das células iniciais no primórdio, encontrando no máximo três no tratamento com 10.000R de raios-gama, e duas nos tratamentos com 20.000R e 30.000R. OSONE (1963), analisando a taxa de segregação de várias panículas de uma planta proveniente da semente irradiada de arroz, concluiu que, no máximo, 6 células iniciais contribuiram para formação da panícula principal.

MACKEY (1954) descreveu o número das mutações somáticas que ocorreram em espiga R_1 de trigo, concluindo que esta espiga originou-se de mais de uma célula inicial. Mais tarde, SWAMINATHAN (1961) observou que, no embrião de trigo, já estão diferenciados 3 ou 4 primórdios, e que cada espiga se origina de uma única célula inicial.

ANDERSON, LONGLEY, LI e RETHERFORD (1949) relataram que um pendão de milho origina-se de 7 a 8 células já presentes no ápice da semente dormente, e SMITH, CURTIS, WOODLEY e STEIN (1962) indicaram que o meristema do milho tinha pelo menos 14 células na hora da irradiação com dêuterons.

KAUKIS e REITZ (1955) concluiram, pela observação da distribuição dos mutantes em panícula R_1 do sorgo, que já existe mais de uma célula inicial no embrião da semente.

BLIXT, EHRENBERG e GELIN (1958) observaram, em Pisum, que ocorreu sempre só uma mutação em uma ramificação, e concluiram que uma ramificação desenvolve-se de uma única célula inicial.

MOH (1961) indicou, pela observação da distribuição dos mutantes morfológicos num indivíduo e pela alta freqüência dos mutantes não quiméricos, que o cafeeiro se desenvolve de uma única célula inicial.

3. Material

3.1. Sementes

Foram usadas sementes dormentes de arroz da variedade brasileira "Dourado Precoce". O material foi fornecido, inicialmente, pelo Instituto Agronômico de Campinas, e posteriormente foi cultivado e propagado no Instituto de Genética da ESALQ. Nos experimentos realizados em 1965 e 1966, foi usado o material procedente do IAC, e nos experimentos realizados em 1967 e 1968, foram usadas sementes colhidas em Piracicaba.

3.2. Protetor químico

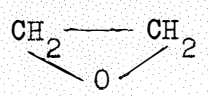
Foi usado como protetor químico o cloridrato de L-cisteína, (BDH ... British Drug Houses), que é um dos compostos sulfidrílicos. Abaixo é dada a fórmula dessa droga:

$$CH_2(SH)CH(COOH)NH_2HCl \qquad PM = 157,63$$

3.3. Substâncias alquilantes

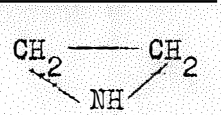
Foram usados quatro compostos alquilantes: óxido de etileno (BDH); etilenoimina (Koch-Light); metanosulfonato de etila (Eastman Kodak); sulfato de dietila (Carlo Erba). Essas drogas serão denominadas neste trabalho, de acôrdo com a abreviação comumente adotada por vários pesquisadores, como EO, EI, EMS e DS, respectivamente. Abaixo são mostradas as fórmulas dêsses compostos alquilantes:

óxido de etileno (EO)



PM = 44,05

etilenoimina (EI)



PM = 43,07

metanosulfonato de etila (EMS)

$$CH_3SO_3C_2H_5$$

PM = 124,16

sulfato de dietila (DS)

$$(C_2H_5O)_2SO_2$$

PM = 154,18

4. Métodos

4.1. Uniformização do conteúdo de água nas sementes

Inicialmente, as sementes foram mantidas durante mais de um mês em dessecador com o desidratante $CaCl_2$, a fim de uniformizar a umidade do material, e, conseqüentemente, tornar a radiosentividade uniforme em todos os experimentos.

O conteúdo de água nas sementes foi estimado pela secagem do material na estufa durante 72 horas à temperatura de 90 a 100°C. A diferença entre o pêso inicial e o pêso final, após a secagem do material, foi considerada como água livre nas sementes. A média das quatro amostras dos quatro experimentos foi de 8,1%.

4.2. Determinação do "consumo" de cisteína e do tempo de tratamento

A fim de determinar a relação entre o tempo e o "consumo" de cisteína, e de escolher o tempo adequado para o tratamento com cisteína, foi feito um experimento colorimétrico preliminar sôbre a solução de cisteína, de acôrdo com o método desenvolvido por LIDDELL e SAVILLE (1959).

Foram preparados 18 frascos de Erlenmeyer de 250 ml, sendo metade com 400 sementes selecionadas e com 100 ml da solução de cisteína 1×10^{-3}M, e os restantes com apenas 100 ml da mesma solução sem sementes. Todos os frascos foram bem fechados e mantidos a 25 ± 1°C. Após vários tempos, dois frascos de cada vez, um com sementes e outro sem sementes, foram levados para a determinação colorimétrica a fim de determinar o "consumo" ou a "perda" de cisteína na solução. A diferença entre as duas medidas foi considerada como o "consumo" ou a "perda" de cisteína durante êste tempo, devido à existência das sementes na solução.

Paralelamente, foi feito um experimento sôbre a absorção de água pelas sementes sêcas de arroz a 25 ± 1°C. O material foi colocado simplesmente dentro de água destilada e foram feitas várias pesagens após diversas horas. A absorção de água pelas sementes foi determinada pela diferença entre o pêso inicial e o pêso após o período de imersão. (Ver Figura 1).

4.3. Tratamentos

No presente trabalho, foram desenvolvidos quatro experimentos diferentes. Durante todo o trabalho, êstes experimentos serão denominados como Exp.1, Exp.2, Exp.3 e Exp.4, respectivamente. Em cada um dêles foram combinados em fatorial os tratamentos com raios-gama, cisteína e mutagênicos químicos. Êsses tratamentos serão abreviados neste trabalho como R, C e MQ, respectivamente. Os quatro experimentos foram realizados em anos diferentes, com as seguintes combinações:

Exp.1	R, C e EO,	em 1965
Exp.2	R, C e EI,	em 1966
Exp.3	R, C e EMS,	em 1967
Exp.4	R, C e DS,	em 1968

Em todos os experimentos foram escolhidas quatro dosagens de raios-gama, isto é, 0KR (0), 10KR (1), 20KR (2) e 30KR (3), e uma única concentração de cisteína. Quanto aos mutagênicos químicos, foi usada uma única concentração nos Exps.1 e 2, e quatro concentrações nos Exps. 3 e 4. Os tratamentos com mutagênicos químicos com essas concentrações serão denominados neste trabalho como EMS_1, EMS_2, EMS_3 e EMS_4 no Exp.3, e DS_1, DS_2, DS_3 e DS_4 no Exp.4.

O esquema geral da combinação fatorial dos tratamentos foi o seguinte:

0 (contrôle)	0+C	0+MQ	0+C+MQ
1	1+C	1+MQ	1+C+MQ
2	2+C	2+MQ	2+C+MQ
3	3+C	3+MQ	3+C+MQ

Neste esquema, a combinação dos tratamentos 2+C+MQ, por exemplo, significa que as sementes foram irradiadas primeiro com 20KR de raios-gama, em seguida tratadas com cisteína, e finalmente tratadas com mutagênico químico. Em outro exemplo, o tratamento 0+C significa que o material foi tratado diretamente com cisteína, sem irradiação.

4.3.1. Irradiação

Foram usados como fonte de irradiação de raios-gama, o reator do Instituto de Energia Atômica (IEA), da Cidade Universitária, S. Paulo, nos Exps. 1 e 2, e a fonte de Co^{60} do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", nos Exps. 3 e 4.

As sementes, 500 no Exp.1, 450 no Exp.2 e 400 nos Exps. 3 e 4, foram colocadas em saquinhos de plástico e dispostas no orifício do reator ou em tôrno da fonte de Co^{60} de modo que tôdas as sementes recebessem a irradiação uniformemente. A intensidade da dosagem variou de um experimento para outro, porém a mínima foi de aproximadamente 350R/min e a máxima de aproximadamente 1.000R/min.

4.3.2. Tratamentos químicos

Todos os tratamentos químicos foram feitos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro e 2 cm de altura, mantidas fechadas durante o tratamento. Os tratamentos nos Exps. 1 e 2 foram feitos no laboratório à temperatura de 27 $\pm$ 2°C, e nos Exps. 3 e 4 foram realizados em uma câmara de crescimento (Growth Lab., PGW-132, Percival, USA) à temperatura de 25 $\pm$ 1°C.

Nos Exps. 1 e 2, os tratamentos químicos foram iniciados no laboratório do IEA. A fim de facilitar o transporte para Piracicaba, o material foi colocado dentro de saquinhos plásticos, contendo a solução, e posteriormente selados. Os saquinhos foram transportados para Piracicaba em uma caixa de isopor. Após a chegada, todo o conteúdo dos saquinhos foi transferido para as placas de Petri e aí mantido até completar o tempo de tratamento.

Em todos os tratamentos químicos, a solução foi preparada com água destilada e o volume da solução com substância química foi calculado na base de 0,125 ml por semente, não sendo utilizada solução tampão.

4.3.2.1. Tratamento com cisteína

Uma única concentração de 1×10^{-3}M foi preparada logo antes do início dos tratamentos. O tempo de tratamento foi de 45 horas no Exp.1, 30 horas no Exp.2, e 24 horas nos Exps. 3 e 4.

4.3.2.2. Tratamentos com substâncias alquilantes

Abaixo são mostradas as concentrações e tempo de tratamentos com substâncias alquilantes, ou sejam, mutagênicos químicos:

	Mutagênico químico	Concentração (%)	Tempo de tratamento (hrs)
Exp.1	EO	0,15	10
Exp.2	EI	0,05	10
Exp.3	EMS_1	0,50	10
"	EMS_2	1,00	10
"	EMS_3	1,50	10
"	EMS_4	2,00	10
Exp.4	DS_1	0,30	4
"	DS_2	0,46 (0,03M)	3
"	DS_3	0,50	4
"	DS_4	0,70	4

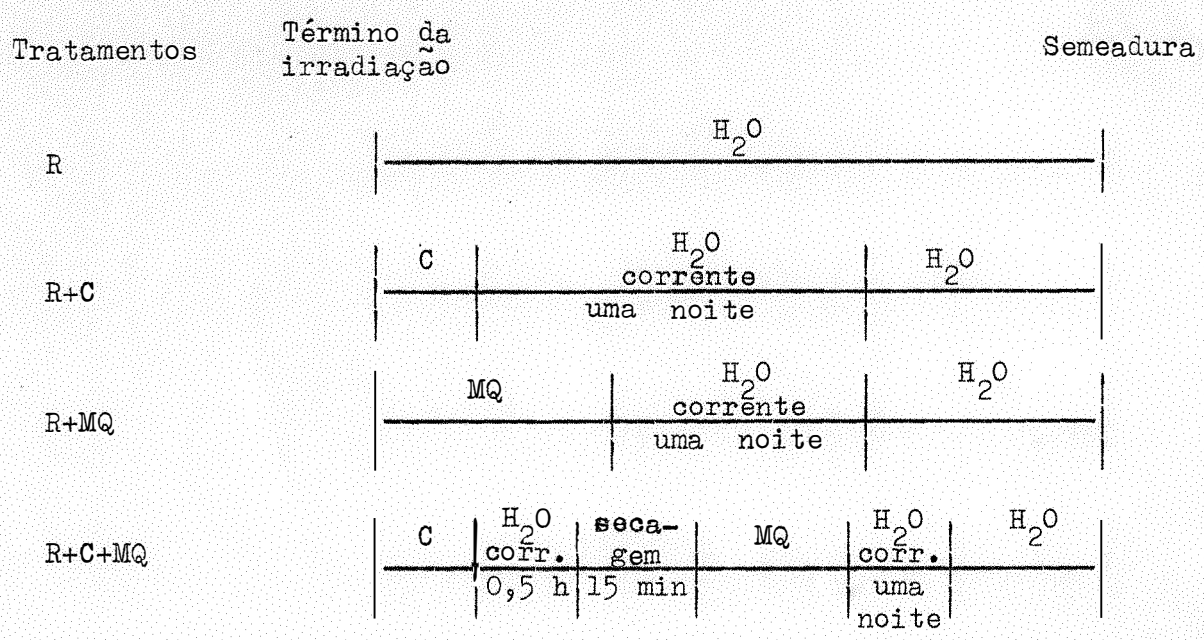
As soluções de EO e EI foram preparadas e congeladas aproximadamente 12 horas antes do início dos tratamentos químicos, e levadas, numa caixa de isopor, para o IEA onde as sementes foram irradiadas. As soluções foram descongeladas logo antes do início dos tratamentos com mutagênicos químicos. As soluções de EMS e DS foram preparadas logo antes do início dos tratamentos. Sòmente a solução de DS foi trocada de hora em hora, devido à curta meia-vida dessa substância.

4.3.3. Combinação fatorial dos tratamentos

Quando as sementes foram tratadas sòmente com raios-gama, sem tratamento químico algum, o material irradiado foi colocado em água imediatamente após a irradiação.

Quando foram combinados raios-gama e cisteína, o material irradiado foi posto na solução de cisteína logo após a irradiação e depois do término do tratamento, foi lavado em água corrente durante uma noite, e imerso em água numa placa de Petri até a semeadura.

Quando foram combinados raios-gama, cisteína e mutagênico químico, o material irradiado foi colocado na solução de cisteína durante um tempo determinado, após o qual foi lavado em água corrente durante 30 minutos, e em seguida colocado sôbre um papel de filtro durante 15 minutos a fim de remover a água excessiva e superficial das sementes. Após esta operação o material foi tratado com a solução de mutagênico químico. Após o término do tratamento, o material foi lavado em água corrente durante uma noite. Abaixo é mostrado o esquema seguido nos vários tratamentos:



Todos os tratamentos químicos, tanto das sementes irradiadas como das não irradiadas, foram iniciados ao mesmo tempo.

Os Exps. 3 e 4 foram feitos nas duas etapas seguintes, devido ao número elevado das combinações fatoriais:

(1) Exp.3 - Primeiramente, foram feitas tôdas as combinações fatoriais de raios-gama, cisteína e EMS_1. Um mês após, foram feitos os seguintes tratamentos com EMS_2, EMS_3 e EMS_4:

$0+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	$0+C+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	0 (contrôle)
$1+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	$1+C+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	
$2+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	$2+C+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	
$3+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	$3+C+EMS_{2,\ 3,\ 4}$	

(2) Exp.4 - Primeiramente, foram feitas as seguintes combinações dos tratamentos:

0+C	$0+DS_2$	$0+C+DS_2$	0 (contrôle)
1+C	$1+DS_2$	$1+C+DS_2$	
2+C	$2+DS_2$	$2+C+DS_2$	
3+C	$3+DS_2$	$3+C+DS_2$	

Um mês depois, foram feitos os seguintes tratamentos:

0 (contrôle)	$0+DS_{1,\ 3,\ 4}$	$0+C+DS_{1,\ 3,\ 4}$
1	$1+DS_{1,\ 3,\ 4}$	$1+C+DS_{1,\ 3,\ 4}$
2	$2+DS_{1,\ 3,\ 4}$	$2+C+DS_{1,\ 3,\ 4}$
3	$3+DS_{1,\ 3,\ 4}$	$3+C+DS_{1,\ 3,\ 4}$

4.4. Semeadura e observações na casa de vidro

Após o término dos tratamentos, o material foi semeado em caixas de madeira de 35 x 50 cm com profundidade de 10 cm, as quais foram colocadas em casa de vidro.

A germinação foi observada uma semana após a semeadura, e a altura das plântulas foi medida duas semanas após a semeadura, tomando-se 100 plântulas no Exp. 1, 64 no Exp.2, e 50 nos Exps. 3 e 4. Tôdas as plântulas medidas foram escolhidas ao acaso, e quando o número era pequeno, tôdas foram medidas.

4.5. Transplante e observações no campo

Mais ou menos um mês após a semeadura, as mudas foram transplantadas para o campo com espaçamento de 10 cm entre covas e 40 cm entre linhas; uma muda em cada cova. As mudas dos tratamentos mais drásticos foram plantadas em vasos e mantidas na casa de vidro a fim de garantir maior número de sobreviventes e descendentes para serem analisados.

As panículas de cada sobrevivente foram marcadas pela ordem de florescimento, sendo colhidas as cinco primeiras no Exp.1, e as três primeiras nos demais experimentos.

Foi anotado o número de sobreviventes na ocasião da colheita. A taxa de sobrevivência, baseada no número das sementes semeadas, foi calculada sòmente nos Exps. 1 e 2. Nos demais experimentos, esta taxa não foi calculada devido à perda parcial da plantação causada pelas fortes chuvas que cairam após o transplante, em 1967 e 1968.

4.6. Determinação da fertilidade

A fertilidade foi calculada tomando-se 100 panículas em cada tratamento, escolhidas ao acaso. Quando o número era pequeno, tôdas foram contadas. Só os grãos completamente estéreis foram considerados como tal.

Como cada experimento foi executado em anos diferentes, a germinação, altura das plântulas, sobrevivência e fertilidade estão apresentadas nas tabelas e figuras por índices, nos quais a medida do contrôle foi sempre considerada como 100,0.

4.7. Determinação da freqüência de mutação de clorofila

Tôdas as panículas colhidas, exceto aquelas completamente estéreis, foram semeadas separadamente, sem debulhar, nos canteiros de areia da casa de vidro, sendo observadas as mutações de clorofila mais ou menos 10 dias após a semeadura.

Quando apareceu uma mutação qualquer de clorofila numa panícula, foi considerado que ocorreu uma mutação de clorofila nesta panícula. Quando apareceram duas mutações de clorofila diferentes numa panícula, foi considerado que ocorreram duas mutações de clorofila nessa panícula. Portanto, o que se considerou foi o número de mutações de clorofila e não o número de mutantes.

Se houvesse pelo menos uma plântula germinada numa panícula semeada, independentemente de que fôsse mutante ou normal, essa panícula era considerada como uma panícula germinada. Se não houvesse nenhuma plântula germinada, essa panícula era excluída do cálculo da freqüência de mutação de clorofila.

A freqüência de mutação de clorofila por 100 panículas R_1 foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Nº total de mutações de clorofila observadas}}{\text{Nº total de panículas germinadas } R_1} \times 100$$

4.8. Análise do espectro de mutação de clorofila

Foi usada a classificação de GUSTAFSSON (1940) e HOLM (1954), onde as principais mutações de clorofila são as seguintes:

albina - planta branca
viridis - planta verde claro
xantha - planta amarela
striata - planta listrada longitudinalmente de branco e verde normal
maculata - planta manchada com côres branca e verde normal

Várias outras mutações de clorofila também foram observadas. Todavia, no presente trabalho, tôdas as mutações de clorofila foram classificadas em três classes: albina, viridis e outras. A classe outras abrange xantha, striata, maculata e todos os outros tipos.

Em princípio, a análise estatística foi feita para as três

classes. Entretanto, quando a freqüência esperada de, pelo menos, uma classe era pequena para ser analisada individualmente, esta classe foi juntada com outra, e a análise foi feita, conseqüentemente, para apenas as duas classes.

4.9. Cálculo da taxa de segregação

As panículas R_1 nas quais apareceu pelo menos um mutante de clorofila, foram consideradas como mutadas, e foram contadas as plântulas normais e mutadas. A taxa de segregação de um tratamento foi calculada da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Nº total de mutantes das panículas mutadas}}{\text{Nº total de plântulas das panículas mutadas}}$$

A análise estatística foi feita, em princípio, para os tratamentos com, pelo menos, 10 panículas segregadas.

4.10. Teste de sinal ("sign test")

A fim de avaliar o efeito de pós-tratamento com cisteína sôbre vários caracteres em R_1, foi aplicado o teste de sinal ("sign test") (STEEL e TORRIE, 1960). Na comparação dos dois tratamentos, num caráter em R_1, com a mesma dosagem de raios-gama, isto é, um sòmente com raios-gama e outro com cisteína após a irradiação, foi dado um sinal (+) quando o efeito da cisteína foi positivo, e um sinal (-) quando o efeito foi negativo. Quando não houve diferença, o efeito foi excluído do cálculo. É recomendado, entretanto, não aplicar êste teste quando o número de comparações é menor de 12. Portanto, nos testes do Exp.1 e Exp.2, foram incluídas as comparações entre os tratamentos O e O+C. A fórmula dêste teste é a seguinte:

$$X^2 = \frac{(|N_1 - N_2| - 1)^2}{N_1 + N_2}$$

N_1 ... nº de casos com sinal (+)
N_2 ... nº de casos com sinal (-)

4.11. Teste de homogeneidade

Durante os testes de homogeneidade para germinação, sobrevivência, fertilidade e freqüência de mutação de clorofila, as seguintes recomendações feitas por PIMENTEL (1963) foram consideradas:

(1) A freqüência esperada mínima não deve ser inferior a 1.

(2) Só em alguns casos a freqüência esperada pode ser menor que 5.

Na análise da homogeneidade da freqüência de mutação de clorofila, foi aplicado o teste exato de Fisher (PIMENTEL, 1963), quando à freqüência total foi pequena.

Na análise da altura das plântulas, o resíduo da análise da variância foi decomposto para se verificar a sua homogeneidade. O teste empregado foi o de Bartlett (STEEL e TORRIE, 1960). Quando não foi mostrada homogeneidade, os graus de liberdade foram reduzidos, conforme as recomendações de BOX (1954).

4.12. Teste não paramétrico de Friedman

Durante a discussão da taxa de segregação e da freqüência de mutação de clorofila em relação à ordem de florescimento das panículas R_1, foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman ("ranking test") (STEEL e TORRIE, 1960). A fórmula dêste teste é a seguinte:

$$X^2 = \frac{12}{bt\,(t+1)} \sum_i r_i^2 - 3b\,(t+1)$$

onde t é o número de florescimentos a comparar (3 no caso, isto é, 1º, 2º e 3º florescimento); b é, para o presente trabalho, o número dos tratamentos, r_i é a soma das ordens de classificação do florescimento i ($i = 1, 2$ e 3), e 12 e 3 são constantes.

4.13. Cálculo de coeficiente de determinação (R^2)

A fim de discutir se a ação da radiação e dos diversos mutagênicos químicos foi aditiva, calculou-se um coeficiente de determinação (R^2) para cada combinação de tratamentos. Êste coeficiente foi obtido baseando-se num modêlo aditivo (STEEL e TORRIE, 1960), e pela sua magnitude foi discutida a presença ou não de interação entre a radiação e mutagênicos químicos.

4.14. "Sib method" de Fisher

Êste método de Fisher (MATHER, 1951) foi aplicado para os casos em que as famílias não tinham tamanho suficiente que permitisse um teste de X^2 para a segregação monofatorial.

5. Resultados obtidos

5.1. Determinação da relação entre o tempo de tratamento e "consumo" de cisteína

Na Tabela 1 são mostrados os resultados da análise colorimétrica do "consumo" de cisteína na solução 1×10^{-3}M a 25 ± 1°C. As diferenças entre o conteúdo do frasco só com solução de cisteína e do frasco com a solução de cisteína mais as sementes, são apresentadas em porcentagem relativa à quantidade inicial de cisteína no tempo zero, e também em pêso de cisteína em µg por 1 g de sementes. A Figura 1 mostra a relação entre o tempo de tratamento e "consumo" de cisteína em µg por 1 g de sementes. Nesta figura foi colocada também a curva de absorção de água pelas sementes sêcas a 25 ± 1°C. É evidente que o "consumo" de cisteína aumentou com o tempo e com a absorção de água pelas sementes. Até mais ou menos 25 horas, as duas curvas são paralelas. Isto indica que está ocorrendo uma absorção seletiva de cisteína pelas sementes, ou a decomposição química de cisteína por algumas substâncias secretadas pelas sementes ou ainda por outros fatôres desconhecidos. Se ocorresse um "consumo" de cisteína proporcionalmente à absorção de água, sem decomposição química, a concentração de cisteína da solução deveria ser constante, e portanto a curva não deveria aumentar com o aumento do tempo.

Da curva do "consumo" de cisteína, foram escolhidos os seguintes tempos de tratamento:

24 horas quando o rítmo do "consumo" é ainda constante;
30 horas quando o "consumo" começa a ser acelerado;
45 horas quando o "consumo" começa a declinar.

5.2. Dados sôbre caracteres em R_1 e freqüência de mutação de clorofila em R_2

5.2.1. Experimento 1

Os resultados da combinação fatorial dos tratamentos de raios-gama, cisteína e EO são mostrados na Tabela 2 e nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6. No rodapé destas figuras são mostrados também os resultados das análises estatísticas feitas.

5.2.1.1. Germinação

De um modo geral, a germinação diminuiu com o aumento da dosagem de raios-gama em tôdas as combinações de tratamentos (Figura 2).

Quanto à combinação de tratamentos de raios-gama e EO, o efeito letal sôbre a germinação aumentou com o aumento da dosagem da radiação, chegando a 100% no tratamento 3+EO, onde nenhuma germinação foi observada. O efeito da cisteína aplicada entre a radiação e o mutagênico químico foi sensìvelmente positivo nas dosagens de 20KR e 30KR; com 20 KR, a germinação aumentou de 26,6 para 45,0, e com 30KR, de 0,0 para 16,6.

5.2.1.2. Altura das plântulas

A altura das plântulas também diminuiu, de modo geral, com o aumento da dosagem de raios-gama. Na Figura 3 são mostrados os resultados com relação à altura das plântulas.

Comparando os tratamentos R e R+C, verificou-se que, com o pós-tratamento das sementes irradiadas com cisteína, a altura das plântulas diminuiu significativamente de 92,4 para 84,1 com 10KR, de 69,2 para 52,6 com 20KR, e de 51,2 para 43,5 com 30KR. Com 0KR, não foi observada diferença significativa.

Analisando-se os tratamentos R+EO e R+C+EO, verificou-se que, com a inclusão da cisteína, a altura das plântulas aumentou significativamente de 21,7 para 41,0 com 20KR e de 48,7 para 58,5 com 0KR. Como foi observado na germinação, o tratamento 3+EO foi letal. No entanto, cisteína recuperou a germinação dêste tratamento, possibilitando assim a observação da altura das plântulas de 23,9 no tratamento 3+C+EO.

5.2.1.3. Sobrevivência

Embora que tôdas as plântulas dos tratamentos 2+EO e 3+C+EO foram cultivadas na casa de vidro, a sobrevivência na época de colheita geralmente diminuiu com o aumento da dosagem de raios-gama, como mostrada na Figura 4.

Na comparação dos tratamentos R e R+C, a cisteína interferiu negativamente com 0KR, 10KR e 20KR. Com 30 KR, o efeito de cisteína foi positivo, porém não foi significativo.

Comparando-se os tratamentos R+EO e R+C+EO, verificou-se

que a cisteína reduziu a sobrevivência de 65,2 para 49,7 com 0KR, e de 69,0 para 46,1 com 10KR. Houve um aumento significativo de 31,3 para 43,9 com 20KR. No tratamento 3+C+EO, foi observada a sobrevivência de 19,7.

5.2.1.4. Fertilidade

A Figura 5 mostra claramente que a fertilidade diminuiu quase linearmente com o aumento da dosagem de raios-gama. Não foi observado, no entanto, o efeito protetor de cisteína quando se compararamos tratamentos R e R+C. Pelo contrário, o pós-tratamento com cisteína durante 45 horas prejudicou a fertilidade das sementes irradiadas com tôdas as dosagens, inclusive 0KR.

Nos tratamentos R+EO e R+C+EO foi demonstrado que a intercalação do tratamento com cisteína aumentou significativamente a fertilidade com 20KR e diminuiu com 10KR. No tratamento 3+C+EO foi obtida a fertilidade de 34,9.

5.2.1.5. Freqüência de mutação de clorofila

A Figura 6 mostra a freqüência de mutação de clorofila.

A freqüência de mutação de clorofila foi sempre mais alta nos tratamentos R+C, em comparação com a dos tratamentos R. O aumento da freqüência com 0KR e 20KR foi significativo, porém não significativo com as outras dosagens.

O uso da cisteína entre a radiação e o mutagênico EO teve efeito significativamente negativo com 0KR, e não teve efeito significativo com as dosagens de 10KR e 20KR. No tratamento 3+C+EO, onde a germinação foi recuperada de 0,0 para 16,6, foram observadas 15,2 mutações de clorofila por 100 panículas germinadas, sendo a maior freqüência observada em todos os tratamentos do Exp.1.

5.2.2. Experimento 2

Os resultados da combinação dos tratamentos de raios-gama, cisteína e EI são mostrados na Tabela 3 e nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11. Os resultados das análises estatísticas são mostrados no rodapé nestas figuras.

5.2.2.1. Germinação

Geralmente, como mostrado na Figura 7, a germinação diminuiu com o aumento da dosagem de raios-gama em tôdas as combinações de tratamentos.

Comparando os tratamentos R e R+C, verificou-se que nenhum pós-tratamento com cisteína apresentou diferença significativa.

O mesmo foi observado nos tratamentos R+EI e R+C+EI. Nos tratamentos 0+C+EI, 2+C+EI e 3+C+EI foi observado ligeiro, porém não significativo, aumento da germinação, em relação aos tratamentos 0+EI, 2+EI e 3+EI, respectivamente.

5.2.2.2. Altura das plântulas

A altura das plântulas diminuiu quase linearmente com o aumento da dosagem de raios-gama em todos os tratamentos combinados. Isto é mostrado na Figura 8.

Nos casos do pós-tratamento com cisteína, observou-se um ligeiro aumento na altura das plântulas com tôdas as dosagens de raios-gama, comparando com os tratamentos só com raios-gama. Porém, êsse aumento foi significativo só com 20KR.

Quando comparados os tratamentos R+EI e R+C+EI, verificou-se que o efeito da cisteína foi significativo só com 20KR de raios-gama.

5.2.2.3. Sobrevivência

A maioria das plantas dos tratamentos 2+EI, 3+EI e 3+C+EI foram cultivadas na casa de vidro. No entanto, foi observado em tôdas as combinações que a sobrevivência diminuiu, de modo geral, com o aumento da dosagem de raios-gama. Isto pode ser observado na Figura 9.

Na comparação dos tratamentos 0 e 0+C, e 3 e 3+C, foi observada uma diferença positiva e significativa devida à presença da cisteína.

Quanto aos tratamentos R+EI e R+C+EI, a única diferença significativa foi observada entre os tratamentos 2+EI e 2+C+EI.

5.2.2.4. Fertilidade

Os resultados com relação à fertilidade são mostrados na Figura 10. A fertilidade das panículas R_1 em tôdas as combinações dimi-

nuiu mais ou menos linearmente com o aumento da dosagem de raios-gama.

A comparação da fertilidade entre os tratamentos R e R+C revelou que a cisteína aumentou significativamente a fertilidade com 10KR e 30KR, e diminuiu significativamente com 20KR.

Entre os tratamentos R+EI e R+C+EI, foi observado aumento significativo com 0KR e 20KR. Com 10KR, a fertilidade diminuiu significativamente devido ao tratamento intercalado com cisteína. Não houve diferença entre os tratamentos 3+EI e 3+C+EI.

5.2.2.5. Freqüência de mutação de clorofila

Na Figura 11 são mostrados os resultados da freqüência de mutação de clorofila.

Comparando-se os tratamentos R e R+C, verificou-se que houve ligeiro decréscimo na freqüência de mutação de clorofila com as dosagens 0KR, 10KR e 20KR, e ligeiro aumento com 30KR, devido ao pós-tratamento com cisteína. Entretanto, as diferenças não foram significativas.

A comparação entre os tratamentos R+EI e R+C+EI mostrou que, com 0KR, a freqüência de mutação de clorofila diminuiu significativamente após o tratamento com cisteína. Com 10KR e 20KR, a freqüência foi reduzida, porém essa redução não foi significativa. Com 30KR, a combinação de raios-gama, cisteína e EI apresentou 17,09 mutações de clorofila por 100 panículas germinadas, sendo a freqüência mais alta de tôdas as encontradas nos tratamentos do Exp.2. Todavia, devido ao número baixo das panículas germinadas (158 no total), o aumento não foi significativo quando comparado com o tratamento 3+EI.

5.2.3. Experimento 3

Os resultados obtidos na combinação fatorial dos tratamentos de raios-gama, cisteína e quatro concentrações de EMS são mostrados na Tabela 4 e nas Figuras 12, 13, 14 e 15. No rodapé dessas figuras são apresentados os resultados das análises estatísticas.

5.2.3.1. Germinação

A Figura 12 mostra os resultados da germinação. De um modo geral, ela diminuiu com o aumento da dosagem de raios-gama, e também com o aumento da concentração de EMS. Isto é observado mais claramente quando a concentração de EMS foi alta.

Comparando os tratamentos R e R+C, foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos 0 e 0+C, e 3 e 3+C. Em ambos os casos, a germinação diminuiu com o pós-tratamento com cisteína.

Na comparação dos tratamentos R+EMS_1 e R+C+EMS_1, foi mostrado que a cisteína não modificou a germinação, exceto no tratamento 1+C+EMS_1, onde a germinação diminuiu significativamente em relação ao tratamento 1+EMS_1.

Nos tratamentos R+EMS_2 e R+C+EMS_2, verificou-se que a cisteína recuperou a germinação em tôdas as dosagens de raios-gama, reduzindo o efeito letal da combinação dos dois mutagênicos.

Na comparação dos tratamentos R+EMS_3 e R+C+EMS_3 num lado, e R+EMS_4 e R+C+EMS_4 noutro lado, verificou-se que o tratamento com cisteína sempre aumentou a germinação com qualquer dosagem de raios-gama.

5.2.3.2. Altura das plântulas

De um modo geral, em tôdas as combinações, a altura das plântulas diminuiu com o aumento da dosagem ou concentração dos mutagênicos (Figura 13).

Quanto ao efeito do pós-tratamento com cisteína, foi notado que a altura das plântulas nos tratamentos 0+C e 3+C foi reduzida significativamente, em comparação com os tratamentos 0 e 3, respectivamente.

Foi observado, no entanto, um aumento sensível na altura das plântulas quando a cisteína foi aplicada entre os tratamentos com raios-gama e alta concentração de EMS. Quando a concentração de EMS foi de 1,5%, os tratamentos 0+C+EMS_3, 1+C+EMS_3 e 3+C+EMS_3 mostraram aumento significativo na altura das plântulas, em comparação com os tratamentos 0+EMS_3, 1+EMS_3 e 3+EMS_3, respectivamente. Quando a concentração de EMS foi de 2,0%, todos os tratamentos R+C+EMS_4 mostraram aumento significativo na altura das plântulas, comparando com os correspondentes tratamentos R+EMS_4.

5.2.3.3. Fertilidade

A fertilidade, no geral, diminuiu com o aumento da dosagem ou concentração dos mutagênicos. Na Figura 14 são mostrados os resultados com relação à fertilidade.

Verificou-se que, com o pós-tratamento de cisteína, a fer-

tilidade aumentou nas dosagens de 10KR e 30KR de raios-gama e diminuiu em 20KR.

Nos tratamentos R+C+EMS_1, a fertilidade aumentou significativamente em relação aos tratamentos R+EMS_1. Ao contrário, nas comparações dos tratamentos R+C+EMS_2 com R+EMS_2, e R+C+EMS_3 com R+EMS_3, o pós-tratamento com cisteína diminuiu a fertilidade, com exceção do tratamento 2+C+EMS_2 onde a fertilidade aumentou significativamente em relação ao tratamento 2+EMS_2. No tratamento 3+EMS_3, não foi observada uma única semente fértil. Porém, no tratamento 3+C+EMS_3, foi verificada a recuperação da fertilidade até 4,8% do contrôle.

Nos tratamentos R+C+EMS_4, foram obtidas sementes férteis apenas nos tratamentos 0+C+EMS_4 e 1+C+EMS_4, sendo que no tratamento 1+EMS_4 a letalidade foi completa.

5.2.3.4. Freqüência de mutação de clorofila

Na Figura 15 são mostrados os resultados em relação à freqüência de mutação de clorofila.

Nos tratamentos 2 e 2+C, e 3 e 3+C, o pós-tratamento com cisteína aumentou a freqüência de mutação de clorofila de 2,26 para 4,25, e de 5,14 para 7,04, respectivamente.

Com relação aos tratamentos R+EMS_1 e R+C+EMS_1, verificou-se que a aplicação de cisteína não alterou a freqüência de mutação de clorofila.

Em relação aos tratamentos R+EMS_2 e R+C+EMS_2, a cisteína contribuiu para o aumento da freqüência de mutação de 10,53 para 29,73. Nesta análise, foram excluidos os tratamentos 3+EMS_2 e 3+C+EMS_2 devido ao número bastante reduzido das panículas germinadas. No entanto, no tratamento 3+C+EMS_2, foi observada uma freqüência de mutação de clorofila de 75,00 por 100 panículas germinadas, sendo observadas 6 mutações de clorofila em apenas 8 panículas germinadas. Esta freqüência foi a mais alta de todos os experimentos realizados no presente trabalho.

Nas demais combinações de tratamentos com alta concentração de EMS, a comparação estatística não foi efetuada devido ao aumento da toxicidade e à conseqüente redução no número das panículas obtidas. No entanto, no tratamento 2+C+EMS_3, foi obtida a alta freqüência de 66,67 (2 mutações em 3 panículas germinadas), e no tratamento 0+EMS_4, 71,43 (5 mutações em 7 panículas germinadas).

5.2.4. Experimento 4

Os resultados obtidos na combinação fatorial de raios-gama, cisteína e quatro concentrações de DS são mostrados na Tabela 5 e nas Figuras 16, 17, 18 e 19. Nessas figuras, os resultados das análises estatísticas são mostrados conjuntamente.

5.2.4.1. Germinação

A Figura 16 mostra os resultados da germinação.

Na comparação dos tratamentos R e R+C, não foi observado efeito significativo do pós-tratamento com cisteína, exceto no tratamento 0+C onde a germinação diminuiu significativamente de 100,0 para 96,9.

Quando foram comparados os tratamentos $R+DS_1$ e $R+C+DS_1$, e $R+DS_2$ e $R+C+DS_2$, não foi constatada diferença significativa na germinação.

Na comparação dos tratamentos $R+DS_3$ e $R+C+DS_3$, foi observado um decréscimo significativo entre $0+DS_3$ e $0+C+DS_3$, e $1+DS_3$ e $1+C+DS_3$, devido ao tratamento com cisteína.

Quanto à comparação entre os tratamentos $R+DS_4$ e $R+C+DS_4$, foi observado também um decréscimo significativo devido ao tratamento com cisteína entre $0+DS_4$ e $0+C+DS_4$, $1+DS_4$ e $1+C+DS_4$, e $2+DS_4$ e $2+C+DS_4$.

5.2.4.2. Altura das plântulas

A Figura 17 mostra os resultados da altura das plântulas.

De um modo geral, a altura das plântulas nos tratamentos R+C foi maior do que nos tratamentos R. O aumento foi significativo quando as dosagens de raios-gama foram de 10KR e 20KR.

Na comparação dos tratamentos $R+DS_1$ e $R+C+DS_1$, verificou-se que o efeito da cisteína foi significativamente positivo nos tratamentos $1+C+DS_1$ e $2+C+DS_1$, e negativo no tratamento $0+C+DS_1$. No tratamento $3+C+DS_1$, o efeito do tratamento intercalado com cisteína causou redução na altura das plântulas, porém não significativamente.

No tratamento $0+C+DS_2$, a altura das plântulas diminuiu significativamente quando comparado com o tratamento $0+DS_2$. Nos demais tratamentos envolvendo DS_2, verificou-se que o tratamento com cisteína aumentou a altura das plântulas, independentemente da dosagem de raios-gama.

Nos tratamentos $R+C+DS_3$, foi observado que a cisteína redu

ziu a altura das plântulas com tôdas as dosagens de raios-gama, inclusive 0KR, em comparação com os tratamentos $R+DS_3$. Sòmente a diferença entre os tratamentos $2+DS_3$ e $2+C+DS_3$ não foi significativa.

Em relação aos tratamentos $R+DS_4$ e $R+C+DS_4$, verificou-se que a aplicação de cisteína diminuiu a altura das plântulas com tôdas as dosagens de raios-gama.

5.2.4.3. Fertilidade

Os resultados com relação à fertilidade são mostrados na Figura 18.

Em tôdas as combinações fatoriais de raios-gama, cisteína e quatro concentrações de DS, verificou-se que a fertilidade diminuiu significativamente com o aumento da dosagem de raios-gama.

Quando foram comparados os tratamentos R e R+C, verificou-se que o pós-tratamento com cisteína aumentou significativamente a fertilidade com tôdas as dosagens de raios-gama, com exceção do tratamento 0+C onde a fertilidade foi reduzida de 100,0 (contrôle) para 93,1.

Na comparação dos tratamentos R+DS e R+C+DS, não foi observado um efeito determinado de cisteína sôbre a fertilidade. Entretanto, quando a concentração de DS foi alta (0,7%), o tratamento com cisteína aumentou significativamente a fertilidade com 10KR, 20KR e 30KR.

5.2.4.4. Freqüência de mutação de clorofila

A Figura 19 mostra a freqüência de mutação de clorofila.

De modo geral, foram obtidos poucos sobreviventes neste experimento com DS, e como conseqüência foi observado um número diminuto das panículas germinadas, o que trouxe certas dificuldades na análise estatística dos dados obtidos.

Na comparação dos tratamentos R e R+C, nenhuma diferença significativa foi observada. Porém, a freqüência mais alta foi de 14,04 no tratamento 3.

Comparando os tratamentos $R+DS_1$ e $R+C+DS_1$, foi observado um efeito positivo e significativo sôbre a freqüência de mutação de clorofila; ùnicamente no tratamento $0+C+DS_1$. A freqüência mais alta foi de 13,33 no tratamento $3+C+DS_1$.

Quando a concentração de DS foi de 0,46% (DS_2), nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos $R+DS_2$ e $R+C+DS_2$.

A freqüência de mutação de clorofila mais alta foi de 11,33 por 100 panículas germinadas no tratamento $2+DS_2$.

Apesar de que entre os tratamentos $R+DS_3$ e $R+C+DS_3$ não tenha sido observada nenhuma diferença significativa, foi observada porém uma tendência da freqüência de mutação de clorofila diminuir devido ao tratamento intercalado de cisteína. No entanto, no tratamento $3+DS_3$ foi observada a freqüência de 15,15, a mais alta encontrada nos tratamentos com DS_3.

Na comparação dos tratamentos $R+DS_4$ e $R+C+DS_4$, verificou-se que a freqüência de mutação de clorofila aumentou de 5,65 ($2+DS_4$) para 15,84 ($2+C+DS_4$). A freqüência mais alta foi de 17,50 no tratamento $1+DS_4$ onde foram obtidas 7 mutações entre 40 panículas R_1 germinadas.

5.3. Médias ponderadas dos caracteres medidos em R_1 dos tratamentos com raios-gama

A Figura 20 e tabela anexa mostram as médias ponderadas da germinação, altura das plântulas, sobrevivência e fertilidade dos experimentos com raios-gama durante quatro anos. Sòmente a sobrevivência é representada pela média de dois experimentos (Exps. 1 e 2). Aparentemente, a germinação foi menos sensitiva e a fertilidade foi mais sensitiva para a irradiação com raios-gama.

5.4. Espectro de mutação de clorofila

A fim de verificar se a dosagem ou concentração dos mutagênicos, o ambiente e a combinação dos tratamentos influem no espectro de mutação de clorofila, foram feitas análises estatísticas das freqüências dos vários tipos de mutação de clorofila observados.

Inicialmente, as mutações de clorofila foram separadas em três classes: albina, viridis e outras. Porém, quando a freqüência esperada de, pelo menos, uma classe foi menor do que 5, as classes foram reunidas convenientemente.

A Tabela 6 mostra as freqüências observadas dos três tipos de mutação de clorofila e, ao mesmo tempo, as taxas de albina dos vários tratamentos.

5.4.1. Dosagens ou concentrações diferentes dos mutagênicos e espectro de mutação de clorofila

A Tabela 7 mostra os resultados das análises em relação às freqüências dos tipos de mutação de clorofila nos diversos tratamentos.

Verificou-se que, de um modo geral, as dosagens ou concentrações diferentes tanto nos tratamentos simples como nos tratamentos combinados, não modificaram as freqüências dos tipos albina, viridis e outras. Todavia, os tratamentos combinados 1+C+EO, 2+C+EO e 3+C+EO no Exp.1, os tratamentos $O+EMS_1$ e $O+EMS_2$ no Exp.3, e os pós-tratamentos com cisteína 1+C, 2+C e 3+C no Exp.4, alteraram significativamente as freqüências dos tipos de mutação de clorofila. Observou-se que, no entanto, a taxa de albina no tratamento 3+C+EO foi menor (0,3158) do que nos tratamentos 1+C+EO (0,6000) e 2+C+EO (0,6481). No Exp.4, notou-se que a freqüência do tipo viridis no tratamento 1+C foi menor (0,1818) do que nos outros pós-tratamentos com cisteína (0,2131 no tratamento 2+C e 0,3783 no tratamento 3+C), e que a freqüência do tipo outras no tratamento 3+C foi bem menor (0,0811) do que nos outros (0,3409 no tratamento 1+C e 0,1639 no tratamento 2+C). O espectro de mutação de clorofila foi, também, diferente entre os tratamentos $O+EMS_1$ e $O+EMS_2$. As taxas de albina dêsses dois tratamentos foram de 0,5282 e 0,2174, respectivamente.

5.4.2. Ambiente diferente e espectro de mutação de clorofila

Os tratamentos com raios-gama foram repetidos durante quatro anos seguidos. Os dados na Tabela 8 indicam que considerando-se dosagens determinadas, as freqüências dos tipos albina, viridis e outras não variaram em anos diferentes ($X^2 = 4,15^{ns}$ com 10KR, $X^2 = 2,20^{ns}$ com 20KR, $X^2 = 5,30^{ns}$ com 30KR). Os dados do Exp.4 em 1968 foram excluidos das análises individuais devido às baixas freqüências observadas e esperadas.

Reunindo-se os dados referentes a dosagens diferentes obtidos em um mesmo ano, verificou-se que não houve variação de ano para ano ($X^2 = 10,41^{ns}$), o que indica que o espectro de mutação não variou com o ambiente diferente característico dos anos envolvidos.

5.4.3. Mutagênicos químicos diferentes e espectro de mutação de clorofila

O efeito dos tratamentos com mutagênicos químicos diferentes sôbre o espectro de mutação de clorofila foi analisado, comparando-se com os efeitos dos tratamentos com raios-gama. Os resultados são mostrados na Tabela 9, e indicam que, individualmente, nenhum mutagênico químico usado modificou o espectro de mutação de clorofila em relação àquele obtido nos tratamentos com raios-gama ($X^2 = 2,08^{ns}$ com EO, $X^2 = 1,88^{ns}$ com EI, $X^2 = 2,02^{ns}$ com EMS, $X^2 = 0,09^{ns}$ com DS).

Reunindo-se os dados obtidos pelo efeito da radiação nos 4 experimentos e comparando com os dados obtidos do efeito dos mutagênicos químicos, verificou-se que não houve diferença nos espectros de mutação de clorofila ($X^2 = 7,89^{ns}$).

5.4.4. Pós-tratamentos com cisteína e espectro de mutação de clorofila

De acôrdo com os resultados apresentados na Tabela 10, os pós-tratamentos com cisteína, durante 45 horas e 30 horas não alteraram o espectro de mutação de clorofila em relação àquele obtido nos tratamentos com raios-gama ($X^2 = 0,10^{ns}$ e $X^2 = 0,45^{ns}$, respectivamente). Entretanto, o pós-tratamento com cisteína durante 24 horas deu origem à modificação significativa no espectro de mutação de clorofila. Nos tratamentos com raios-gama dos Exps. 3 e 4, as taxas de albina, viridis e outras foram de 0,5608, 0,1216 e 0,3176, e, nos pós-tratamentos com cisteína durante 24 horas, foram de 0,5789, 0,2074 e 0,2137, respectivamente. Portanto, concluiu-se que a diferença no espectro de mutação de clorofila entre os tratamentos com raios-gama e com cisteína durante 24 horas é devida à alteração das taxas de viridis e outras.

Entre os pós-tratamentos com cisteína durante 45 horas, 30 horas e 24 horas, não foi observada a diferença significativa no espectro de mutação de clorofila ($X^2 = 2,59^{ns}$).

5.4.5. Tratamentos combinados com raios-gama e mutagênico químico e espectro de mutação de clorofila

O espectro de mutação de clorofila dos tratamentos combinados de raios-gama e mutagênico químico foi comparado com o dos tratamentos com raios-gama. Os resultados mostrados na Tabela 11 indicam

que os tratamentos combinados não alteraram o espectro de mutação de clorofila em relação àqueles obtidos com raios-gama ($X^2 = 0,02^{ns}$ com R+EO, $X^2 = 2,52^{ns}$ com R+EI, $X^2 = 2,92^{ns}$ com R+EMS, $X^2 = 0,45^{ns}$ com R+DS).

Entre os tratamentos combinados, também não foi observada diferença significativa nos espectros de mutação ($X^2 = 7,08^{ns}$).

5.4.6. Tratamentos combinados com cisteína e mutagênico químico e espectro de mutação de clorofila

Quando a cisteína foi combinada com EO, foi observada uma modificação significativa no espectro de mutação de clorofila, em comparação com o tratamento com raios-gama ($X^2 = 4,83^{*}$, Tabela 12). As taxas de albina, viridis e outras foram de 0,6061, 0,1591 e 0,2348 no tratamento com raios-gama, e de 0,3333, 0,1667 e 0,5000 no tratamento combinado com cisteína e EO, respectivamente. As diferenças foram maiores nas taxas de albina e outras.

Nos demais tratamentos combinados com cisteína e mutagênico químico, não foi observada diferença significativa no espectro de mutação de clorofila em comparação com os tratamentos com raios-gama ($X^2 = 1,19^{ns}$ com C+EI, $X^2 = 3,21^{ns}$ com C+EMS, $X^2 = 0,98^{ns}$ com C+DS). Isto ocorreu, também, na comparação entre os tratamentos combinados com cisteína e mutagênico químico ($X^2 = 4,12^{ns}$).

5.4.7. Tratamentos combinados de raios-gama, cisteína e mutagênico químico, e espectro de mutação de clorofila

Quanto ao efeito da combinação de tratamentos com raios-gama, cisteína e mutagênico químico sôbre o espectro de mutação de clorofila, foi demonstrado que sòmente o tratamento combinado de raios-gama, cisteína e EMS modificou o espectro em relação àquele obtido com tratamentos com raios-gama ($X^2 = 11,39^{**}$). Isto é mostrado na Tabela 13.

Na comparação dos tratamentos combinados de raios-gama, cisteína e mutagênicos químicos, verificou-se que os espectros de mutação de clorofila foram diferentes ($X^2 = 19,81^{**}$). A Tabela 14 indica que esta diferença foi devida às freqüências diferentes dos tipos albina ($X^2 = 11,14^{*}$) e viridis ($X^2 = 17,32^{***}$). No tratamento combinado com raios-gama, cisteína e EMS, foram observadas as taxas de albina 0,4439, a mais baixa, e de viridis 0,2806, a mais alta dêsses tratamentos combinados.

5.5. Taxa de segregação

A fim de obter mais informações e de discutir alguns pontos sôbre ontogenia das sementes dormentes de arroz, foi calculada a taxa de segregação das panículas mutadas de cada tratamento. Teòricamente, a taxa de segregação de uma panícula varia de 0 (Não ocorreu nenhum mutante.) a 1 (Tôdas as plântulas foram mutantes.). Porém, a taxa, no caso, significa uma média de várias panículas mutadas. Esta taxa pode dar idéia sôbre o tamanho do setor mutado do primórdio no embrião das sementes tratadas. Os resultados gerais são mostrados na Tabela 15, onde também são apresentados os dados observados sôbre fertilidade em cada tratamento.

5.5.1. Dosagens ou concentrações diferentes dos mutagênicos e taxa de segregação

Como se vê na Tabela 15, foi observada uma tendência geral da taxa de segregação aumentar com o aumento da dosagem ou concentração dos mutagênicos em todos os tratamentos, contrariando a fertilidade que diminuiu à medida que aumentou a dosagem ou concentração dos mutagênicos.

5.5.2. Ambiente diferente e taxa de segregação

Os tratamentos com raios-gama foram repetidos durante quatro anos seguidos. Além disso, foram repetidos, em 1967 e 1968, o pós-tratamento com cisteína durante 24 horas. Os resultados da comparação da taxa de segregação dêsses tratamentos são mostrados na Tabela 16. Os dados do ano 1968 foram excluidos desta tabela devido ao baixo número das panículas segregadas obtidas.

Aparentemente, o ambiente influiu na taxa de segregação obtida em cada dosagem de raios-gama durante três anos, e também na média dos tratamentos num ano determinado. No entanto, a média do tratamento 2 durante três anos foi significativamente maior do que a do tratamento 1, e a média do tratamento 3 durante três anos não foi diferente do que a do tratamento 2.

A comparação de dois pós-tratamentos com cisteína durante 24 horas, em anos diferentes revelou que o ambiente influiu, também, na taxa de segregação, exceto o tratamento 3+C onde não foi observada diferença significativa entre os dois anos. A taxa média de segregação

dos tratamentos aumentou com o aumento da dosagem de raios-gama.

5.5.3. Pós-tratamento com cisteína e taxa de segregação

Na Tabela 17 é mostrada a comparação da taxa de segregação entre os três pós-tratamentos com cisteína em diferentes tempos de tratamento, sem levar em conta a diferença ambiental durante quatro .

De acôrdo com os resultados apresentados, o pós-tratamento durante 45 horas mostrou, em média, a maior taxa de segregação, indicando que cisteína aplicada durante 45 horas pode tornar-se mutagênica.

5.5.4. Tratamento intercalado com cisteína e taxa de segregação

Na Tabela 18, são mostradas as taxas médias de segregação dos tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e mutagênico químico, comparadas com as dos tratamentos combinados com raios-gama e mutagênico químico.

A taxa de segregação diminuiu nos tratamentos O+C+EO, O+C+EMS_1 e O+C+DS_2, porém aumentou nos tratamentos combinados O+C+EI e O+C+EMS_2, quando comparada com a do respectivo tratamento no qual se usou apenas mutagênico químico.

Quando combinados raios-gama, cisteína e mutagênico químico, a aplicação de cisteína entre a radiação e mutagênico químico sempre resultou na redução da taxa média de segregação, independentemente do tempo de tratamento com cisteína.

6. Discussão

6.1. Efeito da dosagem ou concentração dos mutagênicos sôbre os caracteres em R_1 e a freqüência de mutação de clorofila

Nos tratamentos com raios-gama foi observado que, de um modo geral, com o aumento da dosagem, todos os caracteres medidos em R_1 diminuiram e a freqüência de mutação de clorofila aumentou. Isto pode ser observado claramente quando as médias ponderadas dos quatro experimentos com raios-gama foram calculadas sôbre vários caracteres em R_1 (Figura 20 e tabela anexa). De acôrdo com as médias ponderadas, a germinação apresentou-se, aparentemente, menos sensitiva à irradiação com raios-gama, concordando com a observação feita por TAVČAR (1965) de que o teste de germinação não é apropriado para testar a radiosensitividade das sementes. Por outro lado, a altura das plântulas e a sobrevivência mostraram-se como características mais sensitivas à irradiação do que a germinação. Todavia, a característica mais sensitiva foi a fertilidade que diminuiu linearmente com o aumento da dosagem de raios-gama.

Os mutagênicos químicos EO e EI foram aplicados com uma única concentração, isto é, 0,15% para EO e 0,05% para EI. As freqüências de mutação de clorofila observadas nos tratamentos O+EO e O+EI foram de 4,16 e 6,71 por 100 panículas R_1, respectivamente. Conforme a curva da freqüência média de mutação de clorofila dos tratamentos com raios-gama, mostrada na Figura 21, as freqüências de 4,16 e 6,71 correspondem, respectivamente, às dosagens de 8-9KR e 20-21KR de raios-gama. Pode-se concluir, portanto, que o efeito de EO (0,15% por 10 horas) e EI (0,05% por 10 horas) na indução de mutação de clorofila equivale às dosagens de 8-9KR e 20-21KR de raios-gama, respectivamente.

Nos tratamentos com várias concentrações de EMS foi também observado que a germinação e altura das plântulas diminuiram, de um modo geral, com o aumento da concentração do mutagênico químico. No entanto, a fertilidade não mostrou esta tendência, e uma queda brusca foi observada entre as concentrações de 1,50% e 2,00%, isto é, a fertilidade caiu de 48,7% para 2,3% do contrôle. Isto indica que, para a fertilidade, deve existir entre as concentrações de 1,50% e 2,00% um ponto crítico de tolerância à toxicidade de EMS. Por outro lado, todos os tratamentos com EMS mostraram altas freqüências de mutação de clorofi-

la, sendo a mais alta de 71,43 por 100 panículas R_1 (5 mutações de clorofila entre 7 panículas germinadas) e a mais baixa de 20,35 (25 mutações entre 113 panículas R_1). Não foi observado, entretanto, aumento da freqüência de mutação de clorofila com o aumento da concentração do EMS. Isto contraria os resultados obtidos por vários outros pesquisadores que indicaram que a freqüência de mutação aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração dos mutagênicos químicos. Isto pode ser, em parte, devido a êrro da amostragem em conseqüência da redução do número de plantas sobreviventes nos tratamentos com concentrações altas (apenas 21 sobreviventes na concentração 1,50%, e 3 na concentração 2,00% de EMS, por ocasião da colheita). Todavia, o EMS apresentou-se como o mutagênico mais eficiente de todos os que foram usados neste trabalho.

Nos tratamentos com DS, não foi possível observar uma relação determinada entre concentração e sensitividade das sementes em função dos caracteres em R_1 e R_2. A freqüência de mutação de clorofila mais alta foi de 3,28 por 100 panículas R_1 no tratamento com 0,46% de DS durante 3 horas, sendo equivalente a 6-7KR de raios-gama conforme a Figura 21.

O DS é um composto químico pouco solúvel, e, além disso, a sua solução apresenta-se muito instável (NILAN, KONZAK, HEINER e FROESE-GERTZEN,1963). Tratando-se as sementes sêcas de arroz (6% de conteúdo de água) com solução saturada de DS à temperatura de 30°C durante 4 horas, SATO (1966) obteve cêrca de 7 mutações de clorofila em 100 panículas R_1. Apesar do ponto de saturação de DS à temperatura de 25°C ser desconhecido, a concentração de 0,70% foi considerada por nós quase saturada pela dificuldade de dissolução encontrada na ocasião do preparo desta solução. Com esta solução, no entanto, foram obtidas 3 mutações de clorofila por 100 panículas R_1. A diferença entre êstes dois dados é, provàvelmente, devida às temperaturas diferentes, e também aos conteúdos diferentes de água nas sementes. Em todos os tratamentos com DS, foi observada alta fertilidade das panículas R_1 (no máximo 100,0% e no mínimo 91,4% de contrôle). De um modo geral, os mutagênicos químicos eficientes provocam alta esterilidade, e, ao mesmo tempo, alta freqüência de mutação (EHRENBERG et al., 1966). Portanto, com o aumento da solubilidade do DS, espera-se poder aumentar a freqüência de mutação.

6.2. Efeito do pós-tratamento com cisteína

Tem sido demonstrado por vários pesquisadores em diversos organismos irradiados, que os protetores químicos possuem sua ação protetora sòmente em pré-tratamento, e não em pós-tratamento. Por outro lado, a radiosensitividade das sementes embebidas com água é, de um modo geral, bem maior que a das sementes sêcas (NYBOM, GUSTAFSSON e EHRENBERG, 1952; EHRENBERG e NYBOM, 1954). A irradiação das sementes embebidas em água resulta em danos fisiológicos maiores do que a irradiação das sementes sêcas. Portanto, é aconselhável usar as sementes sêcas para a indução de mutação, possibilitando assim a obtenção da maior freqüência de mutação (STADLER, 1930).

Baseando-se nos trabalhos de ZIMMER et al. (1957) e CONGER e RANDOLPH (1959), YAMAGUCHI (1962a, 1962b) mostrou que o pós-tratamento com cisteína em sementes sêcas de arroz causou a recuperação na altura das plântulas e na fertilidade. Segundo êste autor, os radicais livres nos embriões irradiados (1) reagem com as moléculas de importância biológica ("target molecular"), causando mutações ou danos fisiológicos nas sementes irradiadas, ou (2) reagem com as outras substâncias de menor importância como H_2O, -SH, etc., tornando-se inativos, ou (3) reagem com oxigênio, formando peróxidos prejudiciais.

No presente trabalho, foi feito o pós-tratamento com cisteína a fim de reduzir os danos fisiológicos nas sementes irradiadas, sendo o tempo de tratamento variável: 45 horas no Exp.1, 30 horas no Exp.2, e 24 horas nos Exps. 3 e 4. Entretanto, os resultados dêsses pós-tratamentos (Ver as Tabelas 2, 3, 4 e 5) apresentam certa dificuldade de interpretação. Portanto, o efeito de pós-tratamento foi estimado pelo teste de sinal ("sign test").

De acôrdo com os resultados mostrados na Tabela 19, foi verificado que o pós-tratamento com cisteína durante 45 horas foi prejudicial para as sementes tanto irradiadas como não irradiadas. No entanto, o pós-tratamento durante 30 horas mostrou efeito protetor ou estimulante para as sementes tanto irradiadas como não irradiadas. O pós-tratamento durante 24 horas não mostrou efeito significativo.

A Figura 21 e tabela anexa apresentam o efeito de pós-tratamento com cisteína sôbre a freqüência de mutação de clorofila. Os dados dos tratamentos R e R+C (C..24 hrs.) são as médias dos Exps. 1, 2, 3 e 4, e dos Exps. 3 e 4, respectivamente. Os resultados mostram que

o pós-tratamento com cisteína durante 45 horas aumentou significativamente a freqüência de mutação de clorofila nos tratamentos 0+C, 1+C e 2+C quando comparada com a dos tratamentos 0, 1 e 2, respectivamente.

Em relação aos dados apresentados na Figura 21, foi feita uma análise da variância com aplicação de regressão quadrática a fim de comparar as linhas de regressão de pós-tratamentos com cisteína (R+C) com a linha de regressão de tratamento com sòmente raios-gama (R). Os resultados são mostrados na Tabela 20.

Êsses resultados levam-nos a crer que a cisteína, mesmo não tendo efeito mutagênico em si, pode tornar-se tóxica ou mutagênica quando o material fôr tratado por longo tempo à temperatura relativamente alta. Êste efeito mutagênico pode ser devido à decomposição química de cisteína, não estando porém esclarecido o mecanismo desta decomposição. O tratamento com cisteína durante 30 horas teve maior efeito protetor na germinação, na altura das plântulas, na sobrevivência e na fertilidade, do que os tratamentos durante 45 horas e 24 horas, e foi sòmente no tratamento 2+C que observou-se um aumento significativo da freqüência de mutação de clorofila. O tratamento durante 24 horas não mostrou efeito significativo sôbre os caracteres em R_1 nem sôbre a freqüência de mutação de clorofila.

6.3. Efeito da combinação de tratamentos com raios-gama e mutagênico químico

Vários pesquisadores já relataram que o efeito aditivo sôbre alguns caracteres em R_1 e R_2 foi observado em alguns casos e em outros não, quando radiações ionizantes foram combinadas com mutagênicos químicos. Esta divergência sugere que o efeito da combinação de tratamentos com mutagênicos depende da condição de tratamento.

No presente trabalho, foi observado o efeito da combinação de raios-gama com EO ou EI ou EMS ou DS sôbre a germinação, altura das plântulas, sobrevivência, fertilidade e freqüência de mutação de clorofila. Porém, os resultados mostrados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5 apresentam certa dificuldade de interpretação. Portanto, uma tentativa de avaliar êste efeito da combinação de tratamentos foi feita, reorganizando as tabelas da seguinte maneira:

(1) Os índices da altura e da fertilidade dos tratamentos combinados foram comparados com o do contrôle (=100,0) de cada experimento. Assim sendo, a diferença observada foi calculada em cada tratamento combinado.

(2) A diferença esperada foi calculada pela soma dos efeitos dos dois tratamentos componentes, assumindo o efeito aditivo. Por exemplo, na Tabela 2, as reduções na altura das plântulas nos tratamentos combinados 0+EO, 1+EO e 2+EO foram de 51,3%, 50,3% e 78,3%, respectivamente, em relação ao contrôle. Como as reduções nos tratamentos 1, 2 e 3 foram de 7,6%, 30,8% e 48,8%, respectivamente, em relação ao contrôle, os efeitos esperados da combinação de tratamentos 1+EO e 2+EO foram de -58,9% (= -7,6% - 51,3%) e -82,1% (= -30,8% - 51,3%), respectivamente, em relação ao contrôle. No tratamento 3+EO, não foi observada nenhuma planta, porém foi calculado o índice esperado -100,1% (= - 48,8% - 51,3%). Foram excluidas dêsses cálculos a germinação e sobrevivência uma vez que a primeira é menos snnsitiva à irradiação e a segunda não foi observada nos Exps. 3 e 4.

O efeito da combinação de raios-gama com mutagênico químico, com relação à freqüência de mutação de clorofila foi estimado pelo mesmo princípio já mencionado acima. Por exemplo, as freqüências observadas de mutação de clorofila dos tratamentos 1, 2, 0+EO, 1+EO e 2+EO foram de 4,97, 5,43, 4,16, 6,23 e 9,06 por 100 panículas R_1, respectivamente (Tabela 2). As freqüências esperadas de mutação de clorofila dos tratamentos 1+EO e 2+EO foram de 9,13 (= 4,97 + 4,16) e 9,59 (= 5,43 + 4,16) por 100 panículas R_1, respectivamente, supondo o efeito aditivo. Apesar de não ter sido observada nenhuma planta sobrevivente no tratamento 3+EO, a freqüência esperada foi de 12,66 (= 8,50 + 4,16).

Após a reorganização das tabelas, foi feito o cálculo do coeficiente de determinação baseado no modêlo aditivo. Os resultados são mostrados nas Tabelas 21 e 22. Na Tabela 22, foram considerados só os tratamentos com mais de 50 panículas R_1 germinadas.

De acôrdo com os resultados apresentados, na altura das plântulas, os tratamentos combinados R+EI, R+EMS_1, R+EMS_2, R+EMS_3, R+EMS_4 e R+DS_2 mostraram boa concordância com o modêlo aditivo. Nota-se no entanto, que, nos tratamentos combinados R+EO e R+DS_4 onde foi observada baixa adaptabilidade para o modêlo, a tendência geral é diminuir o efeito da combinação, isto é, o efeito da combinação observada foi maior do que o efeito esperado. Nos demais tratamentos combinados R+DS_1 e R+DS_3 onde também foi observada baixa adaptabilidade para o modêlo, foi mostrada uma tendência geral para aumentar o efeito da combinação, isto é, o efeito observado foi menor do que o efeito esperado. No entan

to, as análises feitas conjuntamente nos tratamentos R+EMS e R+DS mostraram adaptação significativa para o modêlo aditivo, com os coeficientes de determinação 0,928 e 0,787, respectivamente, indicando que os tratamentos combinados R+EMS mostraram maior adaptabilidade para o modêlo do que os tratamentos combinados R+DS.

Na fertilidade, foi observado, de um modo geral, uma boa concordância com o modêlo aditivo, indicando que o efeito da combinação de raios-gama com mutagênico químico é a soma dos efeitos de dois tratamentos componentes. Sòmente no tratamento R+DS_1, foi observada baixa adaptabilidade para o modêlo aditivo, sendo que os efeitos observados tenderam a ser maiores que os esperados.

Quanto à freqüência de mutação de clorofila, foi observada adaptabilidade significativa nos tratamentos combinados R+EO e R+EI. O coeficiente de determinação do conjunto dos tratamentos combinados R+EMS foi também significativo, apesar de ter sido mostrado que os efeitos observados foram sempre menores que os efeitos esperados. Todos os tratamentos combinados de raios-gama com DS apresentaram baixa adaptabilidade para o modêlo aditivo. Isto foi, possìvelmente, causado pela instabilidade do DS como mutagênico químico.

6.4. Efeito da combinação de tratamentos com raios-gama, cisteína e mutagênico químico

A fim de esclarecer o efeito de cisteína quando esta foi aplicada entre raios-gama e mutagênico químico, foi feita a Tabela 23 na qual foram apresentadas as diferenças entre os efeitos observados dos tratamentos combinados R+C+MQ e R+MQ. Por exemplo, na altura das plântulas da Tabela 2, os efeitos dos tratamentos combinados 2+C+EO e 2+EO foram de -59,0% e -78,3% em relação ao contrôle, respectivamente. O efeito da cisteína neste tratamento foi, portanto, de +19,3% (= -59,0% - (-78,3%)), em relação ao contrôle. Êste índice significa que o tratamento intercalado com cisteína recuperou 19,3%, em relação ao contrôle, na altura das plântulas em comparação com o tratamento combinado 2+EO, causando o efeito positivo. A comparação da germinação e sobrevivência não foi realizada nesta tabela, porque a primeira foi menos sensitiva aos mutagênicos e a segunda não foi observada nos Exps. 3 e 4. Sòmente os tratamentos com mais de 50 panículas R_1 germinadas foram considerados na comparação de freqüência de mutação de clorofila. A Tabe

la 23 mostra os resultados nas comparações entre os tratamentos R+C+MQ e R+MQ sôbre altura das plântulas, fertilidade e freqüência de mutação de clorofila.

6.4.1. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+EO

O pós-tratamento com cisteína durante 45 horas já foi demonstrado ser prejudicial. Portanto, o tratamento combinado O+C+EO causou, como foi esperado, maior efeito prejudicial na germinação e sobrevivência do que o tratamento O+EO (Tabela 2). O tratamento O+C+EO resultou, ao mesmo tempo, na redução da freqüência de mutação de clorofila, quando comparado com o tratamento O+EO. Isto pode ser explicado pela redução ao número de sobreviventes, e, conseqüentemente, no tamanho da progênie dêste tratamento. Neste tratamento combinado O+C+EO, entretanto, a cisteína causou uma interação positiva com EO na altura das plântulas, quando comparado com o tratamento O+EO. A causa dessa interação é desconhecida. Porém, isto pode sugerir que o mecanismo da interação de cisteína com EO na altura das plântulas é diferente do que ocorre com a germinação e sobrevivência. O tratamento intercalado de cisteína entre dosagens altas (20KR e 30KR) de raios-gama e EO causou efeito positivo em todos os caracteres medidos em R_1, quando comparado com os correspondentes tratamentos sem cisteína. O pós-tratamento com cisteína durante 45 horas não apresentou efeito protetor, mas um efeito prejudicial nos caracteres em R_1 (Tabela 19). A causa da interação positiva apresentada por cisteína em todos os caracteres medidos em R_1 nos tratamentos 2+C+EO e 3+C+EO, é desconhecida.

Esperava-se maior freqüência de mutação de clorofila no tratamento combinado 3+EO. Êste tratamento, contudo, foi muito drástico, causando a morte de tôdas as sementes, e, conseqüentemente, tornou-se impossível observar mutações de clorofila em R_2. Todavia, a aplicação de cisteína entre 30KR de raios-gama e EO, recuperou, sensìvelmente, o poder germinativo (16,6% em relação ao contrôle), e a sobrevivência (19,7% em relação ao contrôle), causando o aparecimento de 15,20 mutações de clorofila por 100 panículas R_1, a mais alta de todos os tratamentos combinados de raios-gama, cisteína e EO. Isto foi observado com interêsse especial apesar de não ter sido encontrada uma explicação razoável.

6.4.2. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+EI

Foi mostrado que o pós-tratamento com cisteína durante 30 horas foi mais protetor do que os pós-tratamentos durante 24 horas e 45 horas. Na comparação dos efeitos de tratamentos O+EI e O+C+EI, a interação de cisteína com EO causou aumento significativo na fertilidade e também redução significativa na freqüência de mutação de clorofila. Essa redução, entretanto, não foi causada, aparentemente, pela redução no número de sobreviventes ou na fertilidade. A interação de cisteína com EO motivou, possìvelmente, a recuperação tanto da aberração cromossômica que causou posterior esterilidade como de mutação gênica que ocasionou deficiência de clorofila. Porém, o mecanismo dessa interação com cisteína não é conhecido.

No tratamento 3+C+EI, foram observadas 17,09 mutações de clorofila por 100 panículas R_1, sendo a mais alta de todos os tratamentos combinados de raios-gama, cisteína e EI. Uma parte dêste aumento é, possìvelmente, devido ao aumento no número dos sobreviventes neste tratamento (55,4% em relação ao contrôle), comparando com o do tratamento 3+EI (48,7% em relação ao contrôle) onde esperava-se a maior freqüência de mutação de clorofila. Entretanto, o mecanismo da interação de cisteína com os mutagênicos quando aplicada entre êles, é desconhecida.

6.4.3. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+EMS

O pós-tratamento com cisteína durante 24 horas não mostrou efeito protetor nem prejudicial para as sementes irradiadas. No entanto, quando esta foi combinada com a radiação e EMS, observaram-se algumas interações interessantes. Com baixa concentração de EMS (0,5%), a interação de cisteína foi positiva, na comparação dos efeitos dos tratamentos R+C+EMS$_1$ e R+EMS$_1$, aumentando, de modo geral, a altura das plântulas e fertilidade. A cisteína, possìvelmente reduziu o efeito tóxico do EMS. Quando a concentração de EMS foi alta (1,5% e 2,0%), o tratamento intercalado com cisteína interferiu favoràvelmente na altura das plântulas, porém desfavoràvelmente na fertilidade, nos tratamentos envolvendo raios-gama e EMS. Isto sugere que o mecanismo da interação de cisteína com EMS (1,5% e 2,0%) na altura das plântulas é diferente do que o na fertilidade.

Quanto à freqüência de mutação de clorofila, o efeito da

cisteína na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EMS foi observado só quando a concentração de EMS foi de 0,5%. Com esta concentração de EMS, a comparação entre os tratamentos $R+C+EMS_1$ e $R+EMS_1$ não mostrou diferença significativa sôbre a freqüência de mutação de clorofila.

6.4.4. Efeito de cisteína nos tratamentos R+C+DS

Quando a cisteína foi combinada com o DS, sem irradiação, o efeito foi sempre negativo na altura das plântulas e na fertilidade, em relação aos tratamentos sòmente com DS. Em outras palavras, a interação de cisteína com DS foi sempre negativa, independentemente da concentração de DS, apesar de que o tratamento com cisteína durante 24 horas não mostrou efeito tóxico.

Quando a concentração de DS foi alta (0,5% e 0,7%), a combinação intercalada de cisteína com mutagênicos teve efeito negativo sôbre a altura das plântulas em todos os tratamentos combinados. Quanto à fertilidade, entretanto, o efeito do tratamento intercalado com cisteína foi no sentido de diminuir o efeito de dois mutagênicos combinados dos tratamentos $R+DS_3$, e aumentar o efeito dos tratamentos $R+DS_4$.

Quanto à freqüência de mutação de clorofila, a combinação de cisteína com DS tendeu a aumentá-la em comparação com os tratamentos sòmente com DS. Quando a concentração de DS foi a mais alta (0,7%), a interação de cisteína com DS foi positiva.

Estes fatos levam a crer que os mecanismos da influência de cisteína, nos tratamentos R+C+DS, sôbre a altura das plântulas, fertilidade e freqüência de mutação de clorofila são diferentes.

6.5. Espectro de mutação de clorofila

Já em 1927, COLLINS relatou que algumas plantas albinas de cevada mantiveram a côr branca abaixo de 8°C, porém elas voltaram ao verde normal acima de 18°C. O mesmo fenômeno, isto é, a mudança da côr das plantas pela temperatura do ambiente, foi relatado por vários pesquisadores em vários mutantes de clorofila de diversas espécies (SUNESON e STEVENS, 1953; NYBOM, 1955; FUJII, 1955; HÄNSEL, 1960). Por outro lado, HOLM (1954) e VON WETTSTEIN (1960) indicaram que a mudança da temperatura e, também da luminosidade pode alterar a expressão fenotípica das plantas deficientes em clorofila, resultando na alteração do espectro de mutação de clorofila.

No presente trabalho, entretanto, a análise estatística, mostrada na Tabela 8, indica que as diferenças da temperatura e da luz solar durante três anos de experimento não afetou o espectro de mutação de clorofila dos tratamentos com raios-gama.

Segundo EHRENBERG et al. (1961), os mutagênicos químicos tais como EO, EI e EMS, aumentam, em geral, as freqüências dos tipos viridis e outras, e conseqüentemente, baixam a taxa do tipo albina, em comparação com os resultados dos tratamentos com radiação ionizante. Em nossos experimentos, como mostrado na Tabela 24, ùnicamente o tratamento com EMS aumentou as freqüências dos tipos viridis e outras, em relação ao tratamento com raios-gama. Nessa tabela, a maioria das mutações de clorofila induzidas por mutagênicos foram do tipo albina, com a única exceção do tratamento com DS, onde foram observadas 45,2% do tipo albina e 38,7% do tipo outras. Apesar de terem sido observadas algumas alterações nas freqüências de cada tipo de mutação de clorofila, a análise estatística mostrou não existir diferença significativa entre as freqüências observadas dos três tipos de mutação nos tratamentos com cinco mutagênicos, inclusive raios-gama (Tabela 9). Os tratamentos com EO e DS resultaram apenas em 32 e 31 mutações de clorofila, respectivamente; mais dados são portanto necessários para uma conclusão mais segura.

A taxa de albina em cevada irradiada com raios-X foi de 40 a 50% (GUSTAFSSON, 1940) e de 36% (EHRENBERG et al., 1961). A mesma nos tratamentos com raios-X foi de 43%, 28% e 75% em Triticum monococcum, Avena strigosa e Avena brevis, respectivamente (FRÖIER, 1946). Em arroz foram observadas as seguintes taxas de albina nos tratamentos com raios-X ou raios-gama: 43% (MATSUO et al., 1958), 50,5% (SATO, 1966) e 28% (SIDDIQ e SWAMINATHAN, 1968). A taxa média de albina com a irradiação de raios-gama no presente trabalho foi de 55,6%, mais alta do que as citadas acima. Entretanto, como EHRENBERG, GUSTAFSSON e VON WETTSTEIN (1956) observaram taxas diferentes de albina em variedades diferentes de cevada, esta diferença poderá ser devida às variedades diferentes de arroz, usadas nos experimentos mencionados.

O cálculo da homogeneidade entre os tipos de mutação de clorofila dos tratamentos combinados de R+C+EO, R+C+EI, R+C+EMS e R+C+DS mostrou significância quanto às taxas de albina e viridis. Na combinação de tratamentos R+C+EMS esta taxa foi de 44,4%, a mais baixa de tôdas, enquanto que a taxa de viridis foi de 28,1%, a mais alta de tôdas.

A alteração do espectro de mutação de clorofila é, portanto, principalmente devida à mudança de taxas de albina e viridis do tratamento combinado R+C+EMS (Tabela 14).

6.6. Alguns aspectos da ontogenia da semente de arroz

No embrião das sementes, já existem, de modo geral, várias células iniciais que vão formar, posteriormente, a planta. Quando ocorrem mutações nessas células iniciais, elas podem sofrer, durante o desenvolvimento das sementes, seleção intrasomática (KAPLAN, 1951) ou seleção diplóntica (GAUL, 1957), e também a eliminação gamética ou seleção haplóntica (GAUL, 1957) após a meiose, como já foi mostrado em milho (STADLER e ROMAN, 1956) e em cevada (MOH e NILAN, 1956). No entanto, supondo que não ocorram essas seleções durante todo o ciclo da planta, e supondo que uma inflorescência se desenvolve de uma única célula inicial, a taxa de segregação em R_2 desta inflorescência é, teòricamente, 0,25, após a ocorrência de uma mutação recessiva nesta célula. Se ocorrer uma mutação recessiva em duas células iniciais que formam posteriormente uma panícula, a taxa de segregação será de 1/8 = 0,125. A Tabela 25 mostra a relação entre o número das células iniciais e a taxa de segregação quando ocorre uma mutação recessiva numa das células iniciais.

Se ocorrem seleções entre as células (diplóides e haplóides) mutadas e não mutadas, a taxa de segregação diminui em conseqüência da eliminação das células mutadas. Segundo GAUL (1959), entretanto, o embrião da semente de cevada já possui cinco aglomerados de células iniciais que posteriormente vão formar as cinco espigas primárias diferentes, e êsses cinco aglomerados das células iniciais já estão bem diferenciados. Portanto, as outras células normais adjacentes não podem substituí-las quando o tratamento com mutagênico prejudicou ou destruiu as células iniciais diferenciadas. Conseqüentemente, não vai haver seleções entre as células afetadas e não afetadas durante a formação da espiga. Acredita-se que isto ocorre também nas sementes de arroz.

Considerando só os tratamentos com mais de 10 panículas segregadas, tôdas as taxas de segregação dêsses tratamentos na Tabela 15 foram estatìsticamente menores do que 0,25. Isto significa que as panículas segregadas foram verdadeiras quimeras, isto é, já existiam várias células iniciais no embrião quando as sementes foram tratadas.

O número suposto das células iniciais sobreviventes no embrião tratado foi estimado pela seguinte relação:

$$\frac{\text{Taxa de segregação esperada}}{\text{Taxa de segregação observada}}$$

A Tabela 26 mostra os resultados obtidos. À medida que aumentam as dosagens ou concentrações dos mutagênicos, aumenta também a probabilidade de ocorrerem danos letais (principalmente por aberrações cromossômicas inviáveis) nas células mutadas que, no caso, não podem ser substituidas. Em conseqüência disto, a taxa de segregação aumenta e, ao contrário, o número das células iniciais sobreviventes diminui.

O número médio das células iniciais sobreviventes no embrião de sementes de arroz, tratadas com raios-gama, foi estimado a partir dos três experimentos mostrados na Tabela 16. Os resultados mostram uma certa coincidência com os resultados obtidos por YAMAGUCHI (1962c), como são mostrados abaixo:

	10KR	20KR	30KR
YAMAGUCHI (1962)	2,3	1,8	1,7
Presente trabalho	2,4	1,6	1,7

Se o aglomerado de células que vai formar a primeira inflorescência fôr mais diferenciado que os outros, êste deverá ter maior número de células iniciais. Conseqüentemente, a taxa de segregação da primeira inflorescência deverá ser menor que as outras. A fim de esclarecer êste ponto, foi feito o teste não paramétrico de Friedman, com base na hipótese de que a ordem da formação das panículas coincide com a ordem do florescimento. A Tabela 27 apresenta os resultados obtidos. Nesta tabela, as taxas de segregação das três primeiras panículas colhidas pela ordem do florescimento foram classificadas de 1 (a maior) a 3 (a menor), conforme o tamanho do setor mutado. Os dados do Exp.1 foram excluídos, porque tôdas as panículas colhidas pela ordem do florescimento foram semeadas misturadas, sem serem classificadas. Só os tratamentos com mais de 10 panículas segregadas foram considerados na Tabela 27. O resultado do teste indica que a taxa de segregação das panículas que floresceram primeiramente foi significativamente menor das outras duas, e isto sugere que a primeira panícula se origina do aglomerado com maior número das células diferenciadas.

Quanto maior o número das células iniciais que, posteriormente, vão formar uma panícula, maior a freqüência de mutação, baseada no número das panículas R_1, isto se o tratamento mutagênico em arroz não afeta a viabilidade das células iniciais. Na Tabela 28 são mostradas as freqüências de mutação de clorofila e a classificação dessas em função da ordem do florescimento. Só os tratamentos com mais de 50 panículas germinadas em cada classe foram considerados, e os dados do Exp.1 foram excluídos, também neste caso. O resultado do teste não paramétrico de Friedman indica que, na realidade, as panículas primeiramente florescidas têm a maior freqüência de mutação de clorofila baseada no número das panículas R_1.

No aglomerado de células iniciais, podem ocorrer aberrações cromossômicas, independentemente de mutação gênica, quando as sementes forem tratadas com mutagênicos. Se ocorrer uma aberração cromossômica numa mesma célula na qual já ocorreu uma mutação gênica, e se esta aberração causa, posteriormente, a morte da célula ou esterilidade, esta mutação é perdida. Se a aberração cromossômica, entretanto, ocorre nas outras células iniciais não mutadas, a taxa de segregação, e também a freqüência de mutação deverão aumentar com o aumento da esterilidade. Por outro lado, com o aumento da dosagem dos mutagênicos, aumenta a probabilidade de ocorrerem aberrações cromossômicas na mesma célula inicial já mutada. Conseqüentemente, a freqüência de mutação baseada no número das panículas R_1 deixa de aumentar, e pode ser observado o efeito de saturação na freqüência de mutação quando as dosagens dos mutagênicos são altas. Êste efeito de saturação foi relatado por vários pesquisadores, e pode ser observado também na Figura 21. As Figuras 22 e 23 mostram regressões e correlações entre fertilidade e taxa de segregação, e entre fertilidade e freqüência de mutação de clorofila, respectivamente. Na Figura 22 foi observada uma correlação de $r = -0,7575$, e na Figura 23, $r = -0,5978$, ambas com alta significância, indicando que a aberração cromossômica, que causa esterilidade tem tendência de ocorrer independentemente da mutação de clorofila, dentro do limite da dosagem ou concentração dos mutagênicos usados. Nessas figuras, só os tratamentos com mais de 10 panículas segregadas (Figura 22) e os que tiveram mais de 50 panículas germinadas (Figura 23) foram considerados.

A Figura 24 mostra a regressão e correlação entre freqüência de mutação de clorofila e taxa de segregação. A correlação obtida,

r = 0,4103, significativo ao nível de 1%, indica que o número das mutações de clorofila por panícula aumenta com o aumento da taxa de segregação; em outras palavras, o número das panículas R_1 com mais de duas mutações diferentes aumenta com o aumento da dosagem de mutagênico, e, conseqüentemente, aumenta a taxa de segregação. Na Tabela 29, são mostrados o número e a proporção das panículas mutadas com mais de duas mutações diferentes nos tratamentos com raios-gama dos quatro experimentos, indicando que o número das células iniciais mutadas num aglomerado aumenta com o aumento da dosagem de raios-gama.

Esperava-se que uma ramificação primária de arroz se originasse de uma única célula inicial, desde que já tinha sido observado freqüentemente que as ramificações estéreis e férteis apareciam, independentemente uma da outra, numa panícula R_1. A fim de esclarecer esta dúvida, tôdas as ramificações de algumas panículas R_1 dos tratamentos 1 e 2 dos Exps. 1 e 2, foram semeadas separadamente conforme a ordem de florescimento das panículas. Os resultados são mostrados na Tabela 30.

De acôrdo com os resultados apresentados na Tabela 30, no tratamento 1, as ramificações primárias das panículas primeiramente florescidas mostraram taxa média de segregação de 0,1508, não concordando com a segregação monofatorial de 0,2500. Isto ocorreu também com as ramificações das panículas florescidas em segundo lugar no mesmo tratamento, mostrando taxa de segregação de 0,1844. A análise conjunta do tratamento 1 também não mostrou concordância com a segregação monofatorial (X^2 = 14,56, $P < 0,001$), indicando que as ramificações se originam de mais de duas células iniciais. No entanto, o número médio das plântulas germinadas por uma ramificação do tratamento 1 foi relativamente pequeno ($\simeq 12$). Portanto, a taxa de segregação de tôdas as ramificações segregadas foi recalculada pelo método desenvolvido por Fisher ("sib method") (MATHER, 1951). Os resultados obtidos por êste método são mostrados na Tabela 31, indicando que o desvio da segregação monofatorial foi altamente significativo e que tôdas as famílias afetadas foram homogêneas. Porém, uma análise feita individualmente, panícula por panícula, revelou que, dessas 15 panículas segregadas no tratamento 1, sòmente as ramificações de uma só panícula não apresentou concordância com a segregação monofatorial, como mostrado na Tabela 32, da qual foram excluidas 5 panículas uma vez que o pequeno tamanho da família impediu a sua análise. Portanto, considerou-se que o desvio da se

gregação monofatorial, mostrado no tratamento 1, foi causado, possivelmente, por êrro devido à pequena amostragem. Nos tratamentos 2 e 3, as taxas de segregação observadas nas ramificações mutadas mostraram boa concordância com a segregação monofatorial tanto nas análises individuais como nas análises conjuntas. A taxa de segregação das ramificações segregadas de todos os tratamentos conjuntos foi de 0,2361, e mostrou concordância com a segregação monofatorial ($X^2 = 3,55$, $0,05 < P < 0,1$). Êste resultado concordou com o resultado apresentado por OSONE (1963) que concluiu, pela análise conjunta de tratamentos com diversas dosagens de raios-gama, que uma ramificação da panícula de arroz se origina de uma única célula inicial. No entanto, mais dados sôbre a taxa de segregação das ramificações mutadas, especialmente nos tratamentos com baixa dosagem de raios-gama, são necessários para tirar melhor conclusão.

7. Resumo e conclusões

7.1. O presente trabalho visou comparar e analisar o efeito biológico da combinação fatorial dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EO ou EI ou EMS ou DS, sôbre sementes dormentes de arroz da variedade "Dourado Precoce". Foi levado em consideração, principalmente, o efeito sôbre a altura das plântulas, fertilidade e freqüência de mutação de clorofila, tendo sido usados diversos métodos para a avaliação dêsse efeito.

7.2. Na comparação da radiosensitividade na germinação, altura das plântulas, sobrevivência e fertilidade, mostrou-se que a germinação foi a menos sensitiva e a fertilidade foi a mais sensitiva com relação à irradiação de raios-gama.

7.3. O efeito protetor da cisteína sôbre vários caracteres em R_1 das sementes irradiadas foi avaliado pelo teste de sinal ("sign test"). De acôrdo com os resultados, o pós-tratamento durante 45 horas foi prejudicial, e o pós-tratamento durante 30 horas foi protetor. O pós-tratamento com cisteína durante 24 horas não mostrou efeito protetor nem efeito prejudicial.

7.4. A análise da variância com aplicação de regressão quadrática sôbre o efeito de pós-tratamento com cisteína em relação à freqüência de mutação de clorofila em R_2, revelou que, embora não tenha sido observada significância em nenhum caso, as linhas de regressão dos pós-tratamentos durante 24 e 45 horas mostraram, respectivamente, maior e menor concordância com a linha de regressão do tratamento com apenas raios-gama. A linha de regressão do pós-tratamento com cisteína durante 30 horas apresentou concordância moderada com a linha de regressão do tratamento com raios-gama, porém mostrou uma tendência em aumentar a freqüência de mutação de clorofila em tôdas as dosagens usadas de raios-gama, em comparação com o tratamento em que se usava apenas raios-gama.

7.5. Os tratamentos com EO (0,15%, 10 hrs a 27 $\pm$ 2°C), EI (0,05%, 10 hrs a 27 $\pm$ 2°C e DS (0,46%, 3 hrs a 25 $\pm$ 1°C) corresponderam, respectivamente, às dosagens de 8-9KR, 20-21KR e 6-7KR de raios-gama na indução de mutação de clorofila.

7.6. Na comparação das freqüências máximas de mutação de clorofila em todos os tratamentos em que se usavam apenas mutagênicos, o EMS foi o que apresentou maior eficiência na indução de mutação de clorofila.

7.7. O efeito da combinação dos tratamentos com raios-gama e mutagênico químico sôbre a altura das plântulas, fertilidade e freqüência de mutação de clorofila, foi avaliado pelo modêlo aditivo. Os resultados indicaram que a concordância com êste modêlo depende do tipo de mutagênico químico combinado, das condições do tratamento e do caráter analisado.

7.7.1. De modo geral, os tratamentos combinados com raios-gama e mutagênico químico mostraram adaptabilidade ao modêlo aditivo na altura das plântulas e na fertilidade.

7.7.2. Os tratamentos combinados com raios-gama e EO ou EI ou EMS mostraram boa concordância com o modêlo aditivo na freqüência de mutação de clorofila. No entanto, os tratamentos combinados com raios-gama e DS não mostraram concordância com êste modêlo.

7.8. O efeito do tratamento intercalado com cisteína entre a radiação e mutagênico químico foi discutido apesar de ser desconhecido o mecanismo da interação da cisteína com substâncias alquilantes.

7.8.1. Nos tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e EO, foi demonstrado que o tratamento intercalado com cisteína aumentou, de modo geral, a altura das plântulas e a fertilidade, em comparação com os tratamentos combinados de raios-gama e EO. O efeito da combinação de raios-gama (30KR) com EO foi tão drástico que não ocorreu nenhuma germinação. Todavia, o tratamento com cisteína entre êsses mutagênicos recuperou, razoàvelmente, a germinação, o que resultou, conseqüentemente, na existência de sobreviventes que apresentaram 15,20 mutações de clorofila por 100 panículas R_1, sendo esta a mais alta de todos os tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e EO.

7.8.2. Nos tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e EI, o efeito do tratamento intercalado com cisteína não foi muito claro. No entanto, o tratamento combinado com 30KR de raios-gama, cisteína e EI resultou em 17,09 mutações de clorofila por 100 panículas R_1, sendo esta freqüência a mais alta de todos os tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e EI, apesar de que não foi significativa em comparação com a do tratamento combinado com 30KR de raios-gama e EI.

7.8.3. Quando a concentração de EMS foi baixa, a interação de cisteína com EMS foi positiva na fertilidade nos tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e EMS, em comparação com os tratamentos combinados com raios-gama e EMS. Quando a concentração de EMS foi alta, o efeito do tratamento intercalado com cisteína foi positivo na altura das plântulas e negativo na fertilidade, em comparação com os tratamentos combinados com raios-gama e EMS. Quanto à freqüência de mutação de clorofila, não foi possível estimar êste efeito de cisteína devido à alta toxicidade de EMS e, conseqüentemente, pequeno tamanho da amostra.

7.8.4. Quando a concentração de DS foi baixa, a interação de cisteína com DS não foi clara. Entretanto, quando a concentração de DS foi alta, o tratamento intercalado com cisteína entre a radiação e DS mostrou uma tendência em diminuir a altura das plântulas e aumentar a fertilidade das panículas R_1, em comparação com os tratamentos combinados com raios-gama e DS. Isto foi justamente o contrário do que se obteve com os tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e EMS, sugerindo que o mecanismo da interação de cisteína com EMS sôbre a altura das plântulas e a fertilidade das panículas R_1 é diferente do que o de cisteína com DS.

7.9. As análises do espectro de mutação de clorofila foram feitas sôbre os três tipos de mutação: albina, viridis e outras.

7.9.1. Ambiente diferente não afetou as freqüências dos três tipos de mutação, quando a comparação foi feita entre os tratamentos com raios-gama em 1965, 66 e 67, e também entre os pós-tratamentos com cisteína durante 24 horas em 1967 e 68.

7.9.2. De modo geral, as dosagens ou concentrações diferentes de mutagênico, tanto em um só tratamento como em tratamentos combinados, não afetaram o espectro de mutação de clorofila, com exceção dos seguintes casos:

7.9.2.1. Freqüência do tipo albina foi bastante reduzida no tratamento com EMS_2 (1,0%, 10 hrs), quando êste foi comparado com o tratamento com EMS_1 (0,5%, 10 hrs).

7.9.2.2. Na análise do pós-tratamento com cisteína durante 24 horas, em 1968, verificou-se que a freqüência do tipo viri-

dis aumentou e a do tipo outras diminuiu, à medida que aumentou a dosagem de raios-gama.

7.9.2.3. Na combinação de raios-gama, cisteína e EO, foi observada uma redução considerável da freqüência do tipo albina no tratamento combinado com 30KR de raios-gama, cisteína e EO.

7.9.3. Os cinco mutagênicos usados, isto é, raios-gama, EO, EI, EMS e DS, não alteraram o espectro de mutação de clorofila.

7.9.4. Os pós-tratamentos com cisteína durante 30 e 45 horas não modificaram o espectro de mutação de clorofila, em comparação com os tratamentos com raios-gama. Todavia, o pós-tratamento com cisteína durante 24 horas aumentou a freqüência do tipo viridis e diminuiu a do tipo outras, em comparação com os tratamentos com raios-gama.

7.9.5. Os tratamentos combinados com raios-gama e mutagênico químico não alteraram o espectro de mutação de clorofila, em comparação com os tratamentos com raios-gama.

7.9.6. Os tratamentos combinados com cisteína e EO reduziram a freqüência do tipo albina. Porém, os outros tratamentos combinados com cisteína e mutagênico químico não afetaram as freqüências dos tipos de mutação de clorofila, em comparação com os tratamentos com raios-gama.

7.9.7. Sòmente os tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e EMS alteraram o espectro de mutação de clorofila, aumentando a freqüência do tipo viridis, quando comparados com os tratamentos com raios-gama. Os outros tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e mutagênico químico não modificaram o espectro de mutação de clorofila, em comparação com os tratamentos com raios-gama.

7.10. As panículas primeiramente florescidas foram as que mostraram a menor taxa de segregação e a maior freqüência de mutação de clorofila, indicando que elas se originaram de um maior número de células iniciais.

7.11. O número máximo de células iniciais sobreviventes no aglomerado de células foi de 6, quando êste aglomerado de células foi tratado com mutagênico, diminuindo o número à medida que aumentou a dosagem ou concentração dos mutagênicos.

7.12. As ramificações primárias se originam de uma única célula inicial.

8. Summary and conclusions

8.1. The objectives of the present work were to compare and analyse the biological effects of the factorial treatment combinations of gamma-rays, cysteine and EO or EI or EMS or DS on the dormant rice seeds of the Brazilian variety "Dourado Precoce". Principally, the effects on seedling height, fertility and chlorophyll mutation frequency were studied.

8.2. Comparing radiosensitivities in germination, seedling height, survival and fertility, it was concluded that germination has the lowest and fertility has the highest radiosensitivity to gamma-radiation.

8.3. The statistical analysis by means of "sign test" revealed that the post-treatment with cysteine during 45 hours was rather prejudicial to the various R_1 characters of the irradiated seeds, and that the post-treatment during 30 hours was most protective. The post--treatment with cysteine during 24 hours did not show any significant effect.

8.4. The analysis of variance of quadratic regression on the effect of post-treatment with cysteine in relation to chlorophyll mutation showed that, though there was no case of significance, the regression curves of the post-treatment during 24 and 45 hours demonstrated, respectively, the lowest and the highest fitness to the regression curve of the treatment with gamma-rays. Though the regression curve of the post-treatment during 30 hours showed the intermediate fitness, it tended to increase the mutation frequency in all doses used.

8.5. The effects of EO (0.15% for 10 hs at 27 $\pm$ 2°C), EI (0.05% for 10 hs at 27 $\pm$ 2°C) and DS (0.46% for 3 hs at 25 $\pm$ 1°C) in chlorophyll mutation induction were equivalent to 8-9KR, 20-21KR and 6-7KR of gamma--rays, respectively.

8.6. Regarding chlorophyll mutation induction, EMS was the most efficient of all mutagens used in this experiment.

8.7. The effects of treatment combinations of gamma-rays and chemical mutagens on seedling height, fertility and chlorophyll mutation frequency were assessed by the additive model.

8.7.1. In general, combined treatments of gamma-rays and chemical mutagens showed good fitness to this model on seedling height and fertility.

8.7.2. Combined treatments of gamma-rays and EO or EI or EMS showed good fitness to this model on chlorophyll mutation frequency. However, treatment combinations of gamma-rays and DS did not show such fitness to the model.

8.8. The intercalary effects of cysteine between gamma-rays and chemical mutagen treatments were discussed though the mechanism of the interaction of cysteine with chemical mutagens is unknown.

8.8.1. In the combined treatments of gamma-rays, cysteine and EO, cysteine treatment brought about, in general, positive effects on seedling height and fertility, comparing with the combined treatments of gamma-rays and EO. The combining effect of 30KR of gamma-rays and EO was so drastic that no germination was observed. However, the intercalary treatment with cysteine recuperated germination reasonably, and consequently 15.20 chlorophyll mutations per 10 R_1 panicles were observed in the R_2. This was the highest frequency of all factorial treatment combinations of gamma-rays, cysteine and EO.

8.8.2. The intercalary effect of cysteine in the combined treatment of gamma-rays, cysteine and EI on the R_1 characters was not clear. However, the treatment combined with 30KR of gamma-rays, cysteine and EI caused 17.09 chlorophyll mutations per 100 R_1 panicles which was the highest in all factorial treatment combinations of gamma--rays, cysteine and EI, though this frequency was not significant.

8.8.3. When the concentration of EMS was low, the treatment effect of cysteine between radiation and the chemical mutagen was positive in fertility, and when it was high, the effect of cysteine was positive in seedling height and negative in fertility, in comparison with the combined treatments of gamma-rays and EMS. Regarding the intercalary effect of cysteine on chlorophyll mutation frequency, it was difficult to assess such effect because of small sample size in the R_1 due to high toxicity of EMS.

8.8.4. When the concentration of DS was low, the intercalary effects of cysteine were not clear. However, when it was high, those

effects were, in general, negative in seedling height and positive in fertility, in comparison with the combined treatments of gamma-rays and DS. This suggests that the modes of interaction of cysteine with EMS and DS may be different.

8.9. The analyses of chlorophyll mutation spectrum were carried out on three classes: albina, viridis and others.

8.9.1. Comparing the frequencies of three classes of chlorophyll mutations of the treatments with gamma-rays and of the post-treatments with cysteine (24 hs) in different years, it was concluded that the annual environmental conditions did not affect the chlorophyll mutation spectrum.

8.9.2. In general, different doses and concentrations of mutagens did not change the frequencies of three types of chlorophyll mutation, with the exception of the following cases:

8.9.2.1. The frequency of albina type was much reduced in the treatment EMS_2 (1.0% for 10 hs) than in the treatment EMS_1 (0.5% for 10 hs).

8.9.2.2. The post-treatment with cysteine during 24 hours in 1968 showed that the frequency of viridis type increased and of others type decreased with increasing gamma-ray dose.

8.9.2.3. In the combined treatments of gamma-rays, cysteine and EO, the albina type frequency was much reduced when gamma-ray dose was 30KR.

8.9.3. Five mutagens used, that is, gamma-rays, EO, EI, EMS and DS did not modify the chlorophyll mutation spectrum.

8.9.4. The post-treatments with cysteine during 30 and 45 hours did not change the frequencies of three types, but the post--treatment during 24 hours increased the viridis type and decreased the others type, in comparison with those of the treatment with gamma--rays.

8.9.5. The combined treatments of gamma-rays and chemical mutagens did not change the frequencies of three types of chlorophyll mutation, in comparison with those of the treatment with gamma-rays.

8.9.6. The combined treatments of cysteine and chemical

mutagens did not change the frequencies of three types, with the exception of the combined treatment of cysteine and EO where the albina type was reduced compared with the treatment with gamma-rays.

8.9.7. Only the combined treatment of gamma-rays, cysteine and EMS modified the frequencies of three types of chlorophyll mutation. This was due to the increase of viridis type in comparison with the treatment with gamma-rays. The other combined treatments of gamma-rays, cysteine and chemical mutagens did not show any modification in the frequencies of three types, compared with the treatment with gamma-rays.

8.10. The first flowered panicles showed the lowest segregation ratio and the highest chlorophyll mutation frequency, indicating that they derived from the highest number of initial cells.

8.11. The corpus cells of the treated seeds consisted, at most, 6 survived initial cells. This number decreased with increasing dose or concentration of mutagens,

8.12. The primary branches derived from only one initial cell.

9. Literatura citada

AASTVEIT, K., 1968. Effects of combinations of mutagens on mutation frequency in barley. In Mutations in Plant Breeding II. Vienna, IAEA, p. 5-14.

ALEXANDER, P., 1960. Radiation imitating chemicals. Sci. Amer. 202: 99-108.

ANDERSON, E.G., LONGLEY, E., LI, C.H. & RETHERFORD, K.L., 1949. Hereditary effects produced in maize by radiation from the Bikini atomic bomb. I. Studies on seedlings and pollen of the exposed generation. Genetics 34: 639-646.

ANDO, A., 1968. Mutation induction in rice by radiation combined with chemical protectant and mutagens. IAEA Tech. Rep. Ser., No. 86: 7-15.

ARNASON, T.J., MOHAMMED, L., KOEHLER, D. & RENNERBERG, F.M., 1962. Mutation frequencies in barley after treatment with gamma-radiation, ethylene imine, ethyl methanesulfonate and maleic hydrazide. Canad. J. Genet. Cytol. 4: 172-178.

AUERBACH, C. & ROBSON, J.M., 1942a. Experiments on the action of mustard gas in Drosophila. I. Production of sterility and of mutation. Report to the Ministry of Supply, W3979. (Citado em Auerbach, C., 1949. Chemical mutagenesis. Biol. Rev. 24: 355-391).

_____,& _____, 1942b. Experiments on the action of mustard gas in Drosophila. II. Genetical differences in susceptibility. III. Proof that H acts directly on the chromosomes. IV. The production of visible mutations. Report to the Ministry of Supply, W11831. (Citado em Auerbach, C., 1949. Chemical mutagenesis. Biol. Rev. 24: 355-391).

_____, & _____, 1947. The production of mutations by chemical substances. Proc. roy. Soc. Edinb. 62: 271-283.

BACQ, Z.M., 1965. Chemical protection against ionizing radiation. Springfield, Thomas. 328 p.

_____, & HERVE, A., 1951. Protection of mice against a lethal dose of X-rays by cyanide, azide and malonitrite. Brit. J. Radiol. 24: 617-621.

BARRON, E.S.G., DICKMAN, S., MUNTS, J.A. & SINGER, T.P., 1949. Studies on the mechanism of action of ionizing radiations. I. Inhibition of enzymes by X-rays. J.Gen. Physiol. 32: 537. (Citado em Eldjarn, L.& Pihl, A., 1960. Mechanisms of protective and sensitizing action. In Errera, M. & Rorssberg, A., eds., Mechanisms in Radiobiology. N.Y., Pergamon Press. vol. 2, p. 231-296).

VAN BEKKUM, D.W. & DE GROOT, J., 1956. Observations on chemical protection in vivo and in vitro. In Mitchell, J.S., Holmes, B. E. & Smith, C.L., eds., Progress in Radiobiology. Springfield, Thomas. p. 243-248.

BLIXT, S., EHRENBERG, L. & GELIN, O., 1958. Quantitative studies of induced mutations in peas. I. Methodological investigations. Agri Hort. Genet. 16: 238-250.

_____, _____, & _____, 1960. Quantitative studies of induced mutations in peas. III. Mutagenic effects of ethyleneimine. Agri Hort. Genet. 18: 109-123.

BOX, G.E.P., 1954. Some theorems of quadra ic forms applied in the study of analysis of variance. I. Effect of inequality of variance in the an-way classification. Ann. Math. Statist. 25: 290-302.

BRIDGES, B.A., 1963. Effect of chemical modifiers on inactivation and mutation-induction by gamma-radiation in Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 31: 405-412.

CALDECOTT, R.S. & SMITH, L., 1952. A study of X-ray induced chromosomal aberrations in barley. Cytologia 17: 224-242.

CARDINALI, G., 1954. Mutagenic activity of ethyleneimine picrate. Nature 173: 825-826.

COLLINS, J.L., 1927. A low temperature type of albinism in barley. J. Hered. 18: 331-334.

CONGER, A.D. & RANDOLPH, M.L., 1959. Magnetic centers (free radicals) produced in cereal embryos by ionizing radiation. Rad. Res. 11: 54-66.

DALEN, H. & OFTEBRO, R., 1963. The radioprotective effect of cysteine, AET and cystamine on chromosome damage in Allium cepa root tips. Rad. Res. 3: 59-65.

DAVIK, F. & LOTHE, F., 1955. The effect of cysteamine, cystamine and hypoxia on mortality and bone-marrow chromosome aberration in mice after total body roentgen irradiation. Acta Radiol. 44: 243-257.

DAVIS, A.K., CRANMORE, D. & ALPEN , E.L., 1958. Alteration of beta radiation lesions of the skin by cysteine, nitrite, hypoxia, spleen homogenate, and bone marrow homogenate. Rad. Res. 9: 222-228.

DEMEREC, M., 1933. The effect of X-ray dosage on sterility and number of lethals in Drosophila melanogaster. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 19: 1015-1020.

_____, 1947. Mutations in Drosophila induced by a carcinogen. Nature 159: 604.

DOLL, H. & SADFAER, J., 1969. Mutagenic effect of gamma-rays, diethyl sulphate, ethyl methanesulphonate, and various combinations of gamma-rays and the chemicals. In Induced Mutations in Plants, Vienna, IAEA, p. 195-206.

EHLING, U.H., CUMMING, R.G. & MALLING, H.V., 1967. Induction of dominant lethal mutations by alkylating agents in male mice. Mut. Res. 5: 417-428.

EHRENBERG, A., EHRENBERG, L. & STRÖM, G., 1969. Radiation-induced free radicals in embryo and endosperm of barley kernels. Rad. Bot. 9: 151-158.

EHRENBERG, L., 1960a. Induced mutation in plants: mechanisms and principles. Genet. Agrar. 12: 364-389.

_____, 1960b. Chemical mutagenesis: Biochemical and chemical point of view of mechanisms of action. Abh.deut. Akad. Wiss. Berl. Kl. Med. (Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesungen I) No. 1: 124-136.

_____ & GUSTAFSSON, A., 1957. On the mutagenic action of ethylene oxide and diepoxybutane in barley. Hereditas 43: 595-602.

_____, _____ & LUNDQVIST, U., 1959. The mutagenic effect of ionizing radiations and reactive ethylene derivatives in barley. Hereditas 45: 351-368.

_____, _____ & _____, 1961. Viable mutants induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. Hereditas 47: 243-282.

_____, _____ & VON WETTSTEIN, D., 1956. Studies on the mutation processes in plants-Regularities and intentional control. Conference on Chromosome. Wageningen, p. 1-29.

_____, LUNDQVIST, U., OSTERMAN, S. & SPARRMAN, B., 1966. On the mutagenic action of alkanesulfonic esters in barley. Hereditas 56: 277-305.

_____, _____ & STRÖM, G., 1958. The mutagenic action of ethylene imine in barley. Hereditas 44: 330-336.

_____ & NYBOM, N., 1954. Ion density and biological effectiveness of radiations. Acta Agr. Scand. 4: 396-418.

ELDJARN, L. & PIHL, A., 1960. Mechanisms of protective and sensitizing action. In Errera, M. & Forssberg, A., eds., Mechanisms in Radiobiology. N.Y., Pergamon Press. vol. 2, p.231-296.

FAVRET, E.A., 1960. Somatic mutations of four genes for albinism in barley induced by X-rays and ethyl methanesulfonate. Hereditas 46: 622-634.

_____, 1963. Genetic effects of single and combined treatment of ionizing radiations and ethyl methanesulfonate on barley seeds. Proc. 1st Intern. Barley Genet. Symp., Wageningen, 68-81.

FRÖIER, K., 1946. Genetical studies on the chlorophyll apparatus in oats and wheat. Hereditas 32: 297-406.

FUJII, T., 1955. "Virido-albina" mutant in einkorn wheat induced by X-rays. Ann. Rep. Nat. Inst. Genet.(Japão). 6: 56-57.

GAUL, H., 1957. Die verschiedenen Bezugssysteme der Mutationshäufigkeit bei Pflanzen angewendet auf Dosis-Effektkurven. Z. Pflanzenz. 38: 63-76.

_____, 1959. Über die Chimärenbildung in Gerstenpflanzen nach Röntgenbestrahlung von Samen. Flora 147: 207-241.

_____, 1960. Critical analysis of the methods for determining the mutation frequency after seed treatment with mutagens. Genet. Agrar. 12: 297-318.

_____, 1962. Ungewöhnlich hohe Mutationsraten bei Gerste nach Anwendeng con Äthylmethansulfonat und Röntgenstrahlen. Naturwissenschaften 49: 431.

_____, BENDER, D., ULONSKA, E. & SATO, M., 1966. EMS- induced genetic variability in barley; the problem of EMS-induced sterility; and a method to increase the efficiency of EMS treatment. In Mutations in Plant Breeding. Vienna, IAEA, p. 63-84.

GERSHENSON, S., 1939. Induction of direct mutations in Drosophila. C.R. Acad. Sci. U.R.S.S. 25: 236. (Citado em Auerbach, C., 1949. Chemical mutagenesis. Biol. Rev. 24: 355-391).

GIBSON, P.B., BRINK, R.A. & STAHMANN, M.A., 1950. The mutagenic action of mustard gas on Zea mays. J. Hered. 41: 232-238.

GINSBERG, D.M. & WESTER, H.K., 1969. Chemical protection against single-strand breaks in DNA of gamma-irradiated E. coli. Rad. Res. 39: 421-435.

GUSTAFSSON, A., 1940. The mutation system of the chlorophyll apparatus. Lunds Univ. Arsskr. N.F. Avd. 2. Bd. 36 (11): 1-40.

_____, 1960. Chemical mutagenesis in higher plants. Abh.deut. Akad. Wiss. Berl. Kl. Med. (Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesungen I) No.1: 14-29.

_____ & MACKEY, J., 1948. The genetical effects of mustard gas substances and neutrons. Hereditas 34: 371-386.

HABER, A.H. & RANDOLPH, M.L., 1966. Gamma-ray-induced ESR signale in lettuce: Evidence for seed-hydration-resistant and -sensitive free radicals. Rad. Bot. 7: 17-28.

HAMDY, M.K., NOAMAN, M. & CASTER, W.O., 1969. Effect of cysteine and 4-amino-1-naphtol on solution of lysosomal enzymes exposed to high doses of radiation. Rad. Res. 38: 214-222.

HÄNSEL, H., 1960. Beobachtungen über albinotische und vireszente Chlorophyllaberranten und deren Nachkommen bei Gerste (Hordium vulgare convar. distickon). Z. Vererb. 91: 358-372.

HEINER, R.E., KONZAK, C.F., NILAN, R.A. & LEGAULT, R.R., 1960. Diverse ratios of mutations to chromosome aberrations in barley treated with diethyl sulfate and gamma-rays. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 46: 1215-1221.

HESLOT, H. & FERRARY, R., 1958. Action génétique comparée des radiations et de quelques mutagènes sur l'orge. Ann. Inst. Nat. Agron. 44: 133-152.

HOCKENHULL, D., 1948. Mustard-gas mutation in Aspergillus nidulans. Nature 161: 100.

HOLLAENDER, A. & STAPLETON, G.E., 1956. The influence of chemical pre- and post-treatments on radiosensitivity of bacteria, and their significance for higher organisms. In Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism. London, J. & A. Churchill. p. 120-135.

HOLM, G., 1954. Chlorophyll mutations in barley. Acta Agr. Scand. 4: 457-471.

HOROWITZ, N.H., HOULAHAN, M.B., HUNGATE, M.G. & WRIGHT, B., 1946. Mustard gas mutations in Neurospora. Science 104: 233-234.

KAPLAN, R.W., 1951. Chromosomen- und Faktormutationsraten in Gersten-Körnern bei verschiedenartigen Quellungsbehandlunggen oder Kälte während oder nach der Röntgenbestrahlung sowie Dosisfraktionierung. Z. Ind. Abst. Vererb. 83: 347-382.

KAUKIS, K. & REITZ, L.P., 1955. Ontogeny of the sorghum inflorescence as revealed by seedling mutants. Am. J. Bot. 42: 660-663.

KAWAI, T. & SATO, H., 1965. Studies on artificial induction of mutations in rice by chemicals. I. Chlorophyll mutations by ethylene imine and ethylene oxide treatments. Bull. Nat. Agr. Sci. (Japão). Ser. D. No. 13: 133-162.

KHVOSTOVA, V.V., MOZHAEVA, V.S., AIGAES, N.S. & VALEVA, S.A., 1965. Mutations induced by ionizing radiations and ethylene imine in winter wheat. Mut. Res. 2: 339-344.

KOHN, N.I. & GUNTER, S.E., 1959. Factors influencing the radioprotective action of cysteine: effects in Escherichia coli due to drug concentration, temperature, time and pH. Rad. Res. 11: 732--744.

KØLMARK, H.G., 1965. Protection by 2-mercaptoethylamine against the mutagenic and lethal effects of X-rays in Neurospora crassa. Mut. Res. 2: 229-235.

KONZAK, C.F., NILAN, R.A., HARLE, J.R. & HEINER, R.E., 1961. Control of factors affecting the response of plants to mutagens. Brookhaven Symposia in Biology 14: 128-157.

LAW, L.W., 1938. The effects of chemicals on the lethal mutation rate in Drosophila melanogaster. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 24: 546-550.

LEA, D.E., 1946. Actions of radiations on living cells. London, Cambridge Univ., 2ª ed., 416 p.

LIDDELL, H.F. & SAVILLE, B., 1959. Colorimetric determination of cysteine. The Analyst 84: 188-190.

LOPPES, R., 1969. Effect of the selective medium on the manifestation of mutations induced with monoalkylating agent in Chlamydomonas reinhardi. Mut. Res. 7: 25-34.

MACKEY, J., 1954. Neutron and X-ray experiments in wheat and a revision of the speltoid problem. Hereditas 40: 65-180.

MATHER, K., 1951. The measurement of linkage in heredity. London, Methuen. 149 p.

MATSUO, T. & ONOZAWA, Y., 1961. Mutations induced in rice by ionizing radiations and chemicals. In Effects of ionizing radiations on seeds. Vienna, IAEA, p. 495-501.

_____, YAMAGUCHI, H. & ANDO, A., 1958. A comparison of biological effects between thermal neutrons and X-rays on rice seeds. Jap.J. Breed. 8: 37-45.

MIKAELSEN, K., 1952. The protective effect of glutathione against radiation induced chromosome aberrations. Science 116: 172-174.

_____, 1954. Protective properties of cysteine, sodium hydrosulfite and sodium cyanide against radiation induced chromosome aberrations. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 40: 171-182.

_____, 1955. Cytological effect of chronic gamma irradiation and the protective property of certain chemicals against radiation induced chromosome aberrations. In Radiobiology Symposium. London, Butherworth, p. 312-316.

_____ & PEDERSEN, K., 1967. Protective effectiveness of cysteine, cysteamine and cystamine against X-ray induced chromosome aberrations at different stages of mitosis. Hereditas 60: 399-406.

MOH, C.C., 1961. Does a coffee plant develop from one initial cell in the shoot apex of an embryo? Rad. Bot. 1: 97-99.

_____ & NILAN, R.A., 1956. Reduced gene transmission in radiation--induced mutant barley. J. Hered. 47: 129-131.

MONTI, L.M., 1968. Mutations in peas induced by diethylsulfate and X-rays. Mut. Res. 5: 187-191.

MULLER, H.J., 1927. Artificial transmutation of the gene. Science 66: 84-87.

NILAN, R.A., KONZAK, C.F., HEINER, R.E. & FROESE-GERTZEN, E.C., 1963. Chemical mutagenesis in barley. Proc. 1st Intern. Barley Genet. Symp., Wageningen, p. 35-54.

NISHIMURA, Y. & KURAGAMI, H., 1952. Mutations in rice induced by X-irradiation. Jap. J. Breed. 2: 65-71.

NYBOM, N., 1955. The pigment characteristics of chlorophyll mutations in barley. Hereditas 41: 483-498.

_____, GUSTAFSSON, A. & EHRENBERG, L., 1952. On the injurious action of ionizing radiations in plants. Bot. Notis. 104: 343-365.

OLIVER, C.P., 1930. The effect of varying the duration of X-ray treatment upon the frequency of mutation. Science 71: 44-46.

OSONE, K., 1963. Studies on the developmental mechanism of mutated cells induced in irradiated rice seeds. Jap. J. Breed. 13: 1-13.

_____, 1966. Comparison of mutagenic effects of ethylene-imine and ionizing radiations on rice. Gamma Field Symposia. Minist. Agr. Forest. (Japão). No. 5: 53-61.

PATT, H.M., MAYER, S.H., STRAUBE, R.L. & JACKSON, E.M., 1953. Radiation dose reduction by cysteine. J. Cell. Comp. Physiol. 42: 327-341.

_____, TYREE, E.B., STRAUBE, R.L. & SMITH, D.E., 1949. Cysteine protection against X-irradiation. Science 110: 213.

PIMENTEL GOMES, F., 1963. Curso de estatística experimental. Piracicaba, ESALQ, Univ. S.Paulo, 2ª ed. 584 p.

RANDOLPH, M.L. & HABER, A.H., 1961. Production and decay of free radicals induced by X-irradiation of dry lettuce seeds. In Effects of ionizing radiations on seeds. Vienna, IAEA, p. 57-65.

RAPOPORT, I.A., 1948. Atsetilirovanie gannykh belkov i mutatsii. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 59: 119-122.

RIEGER, R. & MICHAELIS, A., 1960. Chromatidenaberrationen nach Einwirkung von Äthylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurzeln von Vicia faba L. Die Kulturpflanzen 8: 230-243.

RILEY, H.P., 1957. Chemical protection against X-ray damage to chromosomes. Genetics 42: 593-600.

RUSSEL, W.L., RUSSEL, L.B. & KELLY, E.M., 1958. Radiation dose rate and mutation frequency. Science 128: 1546-1550.

SATO, H., 1966. Induction of mutations in rice by some chemicals. Gamma Field Symposia. Minist. Agr. Forest. (Japão). No. 5: 71-81.

SCARASCIA-MUGNOZZA, G.T. & MONTI, L.M., 1966. Effects of recurrent mutagenic treatment in durum wheat. Mut. Res. 3: 298-304.

SCHWARTZ, H. & RICHARDSON, E., 1967. A correlation between radiation--induced free radicals and survival in microorganisms expressed to beta-mercaptoethylamine under oxygen and nitrogen. Intern. J. Rad. Biol. 12: 75-88.

SIDDIQ, E.A. & SWAMINATHAN, M.S., 1968. Induced mutations in relation to the breeding and phylogenetic differentiation of Oryza sativa. IAEA Tech. Rep. Ser., No. 86: 25-51.

SMITH, D.E., PATT, H.M., TYREE, E.B. & STRAUBE, R.L., 1950. Quantitative aspects of the protective action of cysteine against X--radiation. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 73: 198-200.

SMITH, H.H., CURTIS, H.J., WOODLEY, R.G. & STEIN, O.L., 1962. The deuteron microbeam as a tool in botanical research. Rad. Bot. 2: 255-268.

STADLER, L.J., 1928a. Mutations in barley induced by X-rays and radium. Science 68: 186-187.

_____, 1928b. Genetic effects of X-rays in maize. Proc. Nat.Acad. Sci. U.S. 14: 69-75.

_____, 1930. Some genetic effects of X-rays in plant. J. Hered. 21: 2-9.

_____ & ROMAN, H., 1948. The effect of X-rays upon mutation of the gene A in maize. Genetics 33: 273-303.

STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H., 1960. Principles and procedures of statistics. N.Y., McGraw Hill. 403 p.

STERN, M.G., VAN DILLEWIJN, J. & JOH.BLOCK, 1968. The influence of some sulphydryl compounds on gamma-ray-induced inactivation and reversion to prototrophy in E. coli B fil⁻ citrul⁻. Mut. Res. 5: 349-357.

STRAUBE, R.L. & PATT, H.M., 1953. Studies with cysteamine and cysteine in X-irradiated animals. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 84: 702-704.

SUNESON, C.A. & STEVENS, H., 1953. Studies with bulked hybrid populations of barley. USDA Tech. Bull. No. 1067, 14 p.

SWAMINATHAN, M.S., 1961. Effect of diplontic selection on the frequency and spectrum of mutations induced in polyploids following seed irradiation. In Effects of ionizing radiations on seeds. Vienna, IAEA, p. 279-288.

_____, CHOPRA, V.L. & BHASKARAN, B., 1962. Chromosome aberrations and the frequency and spectrum of mutations induced by ethylmethane sulfonate in barley and wheat. Ind. J. Genet. Pl. Breed. 22: 192-207.

TANO, S. & YAMAGUCHI, H., 1969. Mutagenic effects of N-nitroso-N--methylurethane on barley seeds. Jap. J. Breed. 19: 137-143.

TATUM, E.L., 1946. Induced biochemical mutations in bacteria. Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 11: 278-284.

TAVČAR, A., 1965. Gamma-ray irradiation of seeds of wheat, barley and inbreeds of maize and the formation of some useful point mutations. Rad. Bot. 5(Suppl.): 159-174.

TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N.W., ZIMMER, K.G. & DELBRÜCK, M., 1935. Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl., Fachgruppen VI, 1: 196-245.

TROSKO, J.E. & BREWEN, J.G., 1967. Inhibition of ultraviolet-induced chromosome breaks by cysteamine in 5-bromouracil-substituted mammalian cells. Rad. Res. 32: 200-213.

WALLACE, A.T., 1965. Increasing the effectiveness of ionizing radiations in induced mutations at the vital locus controlling resistance to the fungus Helminthosporium victoriae in oats. Rad. Bot. 5 (Supple.): 237-250.

WESTERGAARD, M., 1957. Chemical mutagenesis in relation to the concept of the gene. Experientia 13: 224-234.

VON WETTSTEIN, D., 1960. Multiple allelism in induced chlorophyll mutants of barley. Hereditas 46: 767-770.

YAMAGATA, H., SYAKUDO, K. & FURUKAWA, T., 1965. Studies on the usefulness of artificially induced mutations in barley. V. On the mutagenic effects of treating rice grains with chemicals. Jap. J. Bredd. 15: 263-270.

YAMAGUCHI, H., 1961. On the estimation of mutation frequency in the mutation breeding. Jap. J. Breed. 11: 53-58.

_____, 1962a. The effects of post-treatments with cysteine and sodium hydrosulfite on the radiation-induced injury and mutation in rice. Jap. J. Breed. 12: 8-12.

_____, 1962b. Modification of radiation-induced damage. Gamma Field Symposia. Minist. Agr. Forest. (Japão). No. 1: 9-17.

_____, 1962c. The chimeric formation in an X_1 panicle after irradiation of dormant rice seed. Rad. Bot. 2: 71-77.

ZIMMER, K.G., EHRENBERG, L. & EHRENBERG, A., 1957. Nachweis langlebiger magnetischer Zentren in bestrahlten biologischen Medien und deren Bedeutung für die Strahlenbiologia. Strahlentherapie 103: 3-15.

Tabela 1 - Relação entre o tempo de tratamento e o "consumo" de cisteína devido à presença de sementes na solução.

Tempo de tratamento (horas)	Pêso de sementes (g)	"Consumo" de cisteína	
		(%)	(µg/1 g de sementes)
0,00	--	0,00	0,00
5,00	14,2845	1,00	8,47
9,75	14,1724	5,11	43,61
18,75	14,0690	7,98	68,66
23,75	14,0380	9,33	80,42
28,75	14,3664	10,20	85,89
33,75	14,3580	17,78	149,81
43,25	14,3292	44,82	378,46
48,25	14,0095	35,32	305,08
53,25	14,2306	43,45	369,42

Tabela 2 - Resultados gerais da combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EO.

Tratamento	Germinação	Altura das plântulas	Sobrevivência	Fertilidade	Nº das panículas germinadas	Nº de mutações de clorofila observadas	Nº de mutações de clorofila por 100 panículas germinadas
0 (contrôle)	100,0	100,0	100,0	100,0	332	2	0,60
1	101,0	92,4	76,8	82,0	859	46	5,36
2	100,2	69,2	72,4	62,0	797	46	5,77
3	88,8	51,2	42,9	45,4	536	40	7,46
0+C	102,1	98,4	79,0	91,2	576	14	2,43
1+C	104,2	84,1	59,4	72,8	774	52	6,72
2+C	97,4	52,6	62,3	51,9	772	74	9,59
3+C	84,1	43,5	51,3	41,4	610	46	7,54
0+EO	75,5	48,7	65,2	90,5	769	32	4,16
1+EO	73,4	49,7	69,0	70,3	1300	81	6,23
2+EO	26,6	21,7	31,3+	43,3	276	25	9,06
3+EO	0,0	-	-	-	-	-	-
0+C+EO	56,9	58,5	49,7	89,9	902	18	2,00
1+C+EO	51,7	48,6	46,1	67,5	603	30	4,98
2+C+EO	45,0	41,0	43,9	55,9	607	54	8,90
3+C+EO	16,6	23,9	19,7+	34,9	125	19	15,20

+ ... cultivadas na casa de vidro

0 ... sem irradiação
1 ... irradiação de 10 KR de raios-gama
2 ... irradiação de 20 KR de raios-gama
3 ... irradiação de 30 KR de raios-gama

C ... tratamento com cisteína, $1x10^{-3}$M, por 45 hrs.
EO ... tratamento com EO, 0,15%, por 10 hrs.

Tabela 3 - Resultados gerais da combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EI.

Tratamento	Germinação	Altura das plântulas	Sobrevivência	Fertilidade	Nº das panículas germinadas	Nº de mutações de clorofila observadas	Nº de mutações de clorofila por 100 panículas germinadas
0 (contrôle)	100,0	100,0	100,0	100,0	388	2	0,52
1	101,0	89,6	84,2	81,0	798	54	6,77
2	97,1	61,2	81,0	65,9	719	69	9,60
3	70,5	46,9	36,6	34,5	350	29	8,29
0+C	100,5	100,0	111,8	100,6	1147	4	0,35
1+C	100,7	90,6	88,3	83,6	827	50	6,05
2+C	99,6	72,2	73,5	58,4	615	56	9,11
3+C	71,5	49,5	53,0	43,5	502	50	9,96
0+EI	101,4	93,5	99,8	99,7	1043	70	6,71
1+EI	101,6	87,1	91,5	83,2	921	112	12,16
2+EI	97,1	64,4	99,8+	51,0	1032	118	11,43
3+EI	64,5	40,8	48,7+	33,8	200	24	12,00
0+C+EI	101,7	93,5	104,0	101,0	1084	40	3,69
1+C+EI	100,5	87,4	92,0	75,6	942	91	9,66
2+C+EI	98,4	60,2	94,0	57,0	877	93	10,60
3+C+EI	70,0	42,7	55,4+	32,8	158	27	17,09

+ ... cultivadas em casa de vidro

0 ... sem irradiação
1 ... irradiação de 10KR de raios-gama
2 ... irradiação de 20KR de raios-gama
3 ... irradiação de 30KR de raios-gama

C ... tratamento com cisteína, $1x10^{-3}$M, por 30 hrs.
EI ... tratamento com EI, 0,05%, por 10 hrs.

Tabela 4 - Resultados gerais da combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EMS.

Tratamento	Germinação	Altura das plântulas	Nº de sobreviventes	Fertilidade	Nº das panículas germinadas	Nº de mutações de clorofila observadas	Nº de mutações de clorofila por 100 panículas germinadas
0 (contrôle)	100,0	100,0	241	100,0	365	1	0,27
1	99,6	101,5	269	87,1	795	18	2,26
2	99,2	94,7	281	63,0	836	43	5,14
3	98,8	78,8	265	32,1	743	65	8,75
0+C	96,7	106,0	323	100,3	961	8	0,83
1+C	99,2	101,0	449	89,6	1340	57	4,25
2+C	99,2	98,2	342	56,9	1008	96	9,52
3+C	96,5	66,2	159	34,2	398	28	7,04
$0+EMS_1$	99,0	84,8	281	42,7	734	195	26,57
$1+EMS_1$	100,2	79,8	85	28,6	217	43	19,82
$2+EMS_1$	98,8	79,7	126	18,5	266	60	22,56
$3+EMS_1$	100,8	52,4	77	6,3	85	18	21,18
$0+C+EMS_1$	99,6	76,7	165	68,0	482	119	24,69
$1+C+EMS_1$	97,8	87,6	110	53,8	318	65	20,44
$2+C+EMS_1$	98,2	79,6	68	42,4	187	38	20,32
$3+C+EMS_1$	99,8	57,0	97	19,3	252	55	21,83
$0+EMS_2$	99,3	76,9	76	43,1	113	25	20,35
$1+EMS_2$	96,5	74,2	107	32,1	179	35	19,55
$2+EMS_2$	90,1	55,6	56	18,1	57	6	10,53
$3+EMS_2$	65,5	37,8	3	6,7	3	1	33,33

(continua)

Tabela 4 - (continuação)

Tratamento	Germinação	Altura das plântulas	Nº de sobreviventes	Fertilidade	Nº das panículas germinadas	Nº de mutações de clorofila observadas	Nº de mutações de clorofila por 100 panículas germinadas
$0+C+EMS_2$	98,1	75,9	63	21,0	105	17	16,19
$1+C+DMS_2$	98,2	73,0	84	25,6	80	13	16,25
$2+C+EMS_2$	95,1	54,8	41	20,7	37	11	29,73
$3+C+EMS_2$	90,1	48,8	8	3,4	8	6	75,00
$0+EMS_3$	69,2	42,8	21	48,2	36	9	25,00
$1+EMS_3$	64,4	42,5	29	32,3	35	8	22,86
$2+EMS_3$	55,9	39,0	6	11,3	7	2	28,57
$3+EMS_3$	19,6	14,0	0	-	-	-	-
$0+C+EMS_3$	83,0	62,9	10	36,7	10	4	40,00
$1+C+EMS_3$	81,6	63,0	19	10,2	7	3	42,86
$2+C+EMS_3$	78,8	44,8	21	2,9	3	2	66,67
$3+C+EMS_3$	61,5	41,0	4	4,8	4	0	0,00
$0+EMS_4$	34,2	41,0	3	2,3	7	5	71,43
$1+EMS_4$	27,9	23,8	0	-	-	-	-
$2+EMS_4$	10,5	15,1	0	-	-	-	-
$3+EMS_4$	4,8	11,1	0	-	-	-	-
$0+C+EMS_4$	50,8	49,0	5	3,3	3	0	0,00
$1+C+EMS_4$	45,9	48,0	5	2,3	5	2	40,00
$2+C+EMS_4$	45,4	47,4	2	-	-	-	-
$3+C+EMS_4$	31,8	30,9	0	-	-	-	-

0 ... sem irradiação
1 ... irradiação de 10KR de raios-gama
2 ... irradiação de 20KR de raios-gama
3 ... irradiação de 30KR de raios-gama
C ... tratamento com cisteína, $1x10^{-3}M$, por 24 horas

EMS_1 ... tratamento com EMS, 0,50%, por 10 horas
EMS_2 ... tratamento com EMS, 1,00%, por 10 horas
EMS_3 ... tratamento com EMS, 1,50%, por 10 horas
EMS_4 ... tratamento com EMS, 2,00%, por 10 horas

Tabela 5 - Resultados gerais da combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e DS.

Tratamento	Germinação	Altura das plântulas	Nº de sobreviventes	Fertilidade	Nº das panículas germinadas	Nº de mutações de clorofila observadas	Nº de mutações de clorofila por 100 panículas germinadas
0 (contrôle)	100,0	100,0	70	100,0	190	0	0,00
1	100,2	98,6	65	83,8	181	9	4,97
2	98,5	96,8	36	57,8	92	5	5,43
3	98,7	74,6	24	29,8	57	8	14,04
0+C	96,9	103,1	315	93,1	937	3	0,32
1+C	100,2	114,6	378	94,1	1124	44	3,91
2+C	98,0	105,2	333	63,8	958	61	6,37
3+C	97,2	79,5	210	33,3	536	37	6,90
$0+DS_1$	99,2	119,3	81	91,4	236	4	1,69
$1+DS_1$	98,5	90,1	35	83,3	97	3	3,09
$2+DS_1$	97,5	77,7	30	51,3	70	7	10,00
$3+DS_1$	98,2	87,1	44	52,0	101	7	6,93
$0+C+DS_1$	100,2	89,4	60	85,3	132	9	6,82
$1+C+DS_1$	97,0	99,1	48	75,7	121	10	8,26
$2+C+DS_1$	97,0	100,1	63	55,5	148	7	4,73
$3+C+DS_1$	95,8	79,0	18	34,9	45	6	13,33
$0+DS_2$	97,1	83,0	246	96,3	732	24	3,28
$1+DS_2$	99,1	80,6	152	89,7	450	26	5,78
$2+DS_2$	98,3	68,6	188	46,1	556	63	11,33
$3+DS_2$	96,1	57,4	97	27,6	253	23	9,09

(continua)

Tabela 5 - (continuação)

Tratamento	Germinação	Altura das plântulas	Nº de sobreviventes	Fertilidade	Nº de panículas germinadas	Nº de mutações de clorofila observadas	Nº de mutações de clorofila por 100 panículas germinadas
$0+C+DS_2$	98,7	78,2	129	94,2	378	13	3,44
$1+C+DS_2$	98,1	81,2	87	85,3	261	22	8,43
$2+C+DS_2$	98,5	81,5	187	62,8	561	46	8,20
$3+C+DS_2$	96,7	63,3	120	38,6	317	18	5,68
$0+DS_3$	97,7	114,2	51	100,0	124	0	0,00
$1+DS_3$	98,0	110,6	58	73,9	150	11	7,33
$2+DS_3$	99,2	93,4	38	60,6	86	10	11,63
$3+DS_3$	98,2	89,7	15	34,4	33	5	15,15
$0+C+DS_3$	88,2	86,7	16	93,9	42	0	0,00
$1+C+DS_3$	94,1	86,2	52	82,7	123	4	3,25
$2+C+DS_3$	98,5	92,6	41	55,9	96	9	9,38
$3+C+DS_3$	95,4	59,8	13	27,8	33	3	9,09
$0+DS_4$	98,6	88,5	47	95,8	100	3	3,00
$1+DS_4$	98,7	107,7	19	74,0	40	7	17,50
$2+DS_4$	95,9	90,9	56	49,8	124	7	5,65
$3+DS_4$	90,3	67,1	30	32,3	65	2	3,08
$0+C+DS_4$	69,9	77,5	31	90,4	84	11	13,10
$1+C+DS_4$	77,0	85,6	22	82,1	66	8	12,12
$2+C+DS_4$	88,5	82,8	48	54,4	101	16	15,84
$3+C+DS_4$	87,8	66,4	27	45,3	62	4	6,45

0 ... sem irradiação
1 ... irradiação de 10KR de raios-gama
2 ... irradiação de 20KR de raios-gama
3 ... irradiação de 30KR de raios-gama
C ... tratamento com cisteína, $1x10^{-3}M$, por 24 horas

DS_1 ... tratamento com DS, 0,30%, por 4 horas
DS_2 ... tratamento com DS, 0,46%, por 3 horas
DS_3 ... tratamento com DS, 0,50%, por 4 horas
DS_4 ... tratamento com DS, 0,70%, por 4 horas

Tabela 6 - Espectro de mutação de clorofila.

	Tratamento	albina	viridis	outras	total	taxa de albina
Exp.1	0	1	0	1	2	0,5000
	1	30	6	10	46	0,6522
	2	28	7	11	46	0,6087
	3	22	8	10	40	0,5500
	0+C	6	0	8	14	0,4286
	1+C	33	7	12	52	0,6346
	2+C	43	18	13	74	0,5811
	3+C	27	5	14	46	0,5870
	0+EO	21	7	4	32	0,6563
	1+EO	51	12	18	81	0,6296
	2+EO	14	4	7	25	0,5600
	3+EO	--	--	--	--	
	0+C+EO	6	3	9	18	0,3333
	1+C+EO	18	0	12	30	0,6000
	2+C+EO	35	8	11	54	0,6481
	3+C+EO	6	4	9	19	0,3158
Exp.2	0	1	1	0	2	0,5000
	1	30	11	13	54	0,5556
	2	35	14	20	69	0,5072
	3	12	6	11	29	0,4138
	0+C	3	0	1	4	0,7500
	1+C	24	12	14	50	0,4800
	2+C	33	9	14	56	0,5893
	3+C	28	8	14	50	0,5600
	0+EI	38	9	23	70	0,5429
	1+EI	63	23	26	112	0,5625
	2+EI	73	24	21	118	0,6186
	3+EI	12	1	11	24	0,5000
	0+C+EI	24	6	10	40	0,6000
	1+C+EI	39	21	31	91	0,4286
	2+C+EI	51	19	23	93	0,5484
	3+C+EI	19	3	5	27	0,7037
Exp.3	0	1	0	0	1	1,0000
	1	7	4	7	18	0,3889
	2	25	5	13	43	0,5814
	3	42	7	16	65	0,6462
	0+C	1	3	4	8	0,1250
	1+C	35	12	10	57	0,6140
	2+C	53	18	25	96	0,5521
	3+C	20	2	6	28	0,7143
	$0+EMS_1$	103	33	59	195	0,5282
	$1+EMS_1$	22	6	15	43	0,5116
	$2+EMS_1$	35	12	13	60	0,5833
	$3+EMS_1$	10	4	4	18	0,5556
	$0+C+EMS_1$	56	18	45	119	0,4706
	$1+C+EMS_1$	32	12	22	66	0,4848
	$2+C+EMS_1$	21	12	5	38	0,5526
	$3+C+EMS_1$	24	16	15	55	0,4364

(continua)

Tabela 6 - (continuação)

	Tratamento	albina	viridis	outras	total	taxa de albina
Exp.3	$0+EMS_2$	5	5	13	23	0,2174
	$1+EMS_2$	19	5	11	35	0,5429
	$2+EMS_2$	2	1	3	6	0,3333
	$3+EMS_2$	1	0	0	1	1,0000
	$0+C+EMS_2$	9	3	5	17	0,5294
	$1+C+EMS_2$	7	3	3	13	0,5385
	$2+C+EMS_2$	1	6	4	11	0,0909
	$3+C+EMS_2$	1	2	3	6	0,1667
	$0+EMS_3$	6	1	2	9	0,6667
	$1+EMS_3$	3	5	0	8	0,3750
	$2+EMS_3$	0	2	0	2	0,0000
	$3+EMS_3$	-	-	-	-	----
	$0+C+EMS_3$	2	0	2	4	0,5000
	$1+C+EMS_3$	0	3	0	3	0,0000
	$2+C+EMS_3$	0	1	1	2	0,0000
	$3+C+EMS_3$	0	0	0	0	----
	$0+EMS_4$	5	0	0	5	1,0000
	$1+EMS_4$	-	-	-	-	----
	$2+EMS_4$	-	-	-	-	----
	$3+EMS_4$	-	-	-	-	----
	$0+C+EMS_4$	0	0	0	0	----
	$1+C+EMS_4$	1	0	1	2	0,5000
	$2+C+EMS_4$	-	-	-	-	----
	$3+C+EMS_4$					
Exp.4	0	0	0	0	0	----
	1	2	0	7	9	0,2000
	2	3	1	1	5	0,6000
	3	4	1	3	8	0,5000
	0+C	0	3	0	3	0,0000
	1+C	21	8	15	44	0,4773
	2+C	38	13	10	61	0,6230
	3+C	20	14	3	37	0,5405
	$0+DS_1$	2	0	2	4	0,5000
	$1+DS_1$	1	0	2	3	0,3333
	$2+DS_1$	4	2	1	7	0,5714
	$3+DS_1$	5	2	0	7	0,7143
	$0+C+DS_1$	3	3	3	9	0,3333
	$1+C+DS_1$	7	2	1	10	0,7000
	$2+C+DS_1$	6	0	1	7	0,8571
	$3+C+DS_1$	3	1	2	6	0,5000
	$0+DS_2$	9	5	10	24	0,3750
	$1+DS_2$	13	6	7	26	0,5000
	$2+DS_2$	28	10	25	63	0,4444
	$3+DS_2$	10	5	8	23	0,4348
	$0+C+DS_2$	7	2	4	13	0,5385
	$1+C+DS_2$	13	3	6	22	0,5909
	$2+C+DS_2$	26	3	17	46	0,5652
	$3+C+DS_2$	12	4	2	18	0,6667

(continua)

Tabela 6 - (continuação)

	Tratamento	albina	viridis	outras	total	taxa de albina
Exp.4	$0+DS_3$	0	0	0	0	----
	$1+DS_3$	7	2	2	11	0,6364
	$2+DS_3$	4	2	4	10	0,4000
	$3+DS_3$	3	1	1	5	0,6000
	$0+C+DS_3$	0	0	0	0	----
	$1+C+DS_3$	2	1	1	4	0,5000
	$2+C+DS_3$	7	0	2	9	0,7778
	$3+C+DS_3$	2	1	0	3	0,6667
	$0+DS_4$	3	0	0	3	1,0000
	$1+DS_4$	2	4	1	7	0,2857
	$2+DS_4$	6	0	1	7	0,8571
	$3+DS_4$	0	0	2	2	0,0000
	$0+C+DS_4$	8	0	3	11	0,7273
	$1+C+DS_4$	3	3	2	8	0,3750
	$2+C+DS_4$	11	2	3	16	0,6875
	$3+C+DS_4$	2	1	1	4	0,5000

0 ..... sem irradiação

1 ..... irradiação de 10 KR de raios-gama

2 ..... irradiação de 20 KR de raios-gama

3 ..... irradiação de 30 KR de raios-gama

C ..... tratamento com cisteína, 1×10^{-3}M : 45 hrs. no Exp.1, 30 hrs. no Exp.2 e 24 hrs. nos Exps. 3 e 4

EO ..... tratamento com EO, 0,15%, por 10 hrs.

EI ..... tratamento com EI, 0,05%, por 10 hrs.

EMS_1, EMS_2, EMS_3, EMS_4 . tratamento com EMS, 0,50%, 1,00%, 1,50%, 2,00%, respectivamente, por 10 hrs.

DS_1, DS_2, DS_3, DS_4 .... tratamento com DS, 0,30% por 4 hrs, 0,46% por 3 hrs., 0,50% por 4 hrs., 0,7% por 4 hrs, respectivamente

Tabela 7 - Dosagens ou concentrações diferentes dos mutagênicos e espectro de mutação de clorofila.

	Tratamento	X^2	G.L.	P.
Exp.1	1 2 3	1,15	4	0,8-0,9
	1+C 2+C 3+C	5,86	4	0,2-0,3
	1+EO 2+EO	0,45	2	0,5-0,7
	1+C+EO 2+C+EO 3+C+EO	6,47	2^+	0,02-0,05
Exp.2	1 2 3	1,97	4	0,7-0,8
	1+C 2+C 3+C	1,86	4	0,7-0,8
	1+EI 2+EI 3+EI	1,49	2^+	0,3-0,5
	1+C+EI 2+C+EI 3+C+EI	7,27	4	0,1-0,2
Exp.3	1 2 3	4,17	4	0,3-0,5
	1+C 2+C 3+C	4,37	4	0,3-0,5

(continua)

	Tratamento	X^2	G.L.	P
(continuação)	$1+EMS_1$ $2+EMS_1$ $3+EMS_1$	0,53	2^+	0,7-0,8
	$1+C+EMS_1$ $2+C+EMS_1$ $3+C+EMS_1$	6,59	4	0,1-0,2
	$0+EMS_1$ $0+EMS_2$	7,94	1^+	0,001-0,01
	$1+EMS_1$ $1+EMS_2$	0,08	1^+	0,7-0,8
	$0+C+EMS_1$ $0+C+EMS_2$	0,50	2	0,7-0,8
	$1+C+EMS_1$ $1+C+EMS_2$	0,12	1^+	0,7-0,8
Exp.4	1+C 2+C 3+C	12,10	4	0,01-0,02
	$1+DS_2$ $2+DS_2$ $3+DS_2$	0,28	2^+	0,8-0,9
	$1+C+DS_2$ $2+C+DS_2$ $3+C+DS_2$	0,56	2^+	0,7-0,8
	$1+DS_2$ $1+DS_3$	0,58	1^+	0,3-0,5
	$2+C+DS_2$ $2+C+DS_4$	0,74	1^+	0,3-05

+ ... Eventualmente, devido à baixa freqüência esperada de certo tipo de mutação, a análise foi feita considerando-se apenas duas classes.

(N.B. ... Sòmente os tratamentos com mais de 50 panículas R_1 germinadas foram considerados.)

Tabela 8 - Ambiente diferente e espectro de mutação de clorofila.

Ano	Tratamento	X^2	G.L.	P
1965 1966 1967	1 1 1	4,15	4	0,3 - 0,5
1965 1966 1967	2 2 2	2,20	4	0,7
1965 1966 1967	3 3 3	5,30	4	0,2 - 0,3
1965 1966 1967 1968	R R R R	10,41	6	0,1 - 0,2

Tabela 9 - Mutagênicos químicos e espectro de mutação de clorofila.

	Tratamento	X^2	G.L.	P
Exp.1	R EO	2,08	2	0,3 - 0,5
Exp.2	R EI	1,88	2	0,3 - 0,5
Exp.3	R EMS	2,02	2	0,3 - 0,5
Exp.4	R DS	0,09	1+	0,7 - 0,8
	R EO EI EMS DS	7,89	8	0,3 - 0,5

+ ... A análise foi feita sôbre as duas classes de mutação de clorofila.

Tabela 10 - Pós-tratamento com cisteína e espectro de mutação de clorofila.

	Tratamento	X^2	G.L.	P
Exp.1	R R+C(45 hrs.)	0,10	2	0,9 <
Exp.2	R R+C(30 hrs.)	0,45	2	0,8
Exps. 3 e 4	R R+C(24 hrs.)	8,67	2	0,01-0,02
Exp.1 Exp.2 Exps. 3 e 4	R+C(45 hrs.) R+C(30 hrs.) R+C(24 hrs.)	2,59	4	0,5 - 0,7

Tabela 11 - Tratamentos combinados com raios-gama e mutagênico químico, e espectro de mutação de clorofila.

	Tratamento	X^2	G.L.	P
Exp.1	R R+EO	0,02	2	0,9 <
Exp.2	R R+EI	2,52	2	0,2 - 0,3
Exp.3	R R+EMS	2,92	2	0,2 - 0,3
Exp.4	R R+DS	0,45	1+	0,5 - 0,7
	R+EO R+EI R+EMS R+DS	7,08	6	0,3 - 0,5

+ ... A análise foi feita sôbre as duas classes de mutação de clorofila.

Tabela 12 - Tratamentos combinados com cisteína e mutagênico químico, e espectro de mutação de clorofila.

	Tratamento	X^2	G.L.	P
Exp.1	R C+EO	4,83	1+	0,02-0,05
Exp.2	R C+EI	1,19	2	0,5 - 0,7
Exp.3	R C+EMS	3,21	2	0,2 - 0,3
Exp.4	R C+DS	0,98	1+	0,3 - 0,5
	C+EO C+EI C+EMS C+DS	4,12	3+	0,2 - 0,3

+ ... A análise foi feita sôbre as duas classes de mutação de clorofila.

Tabela 13 - Tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e mutagênico químico, e espectro de mutação de clorofila.

	Tratamento	X^2	G.L.	P
Exp.1	R R+C+EO	2,11	2	0,3 - 0,5
Exp.2	R R+C+EI	0,06	2	0,9 <
Exp.3	R R+C+EMS	11,39	2	0,001-0,01
Exp.4	R R+DS	3,34	1+	0,05 - 0,1
	R+C+EO R+C+EI R+C+EMS R+C+DS	19,81	6	0,001-0,01

+ ... A análise foi feita sôbre as duas classes de mutação de clorofila.

Tabela 14 - Taxas de albina, viridis e outras dos tratamentos combinados com raios-gama, cisteína e mutagênico químico.

Tratamento	albina	víridis	outras
R+C+EO	0,5728	0,1165	0,3107
R+C+EI	0,5166	0,2038	0,2796
R+C+EMS	0,4439	0,2806	0,2755
R+C+DS	0,6144	0,1307	0,2549
X^2	11,14	17,32	1,02
P	0,01-0,02	<0,001	0,7-0,8

Tabela 15 - Resultados gerais de taxa de segregação.

	Tratamento	Nº de mutantes R_2	Nº total de plântulas R_2 das panículas segregadas	Taxa de segregação	Fertilidade das panículas R_1 (%)
Exp.1	0	2	346 (2)	0,0058	87,6
	1	585	5008 (40)	0,1168	71,8
	2	711	3758 (43)	0,1892 ***	54,3
	3	435	2685 (37)	0,1620 **	39,8
	0+C	129	1217 (13)	0,1060	79,9
	1+C	603	4924 (49)	0,1225 ns	63,8
	2+C	642	4076 (63)	0,1575 ***	45,5
	3+C	501	2808 (39)	0,1784 *	36,3
	0+EO	373	3517 (31)	0,1061	79,3
	1+EO	873	6835 (76)	0,1277 ***	61,6
	2+EO	153	750 (24)	0,2040 ***	37,9
	0+C+EO	143	1890 (17)	0,0757	78,8
	1+C+EO	270	2895 (29)	0,0933 *	59,1
	2+C+EO	538	3612 (48)	0,1489 ***	49,0
	3+C+EO	72	415 (15)	0,1735 ns	30,6
Exp.2	0	2	245 (2)	0,0082	78,6
	1	426	4748 (49)	0,0897	63,7
	2	530	4221 (60)	0,1256 ***	51,8
	3	121	793 (18)	0,1526 *	27,1
	0+C	28	549 (4)	0,0515	79,1
	1+C	446	4463 (47)	0,0999 ***	65,7
	2+C	576	3950 (52)	0,1458 ***	45,9
	3+C	372	3178 (46)	0,1171 ***	34,2
	0+EI	416	8798 (69)	0,0473	78,4
	1+EI	890	8713 (98)	0,1021 ***	65,4
	2+EI	754	6754(109)	0,1116 ns	40,1
	3+EI	127	774 (22)	0,1641 ***	26,6
	0+C+EI	267	4644 (37)	0,0575	79,4
	1+C+EI	587	7668 (83)	0,0766 ***	59,4
	2+C+EI	552	5044 (86)	0,1094 ***	44,8
	3+C+EI	99	888 (26)	0,1115 ns	25,8
Exp.3	0	1	163 (1)	0,0061	84,8
	1	120	1122 (17)	0,1070	73,8
	2	348	2466 (40)	0,1411 **	53,4
	3	265	2108 (58)	0,1257 ns	27,2
	0+C	121	877 (8)	0,1380	85,0
	1+C	361	3999 (54)	0,0903	75,9
	2+C	599	4372 (91)	0,1370 ***	48,3
	3+C	201	1141 (28)	0,1762 ***	29,0
	$0+EMS_1$	881	7187(164)	0,1226	36,2
	$1+EMS_1$	162	912 (35)	0,1776 ***	24,2
	$2+EMS_1$	263	1349 (56)	0,1950 ns	15,7
	$3+EMS_1$	56	320 (17)	0,1750 ns	5,3

(continua)

Tabela 15 - (continuação)

	Tratamento	Nº de mutantes R_2	Nº total de plântulas R_2 das panículas segregadas	Taxa de segregação	Fertilidade das panículas R_1 (%)
Exp.3	$0+C+EMS_1$	656	5685 (93)	0,1154) ***	57,7
	$1+C+EMS_1$	449	2850 (55)	0,1575) ***	45,6
	$2+C+EMS_1$	241	1984 (34)	0,1215) ***	36,0
	$3+C+EMS_1$	244	1145 (45)	0,2131	16,4
	$0+EMS_2$	76	561 (18)	0,1355) **	36,5
	$1+EMS_2$	197	1032 (32)	0,1909	27,2
	$2+EMS_2$	35	235 (6)	0,1489	15,3
	$3+EMS_2$	1	8 (1)	0,1250	5,7
	$0+C+EMS_2$	68	341 (16)	0,1994) ns	17,8
	$1+C+EMS_2$	37	234 (13)	0,1581	21,7
	$2+C+EMS_2$	36	207 (9)	0,1739	17,6
	$3+C+EMS_2$	7	11 (4)	0,6364	2,9
	$0+EMS_3$	28	120 (8)	+ 0,2333	40,8
	$1+EMS_3$	64	211 (8)	+ 0,3033	27,4
	$2+EMS_3$	26	108 (2)	+ 0,2407	9,6
	$0+C+EMS_3$	8	70 (3)	0,1143	31,1
	$1+C+EMS_3$	8	51 (3)	+ 0,1569	8,7
	$2+C+EMS_3$	16	74 (2)	+ 0,2162	2,5
	$3+C+EMS_3$	-	- -	-	4,1
	$0+EMS_4$	89	306 (5)	+ 0,2908	2,0
	$0+C+EMS_4$	-	- -	-	2,8
	$1+C+EMS_4$	3	3 (2)	1,0000	2,0
Exp.4	0	-	- -	-	85,3
	1	43	877 (9)	0,0490	71,4
	2	24	121 (5)	+ 0,1983	49,3
	3	21	327 (7)	0,0642	25,4
	0+C	36	195 (3)	0,1846	79,3
	1+C	260	3805 (42)	0,0683) ***	80,2
	2+C	360	3522 (56)	0,1022) ***	54,4
	3+C	261	1350 (33)	0,1933	28,4
	$0+DS_1$	11	505 (4)	0,0218	77,9
	$1+DS_1$	14	281 (3)	0,0498	71,0
	$2+DS_1$	30	295 (7)	0,1017	43,7
	$3+DS_1$	89	513 (7)	0,1735	44,4
	$0+C+DS_1$	91	569 (8)	0,1599	72,8
	$1+C+DS_1$	87	698 (8)	0,1246	64,6
	$2+C+DS_1$	54	477 (7)	0,1132	47,3
	$3+C+DS_1$	22	308 (6)	0,0714	29,8
	$0+DS_2$	179	2186 (22)	0,0819) ns	82,1
	$1+DS_2$	256	2089 (25)	0,1225) ns	76,5
	$2+DS_2$	499	3734 (58)	0,1336) ns	39,3
	$3+DS_2$	132	837 (22)	0,1577	23,5

(continua)

Tabela 15 - (continuação)

	Tratamento	Nº de mutantes R_2	Nº total de plântulas R_2 das panículas segregadas	Taxa de segregação	Fertilidade das panículas R_1 (%)
Exp.4	$0+C+DS_2$	75	949 (12)	0,0790) xx	80,4
	$1+C+DS_2$	194	1727 (21)	0,1123) ns	72,8
	$2+C+DS_2$	338	3015 (45)	0,1121) ns	53,6
	$3+C+DS_2$	80	582 (18)	0,1375	32,9
	$0+DS_3$	-	- -	-	85,3
	$1+DS_3$	189	1073 (11)	0,1761) x	63,0
	$2+DS_3$	114	847 (10)	0,1346	51,7
	$3+DS_3$	25	304 (5)	0,0822	29,3
	$0+C+DS_3$	-	- -	-	80,0
	$1+C+DS_3$	27	366 (4)	0,0738	70,5
	$2+C+DS_3$	60	451 (9)	0,1330	47,6
	$3+C+DS_3$	17	108 (3)	0,1574	23,7
	$0+DS_4$	34	340 (3)	0,1000	81,7
	$1+DS_4$	49	300 (4)	0,1633	63,0
	$2+DS_4$	56	414 (7)	0,1353	42,5
	$3+DS_4$	4	41 (2)	0,0976	27,5
	$0+C+DS_4$	77	885 (11)	0,0870	77,0
	$1+C+DS_4$	25	572 (6)	0,0437	69,9
	$2+C+DS_4$	78	897 (14)	0,0870	46,4
	$3+C+DS_4$	10	104 (4)	0,0962	38,6

( ) ... Número das panículas segregadas.

x, xx, xxx ... significativo ao nível de 5%, 1% e 0,1%, respectivamente.

ns ... não significativo.

\+ ... Mostrou-se concordância com a segregação monofatorial 0,2500.

Tabela 16 - Ambiente diferente e taxa de segregação.

Ano	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		média
1965	0,1168		0,1892		0,1620		0,1512
1966	0,0897	xxx	0,1256	xxx	0,1526	xxx	0,1103 xxx
1967	0,1070		0,1411		0,1257		0,1287
média	0,1040	xxx	0,1521	ns	0,1470		
Ano	1 + C		2 + C		3 + C		média
1967	0,0903	xxx	0,1370	xxx	0,1762	ns	0,1229 xxx
1968	0,0683		0,1022		0,1933		0,1015
média	0,0796	xxx	0,1215	xxx	0,1855		

xxx ... significativo ao nível de 0,1%.
ns ... não significativo.

Tabela 17 - Pós-tratamento com cisteína e taxa de segregação.

Ano \ Trat.	1 + C		2 + C		3 + C		média
1965 (C..45 hrs)	0,1225	xxx	0,1575	ns	0,1784	xxx	0,1479 xxx
1966 (C..30 hrs)	0,0999	xxx	0,1458	xxx	0,1171	xxx	0,1203 ns
1967 (C..24 hrs)	0,0796		0,1215		0,1855		0,1221

xxx ... significativo ao nível de 0,1%.
ns ... não significativo.

Tabela 18 - Efeito do tratamento intercalado com cisteína sôbre a taxa de segregação.

Exp.1	O+EO	0,1061	***	Exp.2	O+EI	0,0473	*
	O+C+EO	0,0757			O+C+EI	0,0575	
	R+EO	0,1353	ns		R+EI	0,1090	***
	R+C+EO	0,1271			R+C+EI	0,0910	
Exp.3	$O+EMS_1$	0,1226	ns	Exp.4	$R+DS_1$	0,1212	ns
	$O+C+EMS_1$	0,1154			$R+C+DS_1$	0,1099	
	$R+EMS_1$	0,1864	***		$O+DS_2$	0,0819	ns
	$R+C+EMS_1$	0,1562			$O+C+DS_2$	0,0790	
	$O+EMS_2$	0,1355	*		$R+DS_2$	0,1332	**
	$O+C+EMS_2$	0,1994			$R+C+DS_2$	0,1150	
	$R+EMS_2$	0,1827	ns		$R+DS_3$	0,1475	**
	$R+C+EMS_2$	0,1770			$R+C+DS_3$	0,1124	
	$R+EMS_3$	0,2821	*		$R+DS_4$	0,1444	***
	$R+C+EMS_3$	0,1920			$R+C+DS_4$	0,0718	

***, **, * ... significativo ao nível de 0,1%, 1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

Tabela 19 - Teste de sinal dos vários tratamentos com cisteína.

Experimento	Nº de sinal(+)	Nº de sinal(-)	X^2	P
Exp.1 (C.. 45 hrs)	3	13	5,06	0,02-0,05
Exp.2 (C.. 30 hrs)	12	3	4,26	0,02-0,05
Exps.3 e 4 (C.. 24 hrs)	9	7	0,063	0,8 - 0,9

Tabela 20 - Comparação das linhas de regressão de pós-tratamentos com cisteína, com a linha de regressão de tratamento com sòmente raios-gama.

	Comparação	F	P
C.. 45 hrs	(R) versus (R+C)	4,41	0,05 - 0,10
C.. 30 hrs	(R) versus (R+C)	2,69	0,10 - 0,25
C.. 24 hrs	(R) versus (R+C)	0,46	0,50 - 0,75

Tabela 21 - Efeito da combinação dos tratamentos com raios-gama e mutagênicos químicos sôbre altura das plântulas e fertilidade.

	Tratamento	EO	EI	EMS_1	EMS_2	EMS_3	EMS_4	DS_1	DS_2	DS_3	DS_4
Altura das plântulas	0	-51,3	-6,5	-15,2	-23,1	-57,2	-59,0	+19,3	-17,0	+14,2	-11,5
	1	-50,3 (-58,9)	-12,9 (-16,9)	-20,2 (-13,7)	-25,8 (-21,6)	-57,5 (-55,7)	-76,2 (-57,5)	-9,9 (+17,9)	-19,4 (-18,4)	+10,6 (+12,8)	+7,7 (-12,9)
	2	-78,3 (-82,1)	-35,6 (-45,3)	-20,3 (-20,5)	-44,4 (-28,4)	-61,0 (-62,5)	-84,9 (-64,3)	-22,3 (+16,1)	-31,4 (-20,2)	-6,6 (+11,0)	-9,1 (-14,7)
	3	---- (-100,1)	-59,2 (-59,6)	-47,6 (-36,4)	-62,2 (-44,3)	-86,0 (-78,4)	-88,9 (-80,2)	-12,9 (-6,1)	-42,6 (-42,4)	-10,3 (-11,2)	-32,9 (-36,9)
	R^2	$0,865^{ns}$	$0,988^{**}$	$0,968^{*}$	$0,956^{*}$	$0,996^{**}$	$0,983^{**}$	$0,601^{ns}$	$0,966^{*}$	$0,886^{ns}$	$0,886^{ns}$
				$0,928^{**}$				$0,787^{**}$			
Fertilidade	0	-9,5	-0,3	-57,3	-56,9	-51,8	-97,7	-8,6	-3,7	0,0	-4,2
	1	-19,7 (-27,5)	-16,8 (-19,3)	-71,4 (-70,2)	-67,9 (-69,8)	-67,7 (-64,7)	---- (-110,6)	-16,7 (-24,8)	-10,3 (-19,9)	-26,1 (-16,2)	-26,0 (-20,4)
	2	-56,7 (-47,5)	-49,0 (-34,4)	-81,5 (-94,3)	-81,9 (-93,9)	-88,7 (-88,8)	---- (-134,7)	-48,7 (-50,8)	-53,9 (-45,9)	-39,4 (-42,2)	-50,2 (-46,4)
	3	---- (-64,1)	-66,2 (-65,8)	-93,7 (-125,2)	-93,3 (-124,8)	---- (-119,7)	---- (-165,6)	-48,0 (-78,8)	-72,4 (-73,9)	-65,6 (-70,2)	-67,7 (-74,4)
	R^2	$0,993^{**}$	$0,988^{**}$	$0,945^{*}$	$0,948^{*}$	$0,962^{ns}$	-----	$0,899^{ns}$	$0,984^{**}$	$0,984^{**}$	$0,984^{**}$
				$0,949^{**}$				$0,980^{**}$			

R^2 ... coeficiente de determinação
*, ** ... significativo ao nível de 5% e 1%, respectivamente
ns ... não significativo

Tabela 22 - Efeito da combinação de tratamentos com raios-gama e mutagênico químico sôbre a freqüência de mutação de clorofila.

Tratamento		EO	EI	EMS_1	EMS_2	EMS_3	DS_1	DS_2	DS_3	DS_4
0	0,39	4,16	6,71	26,57	20,35	25,00	1,69	3,28	0,00	3,00
1	4,97	6,23 (9,13)	12,16 (11,68)	19,82 (31,54)	19,55 (25,32)	----- (29,97)	3,09 (6,66)	5,78 (8,25)	7,33 (4,97)	---- (7,97)
2	5,43	9,06 (9,59)	11,43 (12,14)	22,56 (32,00)	10,53 (25,78)	----- (30,43)	10,00 (7,12)	11,33 (8,71)	11,63 (5,43)	5,65 (8,43)
3	8,50	---- (12,66)	12,00 (15,21)	21,18 (35,07)	----- (28,85)	----- (33,50)	6,93 (10,19)	9,09 (11,78)	---- (8,50)	3,08 (11,50)
R^2		$0,959^{**}$	$0,969^{**}$	$0,922^{*}$	$0,833^{ns}$	----	$0,824^{ns}$	$0,892^{ns}$	$0,885^{ns}$	$0,560^{ns}$
				$0,875^{*}$			$0,539^{ns}$			

R^2 ... coeficiente de determinação

*, ** ... significativo ao nível de 5% e 1%, respectivamente.

ns ... não significativo

Tabela 23 - Diferença dos efeitos biológicos entre os tratamentos R+C+MQ e R+MQ.

Comparação	Altura das plântulas	Fertilidade	Freqüência de mutação de clorofila por 100 panículas
(0+C+EO) - (0+EO)	+ 9,8***	- 0,6 ns	- 2,16**
(1+C+EO) - (1+EO)	- 1,1 ns	- 2,8***	- 1,25 ns
(2+C+EO) - (2+EO)	+19,3***	+12,6***	- 0,16 ns
(3+C+EO) - (3+EO)	+23,9	+34,9	+15,20
(0+C+EI) - (0+EI)	+ 0,0 ns	+ 1,3***	- 3,02**
(1+C+EI) - (1+EI)	+ 0,3 ns	- 7,6***	- 2,50 ns
(2+C+EI) - (2+EI)	- 4,2*	+ 6,0***	- 0,83 ns
(3+C+EI) - (3+EI)	+ 1,9 ns	- 1,0 ns	+ 5,09 ns
(0+C+EMS$_1$) - (0+EMS$_1$)	- 8,1***	+25,3***	- 1,88 ns
(1+C+EMS$_1$) - (1+EMS$_1$)	+ 7,8***	+25,2***	+ 0,62 ns
(2+C+EMS$_1$) - (2+EMS$_1$)	- 0,1 ns	+23,9***	- 2,24 ns
(3+C+EMS$_1$) - (3+EMS$_1$)	+ 4,6 *	+13,0***	+ 0,65 ns
(0+C+EMS$_2$) - (0+EMS$_2$)	- 1,0 ns	-22,1***	- 4,16 ns
(1+C+EMS$_2$) - (1+EMS$_2$)	- 1,2 ns	- 6,5***	- 3,30 ns
(2+C+EMS$_2$) - (2+EMS$_2$)	- 0,8 ns	+ 2,6***	----
(3+C+EMS$_2$) - (3+EMS$_2$)	+11,0***	- 3,3***	----
(0+C+EMS$_3$) - (0+EMS$_3$)	+20,1***	-11,5***	----
(1+C+EMS$_3$) - (1+EMS$_3$)	+20,5***	-22,1***	----
(2+C+EMS$_3$) - (2+EMS$_3$)	+ 5,8 ns	- 8,4***	----
(3+C+EMS$_3$) - (3+EMS$_3$)	+27,0***	----	----
(0+C+EMS$_4$) - (0+EMS$_4$)	+ 8,0*	----	----
(1+C+EMS$_4$) - (1+EMS$_4$)	+24,2***	----	----
(2+C+EMS$_4$) - (2+EMS$_4$)	+32,0***	----	----
(3+C+EMS$_4$) - (3+EMS$_4$)	+19,8***	----	----
(0+C+DS$_1$) - (0+DS$_1$)	-29,9***	- 6,1***	+ 5,13*
(1+C+DS$_1$) - (1+DS$_1$)	+ 9,0*	- 7,6***	+ 5,17 ns
(2+C+DS$_1$) - (2+DS$_1$)	+22,4***	+ 4,2***	- 5,27 ns
(3+C+DS$_1$) - (3+DS$_1$)	- 8,1 ns	-17,1***	----
(0+C+DS$_2$) - (0+DS$_2$)	- 4,8**	- 2,1***	+ 0,16 ns
(1+C+DS$_2$) - (1+DS$_2$)	+ 0,6 ns	- 4,4***	+ 2,70 ns
(2+C+DS$_2$) - (2+DS$_2$)	+12,9***	+16,7***	- 3,13 ns
(3+C+DS$_2$) - (3+DS$_2$)	+ 5,9***	+11,0***	- 3,41 ns
(0+C+DS$_3$) - (0+DS$_3$)	-27,5***	- 6,1***	----
(1+C+DS$_3$) - (1+DS$_3$)	-24,4***	+ 8,8***	- 4,08 ns
(2+C+DS$_3$) - (2+DS$_3$)	- 0,8 ns	- 4,7***	- 2,25 ns
(3+C+DS$_3$) - (3+DS$_3$)	-29,9***	- 6,6***	----
(0+C+DS$_4$) - (0+DS$_4$)	-11,0**	- 5,4***	+10,10**
(1+C+DS$_4$) - (1+DS$_4$)	-22,1***	+ 8,1***	----
(2+C+DS$_4$) - (2+DS$_4$)	- 8,1 ns	+ 4,6***	+10,19**
(3+C+DS$_4$) - (3+DS$_4$)	- 0,7 ns	+13,0***	+ 3,37 ns

*, **, *** ... significativo ao nível de 5%, 1% e 0,1%, respectivamente.

ns ... não significativo.

Tabela 24 - Taxas de albina, viridis e outras nos tratamentos com mutagênicos.

	albina	viridis	outras	Nº total de mutações de clorofila observadas
raios-gama	55,6%	16,2%	28,2%	432
EO	65,6%	21,9%	12,5%	32
EI	54,3%	12,9%	32,9%	70
EMS	51,3%	16,8%	31,9%	232
DS	45,2%	16,1%	38,7%	31

Tabela 25 - Relação entre o número de células iniciais sobreviventes e tamanho do setor mutado ou taxa de segregação dos mutantes R_2.

Nº das células iniciais	Tamanho do setor mutado	Taxa de segregação em R_2
1	1/4	0,2500
2	1/8	0,1250
3	1/12	0,0833
4	1/16	0,0625
5	1/20	0,0500
6	1/24	0,0417

Tabela 26 - Número estimado de células iniciais sobreviventes em vários tratamentos.

Tratamento	Nº estimado	Tratamento	Nº estimado
Exp.1		Exp.2	
1	2,1	1	2,8
2	1,3	2	2,0
3	1,5	3	1,6
0+C	2,4	1+C	2,5
1+C	2,0	2+C	1,7
2+C	1,6	3+C	2,1
3+C	1,4	0+EI	5,3
0+EO	2,4	1+EI	2,5
1+EO	2,0	2+EI	2,2
2+EO	1,2	3+EI	1,5
0+C+EO	3,3	0+C+EI	4,4
1+C+EO	2,7	1+C+EI	3,3
2+C+EO	1,7	2+C+EI	2,3
3+C+EO	1,4	3+C+EI	2,2
Exp.3		Exp.4	
1	2,3	1+C	3,7
2	1,8	2+C	2,5
3	2,0	3+C	1,3
1+C	2,8	$0+DS_2$	3,1
2+C	1,8	$1+DS_2$	2,0
3+C	1,4	$2+DS_2$	1,9
$0+EMS_1$	2,0	$3+DS_2$	1,6
$1+EMS_1$	1,4	$0+C+DS_2$	3,2
$2+EMS_1$	1,3	$1+C+DS_2$	2,2
$3+EMS_1$	1,4	$2+C+DS_2$	2,2
$0+C+EMS_1$	2,2	$3+C+DS_2$	1,8
$1+C+EMS_1$	1,6	$1+DS_3$	1,4
$2+C+EMS_1$	2,1	$2+DS_3$	1,9
$3+C+EMS_1$	1,2	$0+C+DS_4$	2,9
$0+EMS_2$	1,9	$2+C+DS_4$	2,9
$1+EMS_2$	1,3		
$0+C+EMS_2$	1,3		
$1+C+EMS_2$	1,6		

Tabela 27 - Ordem de florescimento e taxa de segregação.

	Tratamento	1º	2º	3º
Exp.2	1	0,0693(3)	0,1057(1)	0,0933(2)
	2	0,1123(3)	0,1194(2)	0,1515(1)
	1+C	0,0839(3)	0,0881(2)	0,1662(1)
	2+C	0,1428(2)	0,1567(1)	0,1405(3)
	3+C	0,0918(3)	0,1367(2)	0,1550(1)
	0+EI	0,0329(2)	0,0323(3)	0,0775(1)
	1+EI	0,1014(2)	0,1159(1)	0,0903(3)
	2+EI	0,0907(3)	0,1330(1)	0,1194(2)
	0+C+EI	0,0386(3)	0,0709(1)	0,0618(2)
	1+C+EI	0,0612(3)	0,0934(1)	0,0789(2)
	2+C+EI	0,0733(3)	0,1160(1)	0,1128(2)
Exp.3	2	0,1051(3)	0,1553(2)	0,1740(1)
	3	0,1189(3)	0,1192(2)	0,1719(1)
	1+C	0,0790(3)	0,0997(1)	0,0940(2)
	2+C	0,1194(3)	0,1476(2)	0,1826(1)
	3+C	0,0995(3)	0,1965(1)	0,1929(2)
	$0+EMS_1$	0,1157(3)	0,1189(2)	0,1420(1)
	$1+EMS_1$	0,1313(3)	0,2050(2)	0,2261(1)
	$2+EMS_1$	0,1936(2)	0,2269(1)	0,1899(3)
	$0+C+EMS_1$	0,1048(3)	0,1161(2)	0,1305(1)
	$1+C+EMS_1$	0,2010(1)	0,1288(3)	0,1417(2)
	$2+C+EMS_1$	0,0999(3)	0,1194(2)	0,1432(1)
	$3+C+EMS_1$	0,2635(2)	0,1205(3)	0,2757(1)
Exp.4	1+C	0,0963(1)	0,0597(3)	0,0637(2)
	2+C	0,1000(2)	0,1102(1)	0,0877(3)
	3+C	0,2179(1)	0,1696(3)	0,1906(2)
	$2+DS_2$	0,1305(2)	0,1274(3)	0,1494(1)
	$2+C+DS_2$	0,0912(3)	0,1186(2)	0,1270(1)
Total de ordem		(71)	(51)	(46)

Teste de Friedman $X^2 = 12,50$ G.L. = 2 $0,001 < P < 0,01$

Tabela 28 - Ordem de florescimento e freqüência de mutação de clorofila.

	Tratamento	1º	2º	3º
Exp.2	1	0,0610(3)	0,0679(2)	0,0714(1)
	2	0,0965(1)	0,0958(3)	0,0959(2)
	3	0,1094(1)	0,0424(3)	0,0962(2)
	1+C	0,0865(1)	0,0603(2)	0,0313(3)
	2+C	0,1050(1)	0,0707(3)	0,0950(2)
	3+C	0,1429(1)	0,0714(3)	0,0789(2)
	0+EI	0,0784(1)	0,0517(3)	0,0729(2)
	1+EI	0,1651(1)	0,1046(2)	0,0933(3)
	2+EI	0,1267(1)	0,1040(3)	0,1108(2)
	0+C+EI	0,0327(2)	0,0517(1)	0,0271(3)
	1+C+EI	0,1021(1)	0,0883(3)	0,0993(2)
	2+C+EI	0,1070(2)	0,1168(1)	0,0919(3)
Exp.3	1	0,0404(1)	0,0114(3)	0,0128(2)
	2	0,0453(2)	0,0692(1)	0,0378(3)
	3	0,0876(2)	0,0969(1)	0,0758(3)
	1+C	0,0766(1)	0,0336(2)	0,0160(3)
	2+C	0,1382(1)	0,0706(2)	0,0625(3)
	3+C	0,0682(2)	0,0662(3)	0,0769(1)
	$0+EMS_1$	0,2910(1)	0,2500(3)	0,2523(2)
	$1+EMS_1$	0,2073(1)	0,2027(2)	0,1803(3)
	$2+EMS_1$	0,3196(1)	0,1630(3)	0,1818(2)
	$0+C+EMS_1$	0,2143(2)	0,3250(1)	0,2013(3)
	$1+C+EMS_1$	0,2281(2)	0,1524(3)	0,2323(1)
	$2+C+EMS_1$	0,1600(3)	0,2308(2)	0,2340(1)
	$3+C+EMS_1$	0,1765(3)	0,2763(1)	0,2162(2)
Exp.4	1+C	0,0461(1)	0,0325(3)	0,0392(2)
	2+C	0,0848(1)	0,0516(3)	0,0524(2)
	3+C	0,0821(2)	0,0432(3)	0,0833(1)
	$0+DS_2$	0,0411(1)	0,0320(2)	0,0266(3)
	$1+DS_2$	0,0379(3)	0,0886(1)	0,0438(2)
	$2+DS_2$	0,1287(1)	0,1053(2)	0,1037(3)
	$3+DS_2$	0,1071(2)	0,1111(1)	0,0619(3)
	$0+C+DS_2$	0,0560(1)	0,0076(3)	0,0410(2)
	$1+C+DS_2$	0,0833(2)	0,0870(1)	0,0826(3)
	$2+C+DS_2$	0,0848(2)	0,0725(3)	0,0899(1)
	$3+C+DS_2$	0,0337(3)	0,0841(1)	0,0496(2)
Total de ordem		(57)	(79)	(80)

Teste de Friedman $X^2 = 9,39$ G.L. = 2 $0,001 < P < 0,01$

Tabela 29 - Número e porcentagem de panículas R_1 com mais de duas mutações diferentes em relação à dosagem de raios-gama.

Raios-gama	Nº de panículas R_1 com mais de duas mutações de clorofila (A)	Nº de panículas R_1 com uma só mutação de clorofila (B)	$\frac{A}{A + B}$
10.000R	9	118	0,0709
20.000R	17	148	0,1043
30.000R	22	120	0,1550

$$\text{cosec } x = \frac{1}{\text{sen } x} \longrightarrow \boxed{\text{cosec } x = \pm \frac{\sec x}{\sqrt{\sec^2 x - 1}}}$$

$$\boxed{\cos x = \frac{1}{\sec x}}$$

6. <u>DA COSECANTE</u>

Da relação:

$$\text{cosec}^2 x = 1 + \cot^2 x \longrightarrow \boxed{\cot x = \pm \sqrt{\text{cosec}^2 x - 1}}$$

$$\text{tg } x = \frac{1}{\cot x} \longrightarrow \boxed{\text{tg } x = \pm \frac{1}{\sqrt{\text{cosec}^2 x - 1}}}$$

$$\cot x = \frac{\cos x}{\text{sen } x} \therefore \cos x = \text{sen} x \cdot \cot x \therefore$$

$$\cos x = \frac{1}{\text{cosec } x} \cdot \cot x \therefore \boxed{\cos x = \pm \frac{\sqrt{\text{cosec}^2 x - 1}}{\text{cosec } x}}$$

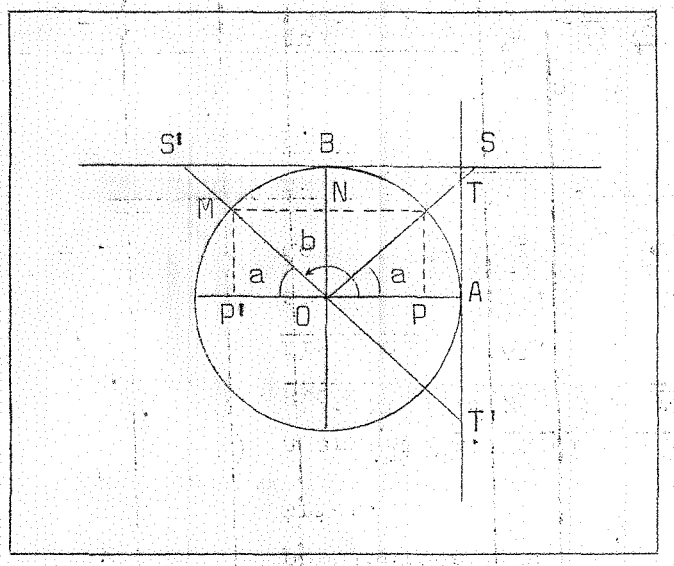
$$\sec x = \frac{1}{\cos x} \longrightarrow \boxed{\sec x = \pm \frac{\text{cosec } x}{\sqrt{\text{cosec}^2 x - 1}}}$$

$$\boxed{\text{sen } x = \frac{1}{\text{cosec } x}}$$

IX - REDUÇÃO AO 1º QUADRANTE

Se quisermos saber qual o valor de cos $34^{o}25'$, basta procurarmos nas tábuas trigonométricas e lá encontraremos cos $34^{o}25' = 0,82495$, mas se precisarmos da tg $172^{o}13'$ não encontraremos êsse valor, pois as tábuas fornecem apenas as funções trigonométricas do 1º quadrante, isto é, de 0 a 90°. Então, há necessidade de se exprimir um ângulo de qualquer quadrante em função de um ângulo do 1º quadrante, o que é sempre possível, como veremos a seguir.

1 Redução do 2º ao 1º Quadrante



Suponhamos um ângulo b do 2º quadrante, cujo suplemento é a

$b + a = 180^{o} = \pi$ rd

$b + a = \pi \therefore \boxed{b = \pi - a}$

$\text{sen } b = \text{sen } (\pi - a) = \overline{ON} = \text{sen } a$

$\cos b = \cos (\pi - a) = \overline{OP'} = -\overline{OP'} = -\cos a$

$\text{tg } b = \text{tg } (\pi - a) = \overline{AT'} = -\overline{AT} = -\text{tg } a$

$\cot b = \cot (\pi - a) = \overline{BS'} = -\overline{BS} = -\cot a$

$\sec b = \sec (\pi - a) = -\sec a$

$\text{cosec } b = \text{cosec } (\pi - a) = \text{cosec } a$

$\text{sen } (\pi - a) = \text{sen } a$	$\text{tg } (\pi - a) = -\text{tg } a$	$\sec (\pi - a) = -\sec a$
$\cos (\pi - a) = -\cos a$	$\cot (\pi - a) = -\cot a$	$\text{cosec } (\pi - a) = \text{cosec } a$

Tabela 31 - Taxa de segregação das ramificações segregadas no tratamento 1 (10KR de raios-gama) pelo método desenvolvido por Fisher.

	X^2	G.L.	P
Desvio	14,36	1	< 0,001
Heterogeneidade	26,72	19	0,1-0,2
Total	41,08	20	

Taxa de segregação experimental: 0,1903

Desvio da taxa de segregação esperada: 0,0597 ± 0,0157

Tabela 32 - Análise para a segregação monofatorial das ramificações segregadas das panículas mutadas.

Panícula	Nº de mutantes	Nº de normais	X^2	P
1	8	35	0,94	0,3-0,5
2	5	29	1,92	0,1-0,2
3	29	104	0,72	0,3-0,5
4	17	55	0,08	0,7-0,8
5	8	49	3,65	0,05-0,1
6	24	78	0,11	0,7-0,8
7	23	102	2,90	0,05-0,1
8	6	61	9,20	0,001-0,01
9	11	56	2,57	0,1-0,2
10	24	72	0,00	...

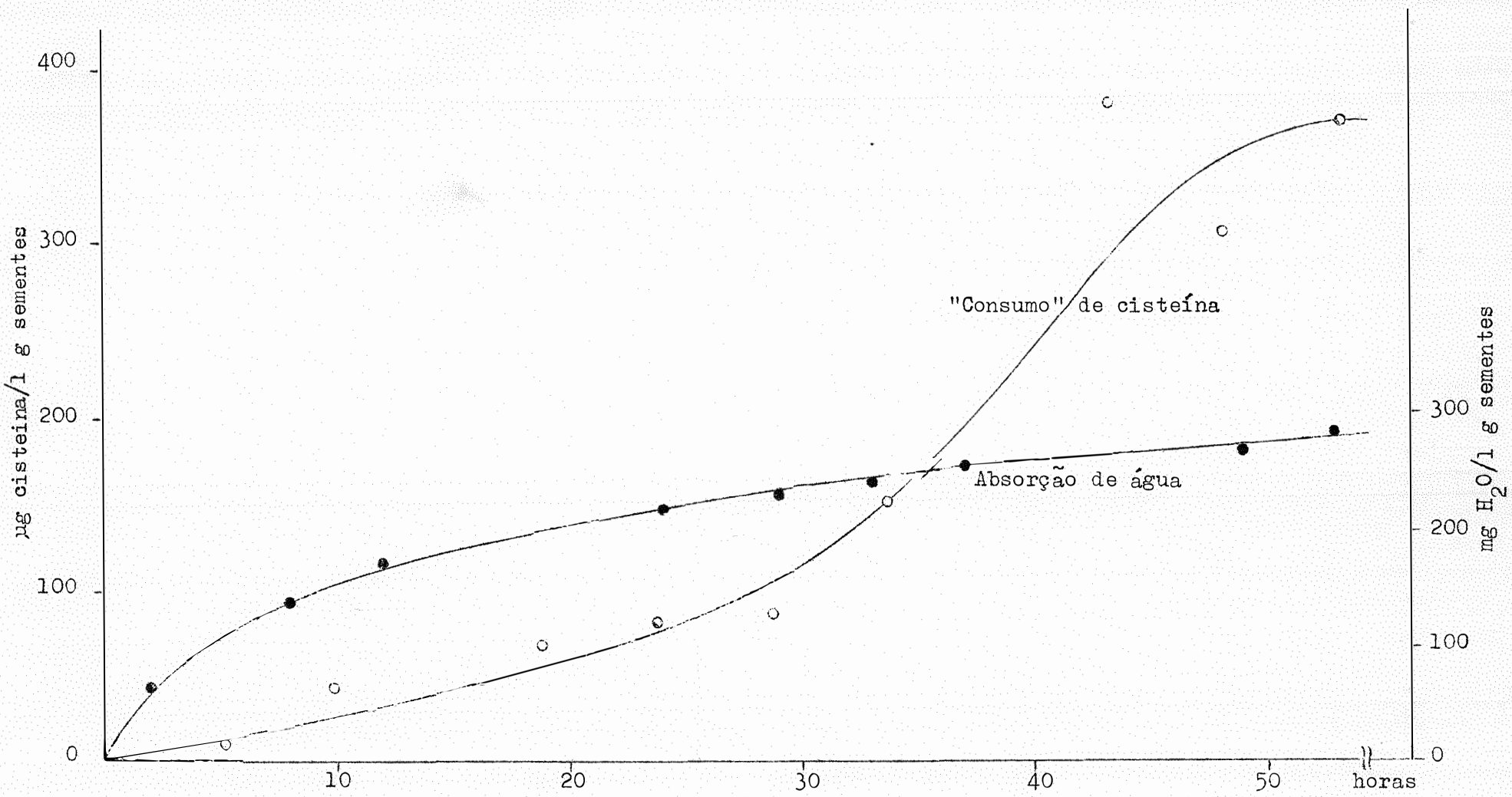


Figura 1 - Curvas de "consumo" de cisteína devido à presença de sementes e de absorção de água pelas sementes.

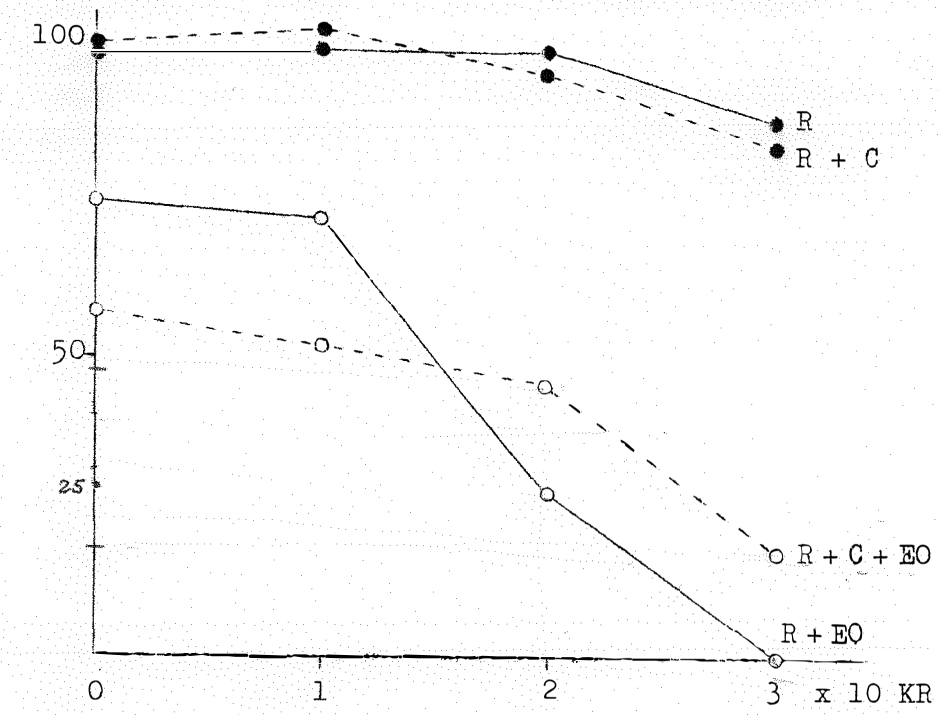


Figura 2 - Germinação das sementes na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EO.

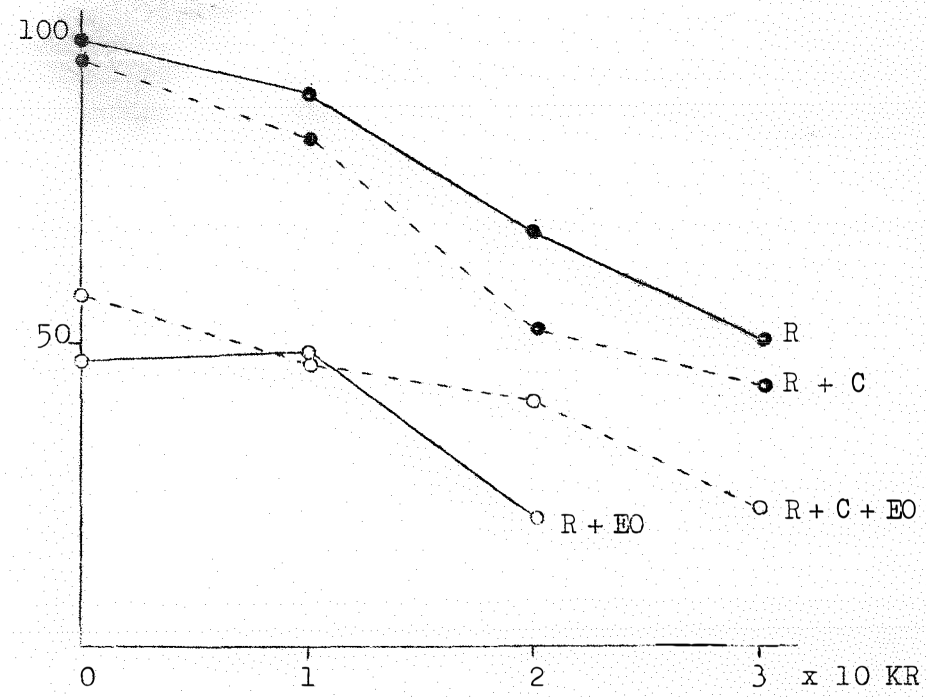


Figura 3 - Altura das plântulas na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EO.

comparação	significância
0, 0 + C	ns
1, 1 + C	ns
2, 2 + C	ns
3, 3 + C	ns
0 + EO, 0 + C + EO	***
1 + EO, 1 + C + EO	***
2 + EO, 2 + C + EO	***

comparação	significância
0, 0 + C	ns
1, 1 + C	***
2, 2 + C	***
3, 3 + C	**
0 + EO, 0 + C + EO	***
1 + EO, 1 + C + EO	ns
2 + EO, 2 + C + EO	***

***, ** ... significativo ao nível de 0,1% e 1%, respectivamente.
ns ... não significativo.

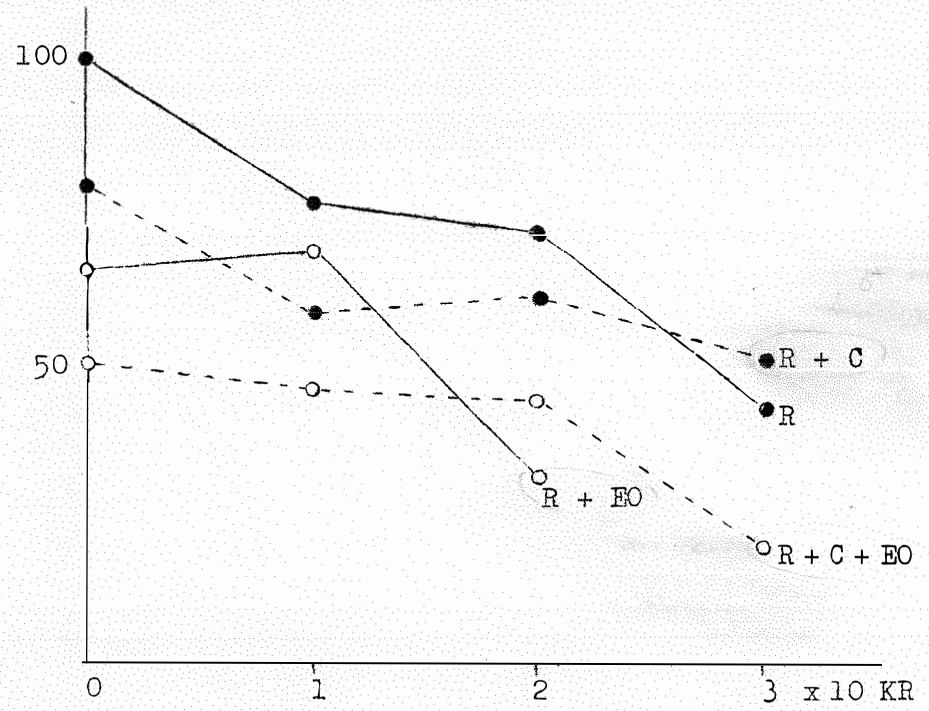


Figura 4 - Sobrevivência na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EO.

comparação	significância
0, 0 + C	***
1, 1 + C	***
2, 2 + C	*
3, 3 + C	ns
0 + EO, 0 + C + EO	**
1 + EO, 1 + C + EO	***
2 + EO, 2 + C + EO	**

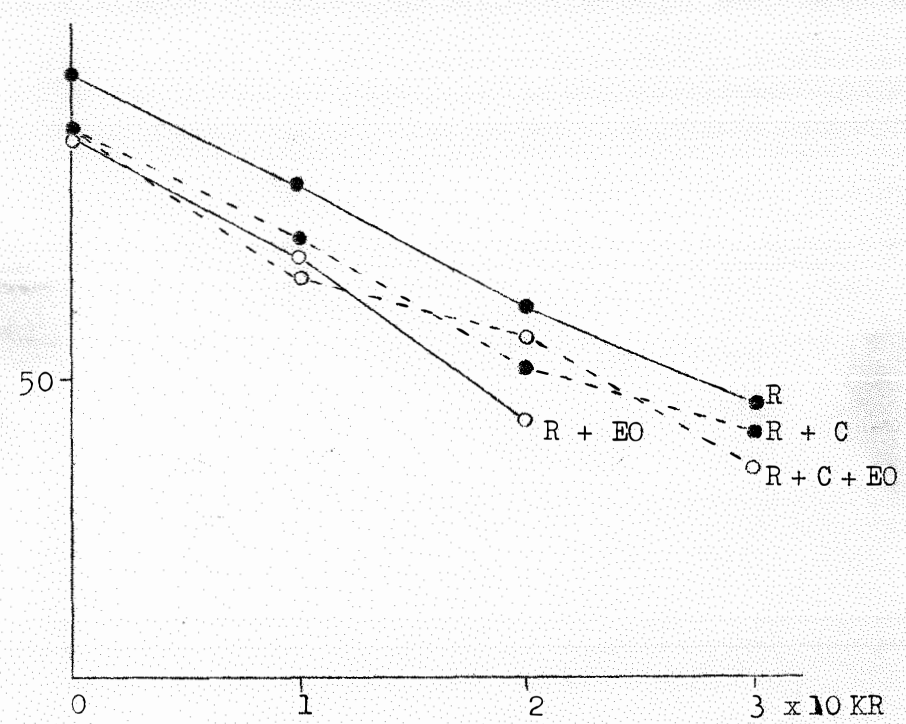


Figura 5 - Fertilidade na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EO.

comparação	significância
0, 0 + C	***
1, 1 + C	***
2, 2 + C	***
3, 3 + C	***
0 + EO, 0 + C + EO	ns
0 + EO, 1 + C + EO	***
2 + EO, 2 + C + EO	***

***, **, * ... significativo ao nível de 0,1%, 1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

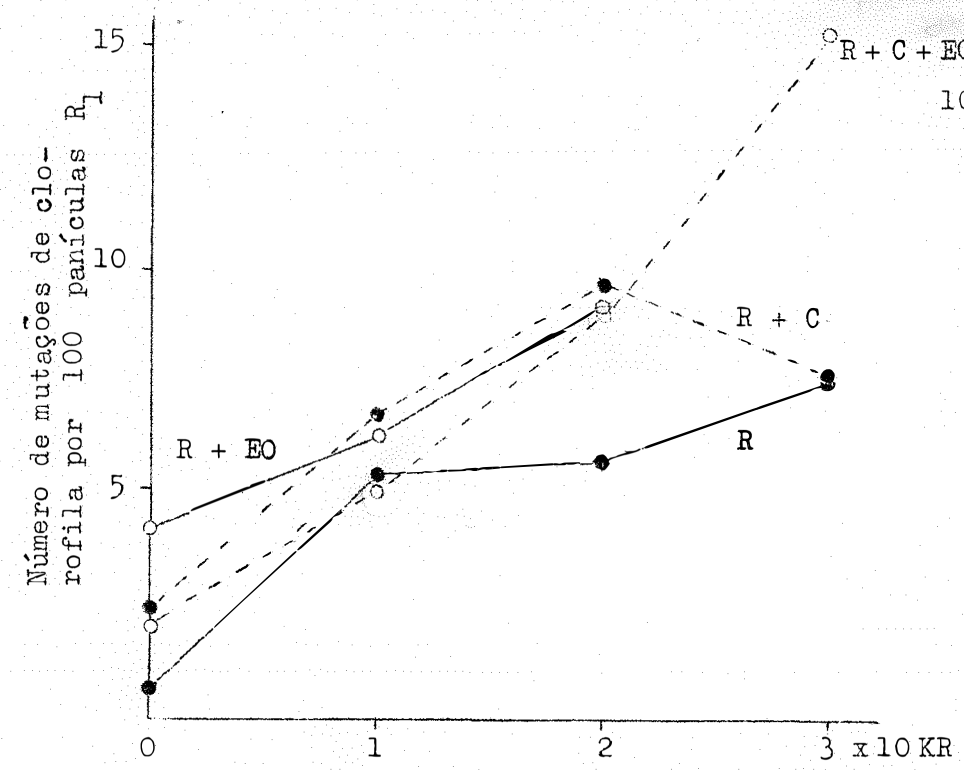


Figure 6 - Freqüência de mutação de clorofila na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EO.

comparação	significância
0, 0 + C	*
1, 1 + C	ns
2, 2 + C	**
3, 3 + C	ns
0 + EO, 0 + C + EO	**
1 + EO, 1 + C + EO	ns
2 + EO, 2 + C + EO	ns

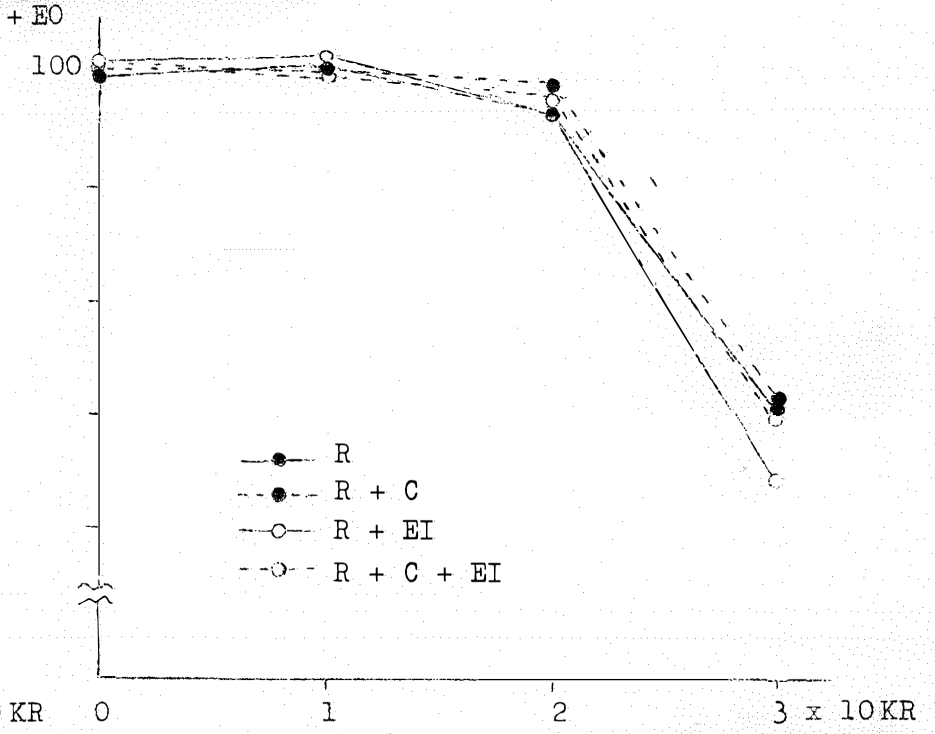


Figure 7 - Germinação das sementes na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EI.

comparação	significância
0, 0 + C	ns
1, 1 + C	ns
2, 2 + C	ns
3, 3 + C	ns
0 + EI, 0 + C + EI	ns
1 + EI, 1 + C + EI	ns
2 + EI, 2 + C + EI	ns
3 + EI, 3 + C + EI	ns

**, * ... significativo ao nível de 1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

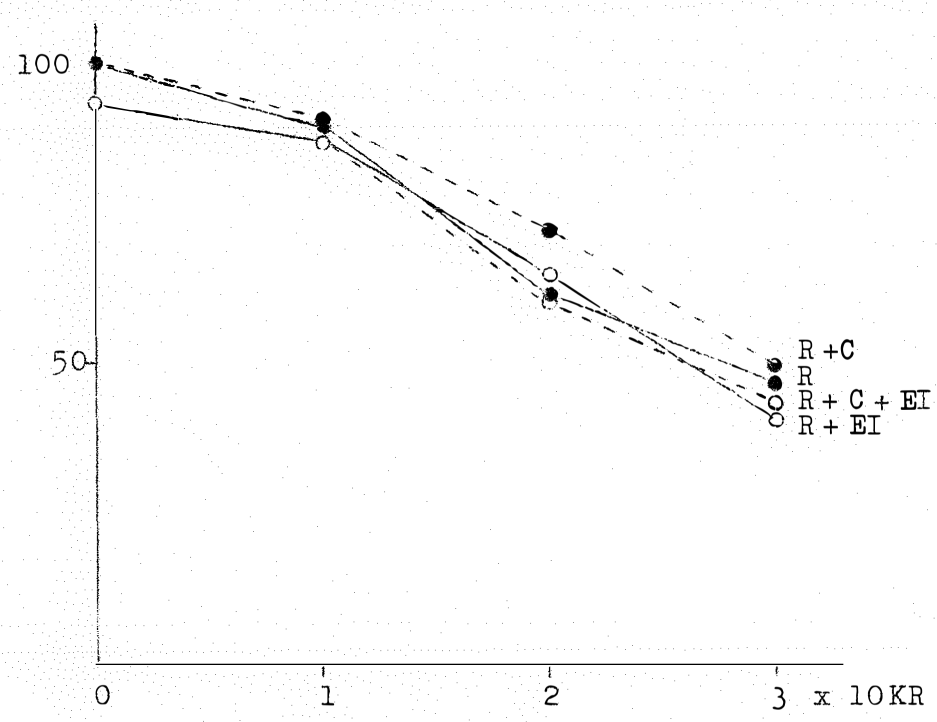


Figura 8 - Altura das plântulas na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EI.

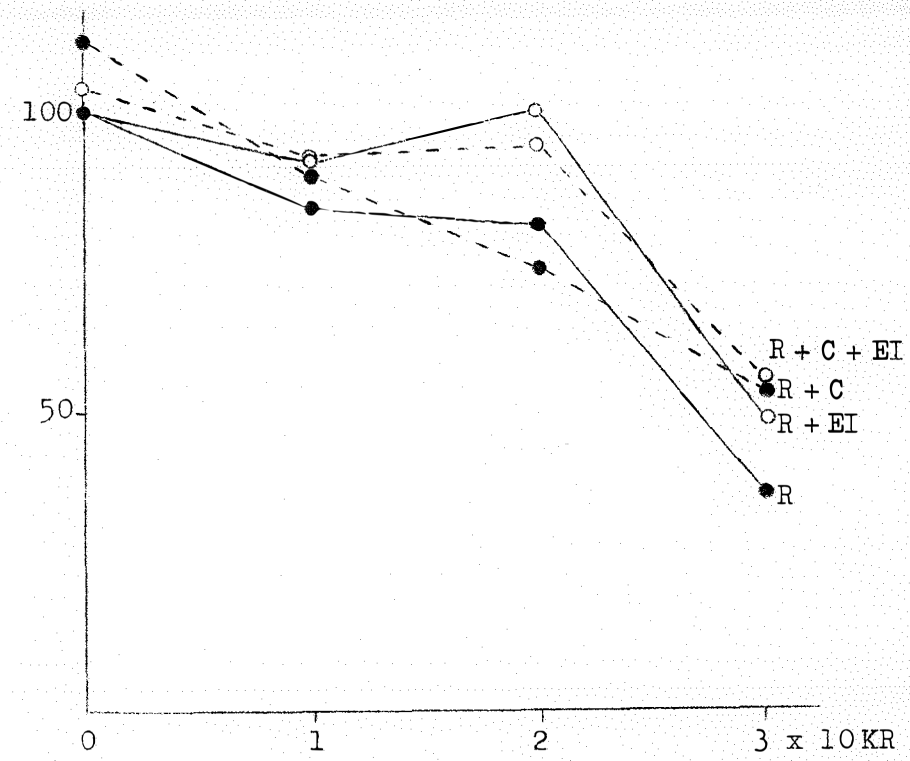


Figura 9 - Sobrevivência na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EI.

comparação	significância
0, 0 + C	ns
1, 1 + C	ns
2, 2 + C	***
3, 3 + C	ns
0 + EI, 0 + C + EI	ns
1 + EI, 1 + C + EI	ns
2 + EI, 2 + C + EI	*
3 + EI, 3 + C + EI	ns

comparação	significância
0, 0 + C	***
1, 1 + C	ns
2, 2 + C	ns
3, 3 + C	***
0 + EI, 0 + C + EI	ns
1 + EI, 1 + C + EI	ns
2 + EI, 2 + C + EI	*
3 + EI, 3 + C + EI	ns

***, * ... significativo ao nível de 0,1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

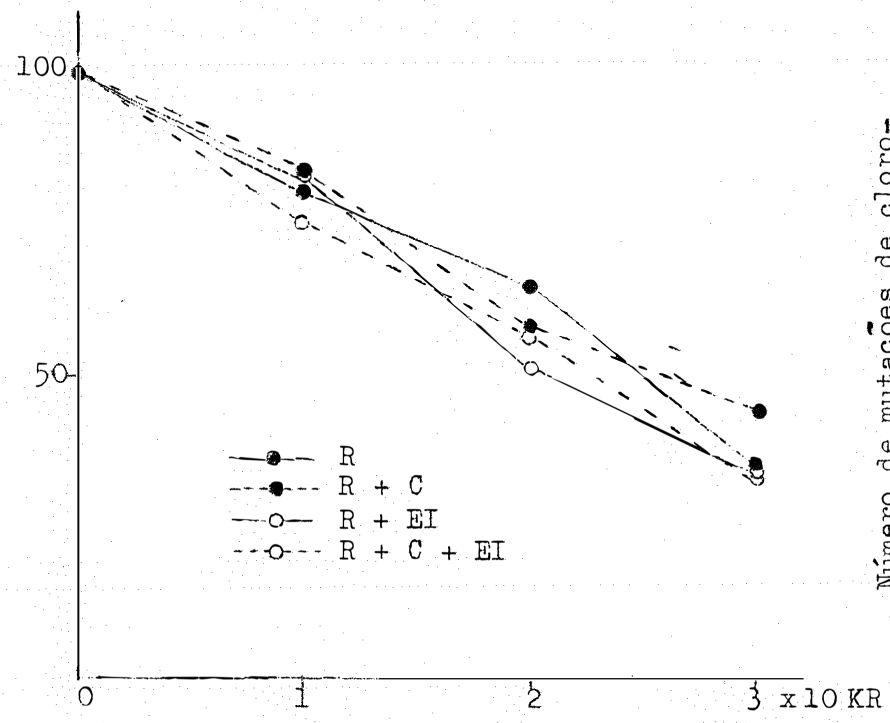


Figura 10 - Fertilidade na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EI.

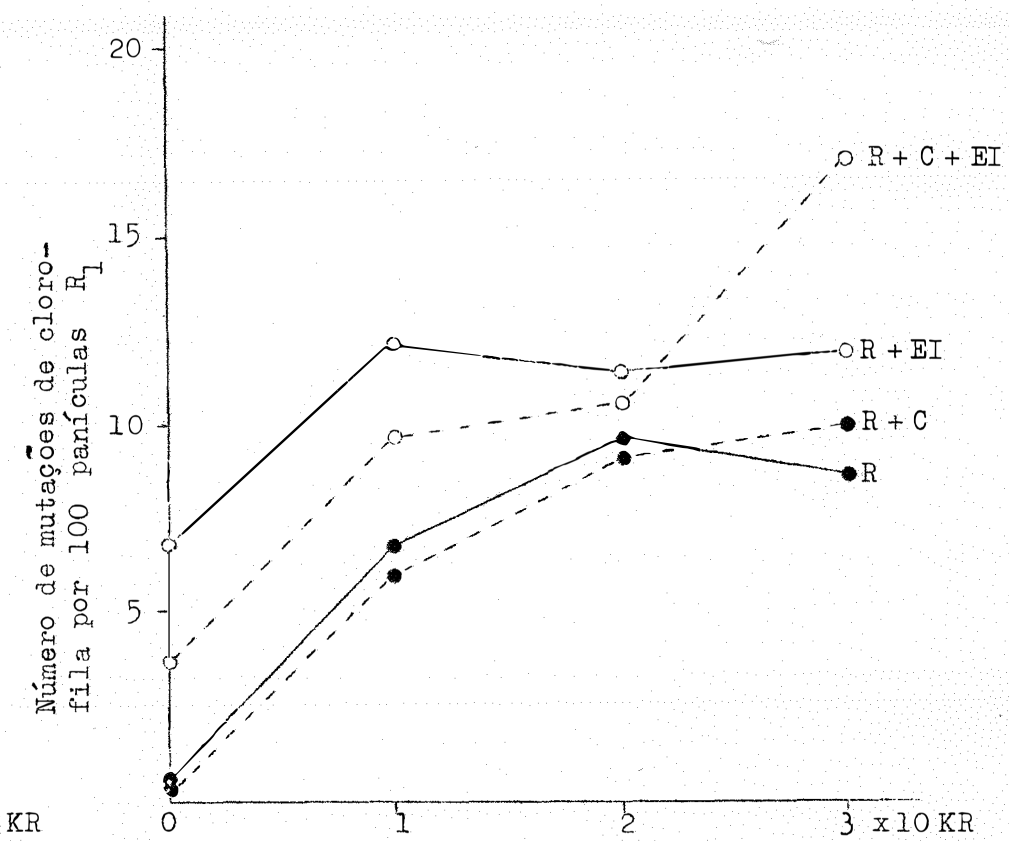


Figura 11 - Freqüência de mutação de clorofila na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EI.

comparação	significância
0, 0 + C	ns
1, 1 + C	***
2, 2 + C	***
3, 3 + C	***
0 + EI, 0 + C + EI	**
1 + EI, 1 + C + EI	***
2 + EI, 2 + C + EI	***
3 + EI, 3 + C + EI	ns

comparação	significância
1, 1 + C	ns
2, 2 + C	ns
3, 3 + C	ns
0 + EI, 0 + C + EI	**
1 + EI, 1 + C + EI	ns
2 + EI, 2 + C + EI	ns
3 + EI, 3 + C + EI	ns

***, ** ... significativo ao nível de 0,1% e 1%, respectivamente.
ns ... não significativo.

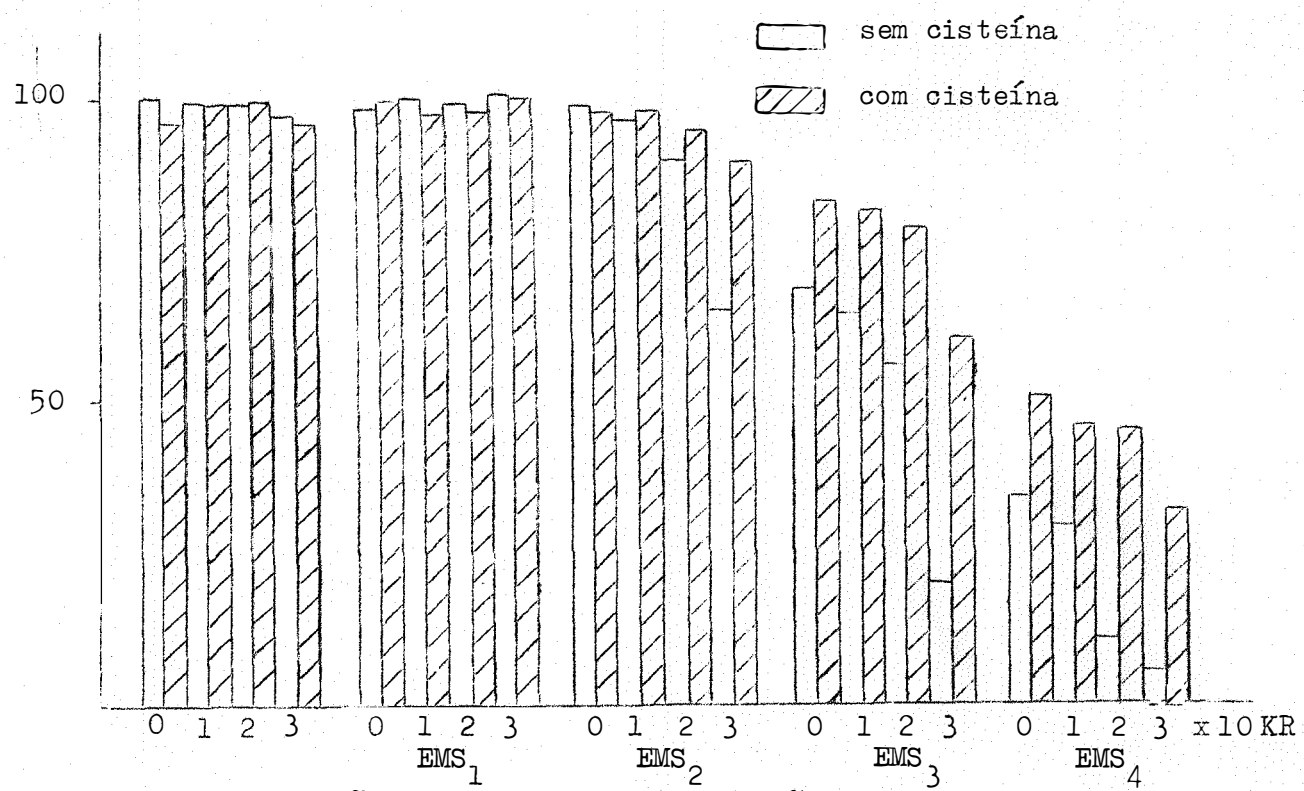


Figura 12 - Germinação de sementes na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EMS.

comparação	significância	comparação	significância
0, 0+C	*	1+EMS$_1$	***
1, 1+C	ns	1+EMS$_2$	
2, 2+C	ns	1+EMS$_3$	
3, 3+C	*	1+EMS$_4$	
0+EMS$_1$, 0+C+EMS$_1$	ns	2+EMS$_1$	***
1+EMS$_1$, 1+C+EMS$_1$	*	2+EMS$_2$	
2+EMS$_1$, 2+C+EMS$_1$	ns	2+EMS$_3$	
3+EMS$_1$, 3+C+EMS$_1$	ns	2+EMS$_4$	
0+EMS$_2$, 0+C+EMS$_2$	ns	3+EMS$_1$	***
1+EMS$_2$, 1+C+EMS$_2$	ns	3+EMS$_2$	
2+EMS$_2$, 2+C+EMS$_2$	*	3+EMS$_3$	
3+EMS$_2$, 3+C+EMS$_2$	***	3+EMS$_4$	
0+EMS$_3$, 0+C+EMS$_3$	***	0+C+EMS$_1$	***
1+EMS$_3$, 1+C+EMS$_3$	***	0+C+EMS$_2$	
2+EMS$_3$, 2+C+EMS$_3$	***	0+C+EMS$_3$	
3+EMS$_3$, 3+C+EMS$_3$	***	0+C+EMS$_4$	
0+EMS$_4$, 0+C+EMS$_4$	***	1+C+EMS$_1$	***
1+EMS$_4$, 1+C+EMS$_4$	***	1+C+EMS$_2$	
2+EMS$_4$, 2+C+EMS$_4$	***	1+C+EMS$_3$	
3+EMS$_4$, 3+C+EMS$_4$	***	1+C+EMS$_4$	
0+EMS$_1$	***	2+C+EMS$_1$	***
0+EMS$_2$		2+C+EMS$_2$	
0+EMS$_3$		2+C+EMS$_3$	
0+EMS$_4$		2+C+EMS$_4$	
		3+C+EMS$_1$	***
		3+C+EMS$_2$	
		3+C+EMS$_3$	
		3+C+EMS$_4$	

***, * ... significativo ao nível de 0,1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

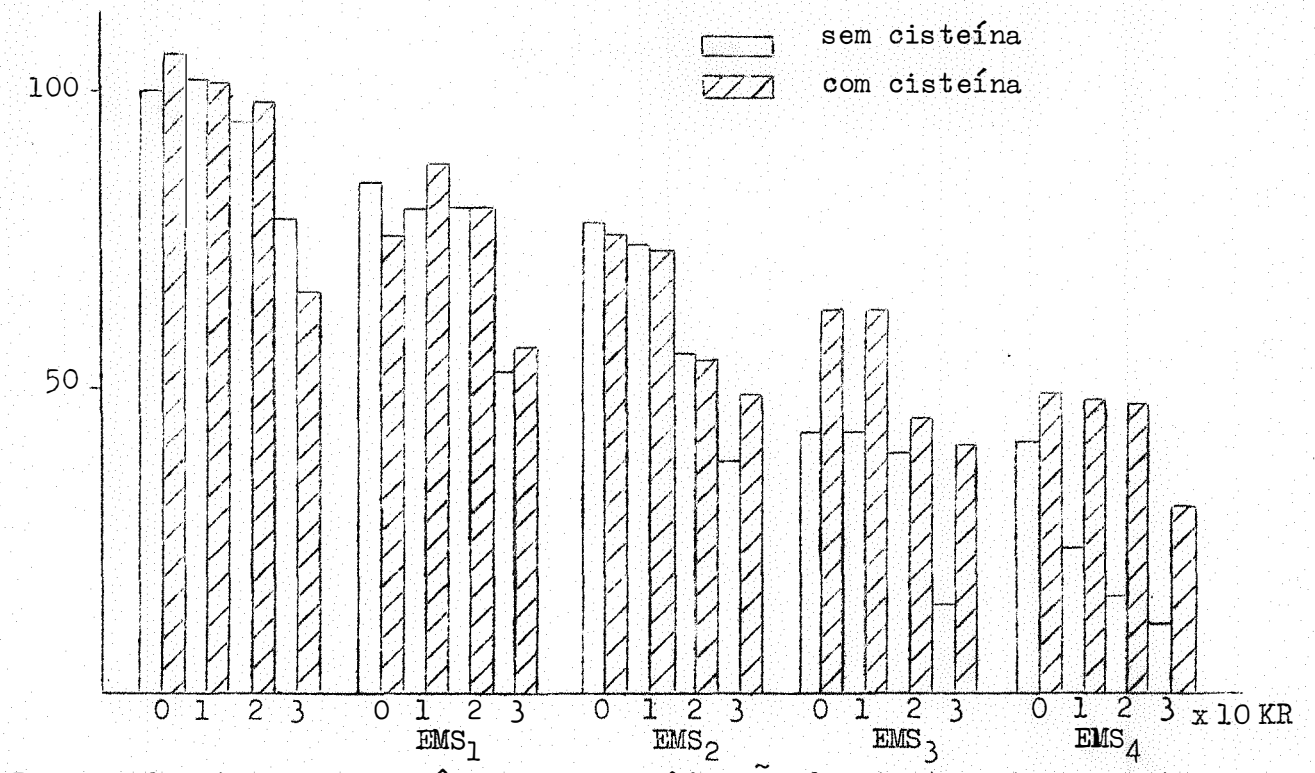


Figura 13 - Altura das plântulas na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EMS.

comparação	significância
0, 0+C	**
1, 1+C	ns
2, 2+C	ns
3, 3+C	***
0+EMS$_1$, 0+C+EMS$_1$	***
1+EMS$_1$, 1+C+EMS$_1$	***
2+EMS$_1$, 2+C+EMS$_1$	ns
3+EMS$_1$, 3+C+EMS$_1$	*
0+EMS$_2$, 0+C+EMS$_2$	ns
1+EMS$_2$, 1+C+EMS$_2$	ns
2+EMS$_2$, 2+C+EMS$_2$	ns
3+EMS$_2$, 3+C+EMS$_2$	***
0+EMS$_3$, 0+C+EMS$_3$	***
1+EMS$_3$, 1+C+EMS$_3$	***
2+EMS$_3$, 2+C+EMS$_3$	ns
3+EMS$_3$, 3+C+EMS$_3$	***
0+EMS$_4$, 0+C+EMS$_4$	*
1+EMS$_4$, 1+C+EMS$_4$	***
2+EMS$_4$, 2+C+EMS$_4$	***
3+EMS$_4$, 3+C+EMS$_4$	***
0+EMS$_1$, 0+EMS$_2$, 0+EMS$_3$, 0+EMS$_4$	***

comparação	significância
1+EMS$_1$, 1+EMS$_2$, 1+EMS$_3$, 1+EMS$_4$	***
2+EMS$_1$, 2+EMS$_2$, 2+EMS$_3$, 2+EMS$_4$	***
3+EMS$_1$, 3+EMS$_2$, 3+EMS$_3$, 3+EMS$_4$	***
0+C+EMS$_1$, 0+C+EMS$_2$, 0+C+EMS$_3$, 0+C+EMS$_4$	***
1+C+EMS$_1$, 1+C+EMS$_2$, 1+C+EMS$_3$, 1+C+EMS$_4$	***
2+C+EMS$_1$, 2+C+EMS$_2$, 2+C+EMS$_3$, 2+C+EMS$_4$	***
3+C+EMS$_1$, 3+C+EMS$_2$, 3+C+EMS$_3$, 3+C+EMS$_4$	***

***, **, * ... significativo ao nível de 0,1%, 1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

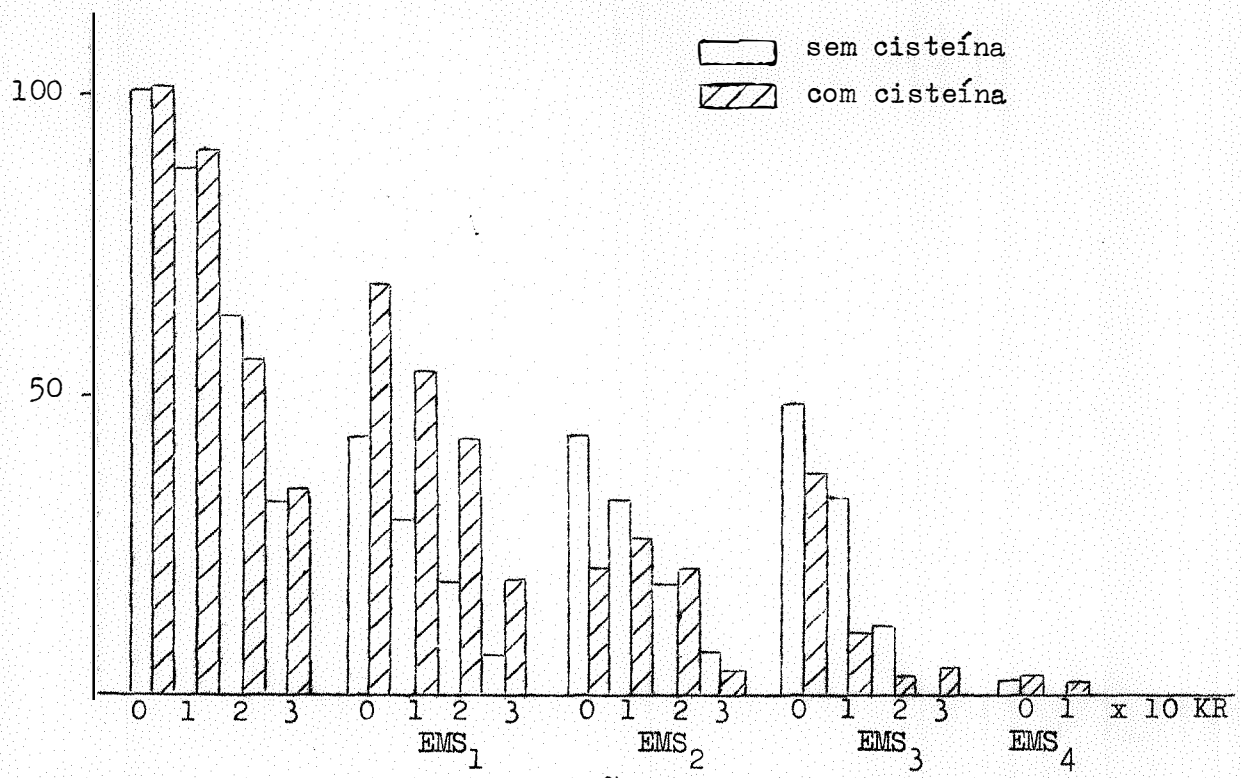


Figura 14 - Fertilidade na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EMS.

comparação	significância	comparação	significância
0, 0+C	ns	2+EMS$_1$, 2+EMS$_2$, 2+EMS$_3$	***
1, 1+C	***	3+EMS$_1$, 3+EMS$_2$	***
2, 2+C	***	0+C+EMS$_1$, 0+C+EMS$_2$, 0+C+EMS$_3$, 0+C+EMS$_4$	***
3, 3+C	***	1+C+EMS$_1$, 1+C+EMS$_2$, 1+C+EMS$_3$, 1+C+EMS$_4$	***
0+EMS$_1$, 0+C+EMS$_1$	***	2+C+EMS$_1$, 2+C+EMS$_2$, 2+C+EMS$_3$	***
1+EMS$_1$, 1+C+EMS$_1$	***	3+C+EMS$_1$, 3+C+EMS$_2$	***
2+EMS$_1$, 2+C+EMS$_1$	***		
3+EMS$_1$, 3+C+EMS$_1$	***		
0+EMS$_2$, 0+C+EMS$_2$	***		
1+EMS$_2$, 1+C+EMS$_2$	***		
2+EMS$_2$, 2+C+EMS$_2$	***		
3+EMS$_2$, 3+C+EMS$_2$	***		
0+EMS$_3$, 0+C+EMS$_3$	***		
1+EMS$_3$, 1+C+EMS$_3$	***		
2+EMS$_3$, 2+C+EMS$_3$	***		
0+EMS$_1$, 0+EMS$_2$, 0+EMS$_3$, 0+EMS$_4$	***		
1+EMS$_1$, 1+EMS$_2$, 1+EMS$_3$	***		

*** ... significativo ao nível de 0,1%.
ns ... não significativo.

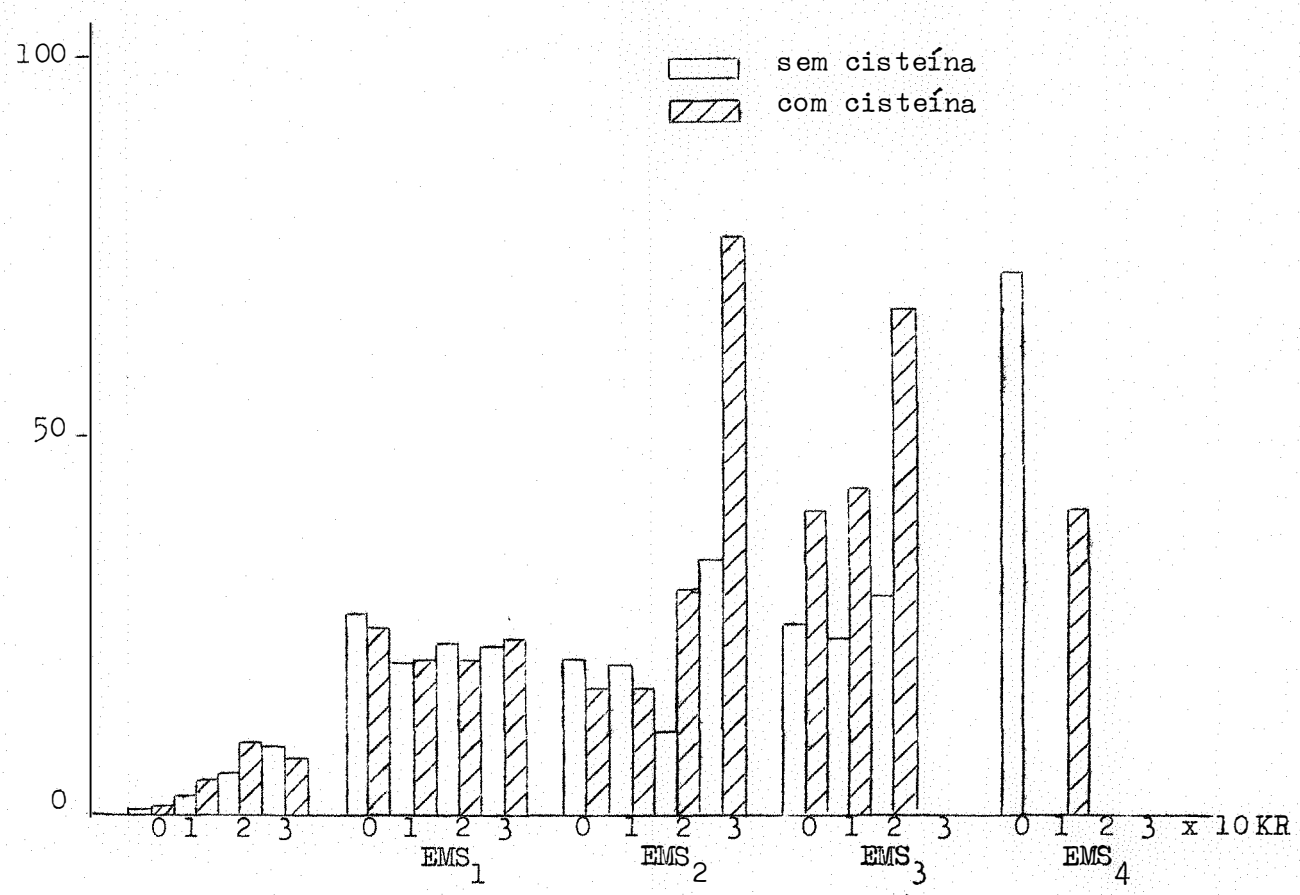


Figura 15 - Freqüência de mutação de clorofila na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e EMS.

comparação	significância	comparação	significância
1, 1+C	*	0+EMS$_1$, 0+EMS$_2$	ns
2, 2+C	***		
3, 3+C	ns	1+EMS$_1$, 1+EMS$_2$	ns
0+EMS$_1$, 0+C+EMS$_1$	ns		
1+EMS$_1$, 1+C+EMS$_1$	ns	2+EMS$_1$, 2+EMS$_2$	*
2+EMS$_1$, 2+C+EMS$_1$	ns		
3+EMS$_1$, 3+C+EMS$_1$	ns		
0+EMS$_2$, 0+C+EMS$_2$	ns	0+C+EMS$_1$, 0+C+EMS$_2$	ns
1+EMS$_2$, 1+C+EMS$_2$	ns		
		1+C+EMS$_1$, 2+C+EMS$_2$	ns

***, * ... significativo ao nível de 0,1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

(N.B.: Sòmente os tratamentos com mais de 50 panículas observadas foram considerados na comparação.)

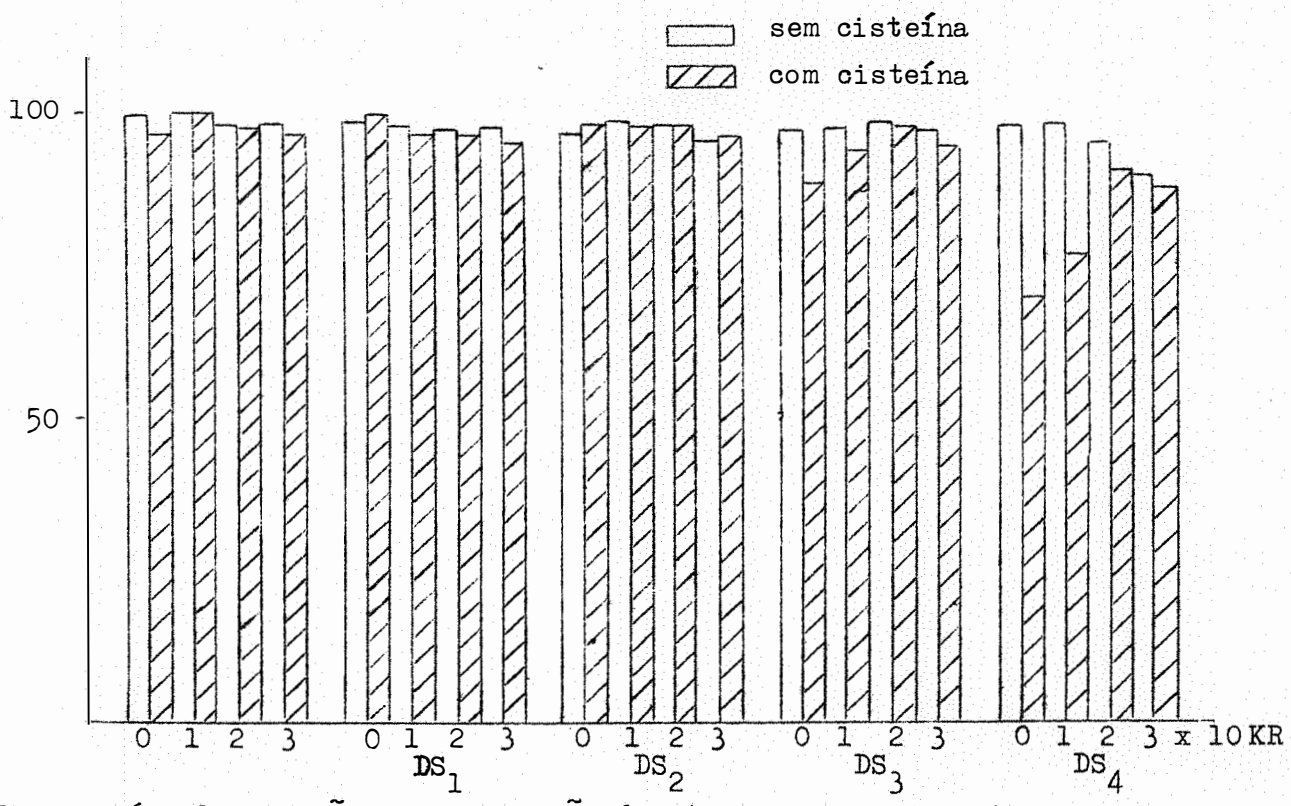


Figura 16 - Germinação na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e DS.

comparação	significância
0, 0+C	*
1, 1+C	ns
2, 2+C	ns
3, 3+C	ns
$0+DS_1$, $0+C+DS_1$	ns
$1+DS_1$, $1+C+DS_1$	ns
$2+DS_1$, $2+C+DS_1$	ns
$3+DS_1$, $3+C+DS_1$	ns
$0+DS_2$, $0+C+DS_2$	ns
$1+DS_2$, $1+C+DS_2$	ns
$3+DS_2$, $3+C+DS_2$	ns
$0+DS_3$, $0+C+DS_3$	***
$1+DS_3$, $1+C+DS_3$	*
$2+DS_3$, $2+C+DS_3$	ns
$3+DS_3$, $3+C+DS_3$	ns
$0+DS_4$, $0+C+DS_4$	***
$1+DS_4$, $1+C+DS_4$	***
$2+DS_4$, $2+C+DS_4$	***
$3+DS_4$, $3+C+DS_4$	ns
$0+DS_1$, $0+DS_2$, $0+DS_3$, $0+DS_4$	ns

comparação	significância
$1+DS_1$, $1+DS_2$, $1+DS_3$, $1+DS_4$	ns
$2+DS_1$, $2+DS_2$, $2+DS_3$, $2+DS_4$	ns
$3+DS_1$, $3+DS_2$, $3+DS_3$, $3+DS_4$	***
$0+C+DS_1$, $0+C+DS_2$, $0+C+DS_3$, $0+C+DS_4$	***
$1+C+DS_1$, $1+C+DS_2$, $1+C+DS_3$, $1+C+DS_4$	***
$2+C+DS_1$, $2+C+DS_2$, $2+C+DS_3$, $2+C+DS_4$	***
$3+C+DS_1$, $3+C+DS_2$, $3+C+DS_3$, $3+C+DS_4$	***

***, * ... significativo ao nível de 0,1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

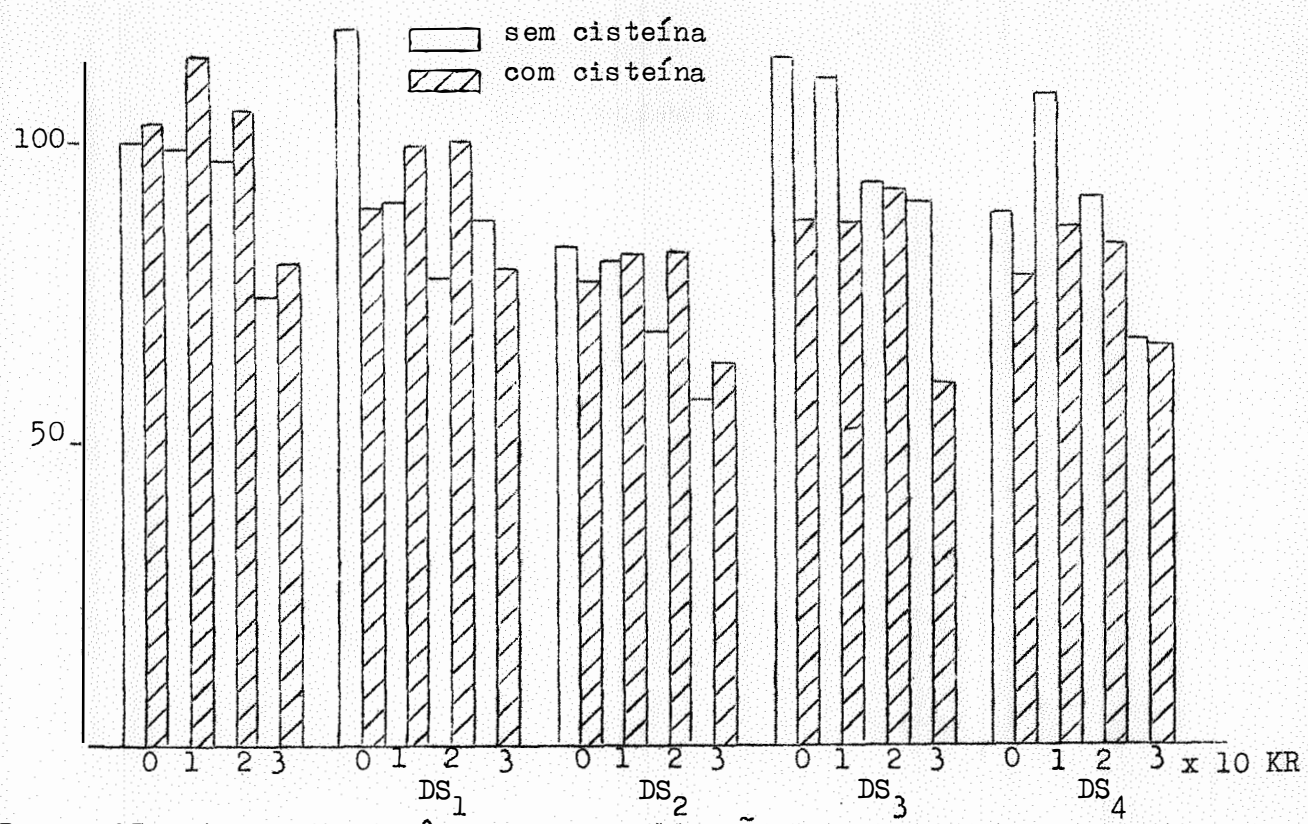


Figura 17 - Altura das plântulas na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e DS.

comparação	significância	comparação	significância
0, 0+C	ns	1+DS$_1$		
1, 1+C	***	1+DS$_2$	***
2, 2+C	*	1+DS$_3$		
3, 3+C	ns	1+DS$_4$		
0+DS$_1$, 0+C+DS$_1$	***	2+DS$_1$		
1+DS$_1$, 1+C+DS$_1$	*	2+DS$_2$	***
2+DS$_1$, 2+C+DS$_1$	***	2+DS$_3$		
3+DS$_1$, 3+C+DS$_1$	ns	2+DS$_4$		
0+DS$_2$, 0+C+DS$_2$	**	3+DS$_1$		
1+DS$_2$, 1+C+DS$_2$	ns	3+DS$_2$	***
2+DS$_2$, 2+C+DS$_2$	***	3+DS$_3$		
3+DS$_2$, 3+C+DS$_2$	***	3+DS$_4$		
0+DS$_3$, 0+C+DS$_3$	***	0+C+DS$_1$		
1+DS$_3$, 1+C+DS$_3$	***	0+C+DS$_2$	***
2+DS$_3$, 2+C+DS$_3$	ns	0+C+DS$_3$		
3+DS$_3$, 3+C+DS$_3$	***	0+C+DS$_4$		
0+DS$_4$, 0+C+DS$_4$	**	1+C+DS$_1$		
1+DS$_4$, 1+C+DS$_4$	***	1+C+DS$_2$	***
2+DS$_4$, 2+C+DS$_4$	ns	1+C+DS$_3$		
3+DS$_4$, 3+C+DS$_4$	ns	1+C+DS$_4$		
0+DS$_1$		
0+DS$_2$	***	2+C+DS$_1$		
0+DS$_3$		
0+DS$_4$		
		2+C+DS$_2$	***
		2+C+DS$_3$		
		2+C+DS$_4$		
		3+C+DS$_1$		
		3+C+DS$_2$	***
		3+C+DS$_3$		
		3+C+DS$_4$		

***, **, * ... significativo ao nível de 0,1%, 1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

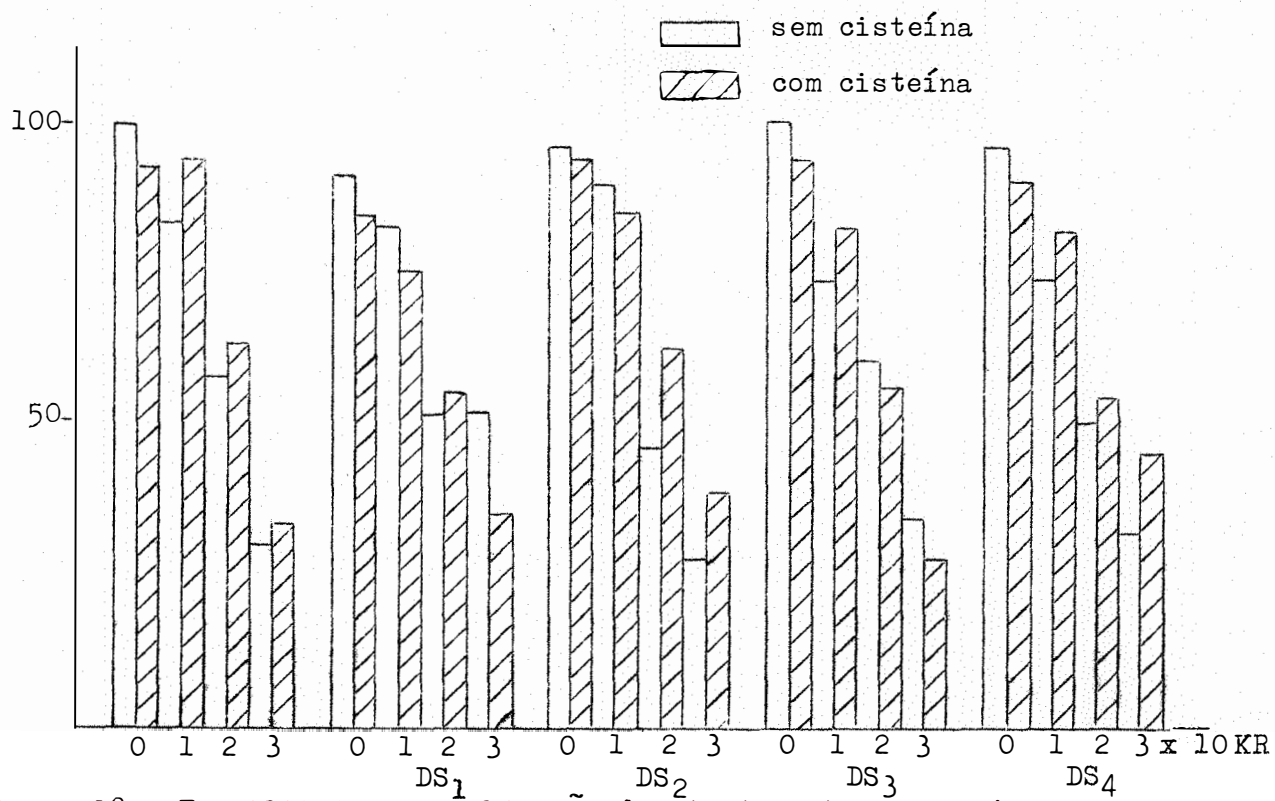


Figura 18 - Fertilidade na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e DS.

comparação	significância	comparação	significância
0, 0+C	***	1+DS$_1$	***
1, 1+C	***	1+DS$_2$	
2, 2+C	***	1+DS$_3$	
3, 3+C	***	1+DS$_4$	
0+DS$_1$, 0+C+DS$_1$	***	2+DS$_1$	***
1+DS$_1$, 1+C+DS$_1$	***	2+DS$_2$	
2+DS$_1$, 2+C+DS$_1$	***	2+DS$_3$	
3+DS$_1$, 3+C+DS$_1$	***	2+DS$_4$	
0+DS$_2$, 0+C+DS$_2$	***	3+DS$_1$	***
1+DS$_2$, 1+C+DS$_2$	***	3+DS$_2$	
2+DS$_2$, 2+C+DS$_2$	***	3+DS$_3$	
3+DS$_2$, 3+C+DS$_2$	***	3+DS$_4$	
0+DS$_3$, 0+C+DS$_3$	***	0+C+DS$_1$	***
1+DS$_3$, 1+C+DS$_3$	***	0+C+DS$_2$	
2+DS$_3$, 2+C+DS$_3$	***	0+C+DS$_3$	
3+DS$_3$, 3+C+DS$_3$	***	0+C+DS$_4$	
0+DS$_4$, 0+C+DS$_4$	***	1+C+DS$_1$	***
1+DS$_4$, 1+C+DS$_4$	***	1+C+DS$_2$	
2+DS$_4$, 2+C+DS$_4$	***	1+C+DS$_3$	
3+DS$_4$, 3+C+DS$_4$	***	1+C+DS$_4$	
0+DS$_1$	***	2+C+DS$_1$	***
0+DS$_2$		2+C+DS$_2$	
0+DS$_3$		2+C+DS$_3$	
0+DS$_4$		2+C+DS$_4$	
		3+C+DS$_1$	***
		3+C+DS$_2$	
		3+C+DS$_3$	
		3+C+DS$_4$	

*** ... significativo ao nível de 0,1%.
ns ... não significativo.

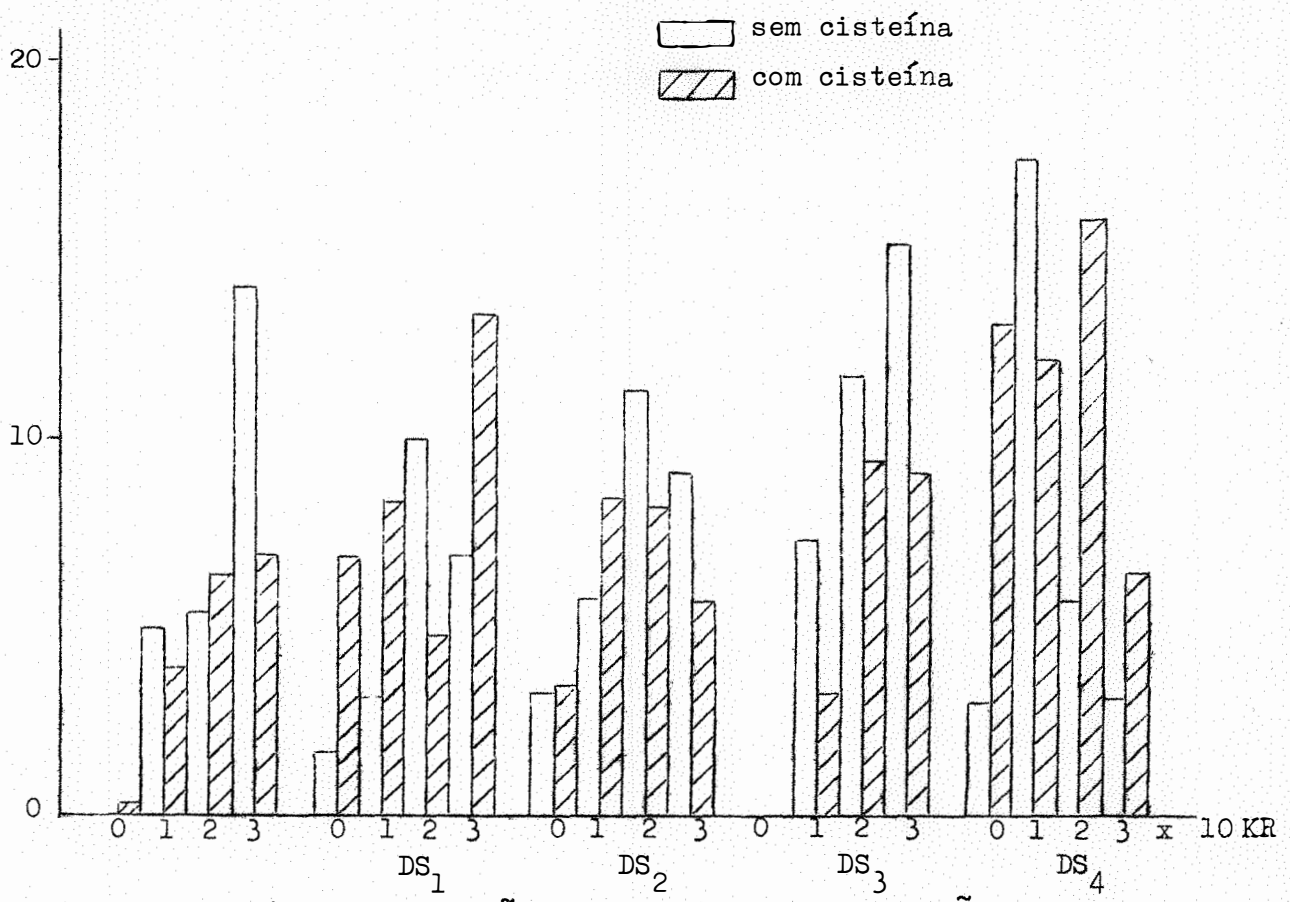


Figura 19 - Freqüência de mutação de clorofila na combinação dos tratamentos com raios-gama, cisteína e DS.

comparação	significância	comparação	significância
1, 1+C	ns	2+DS$_1$, 2+DS$_2$, 2+DS$_3$, 2+DS$_4$	ns
2, 2+C	ns		
3, 3+C	ns		
0+DS$_1$, 0+C+DS$_1$	*	3+DS$_1$, 3+DS$_2$, 3+DS$_4$	ns
1+DS$_1$, 1+C+DS$_1$	ns		
2+DS$_1$, 2+C+DS$_1$	ns		
0+DS$_2$, 0+C+DS$_2$	ns	0+C+DS$_1$, 0+C+DS$_2$, 0+C+DS$_4$	**
1+DS$_2$, 1+C+DS$_2$	ns		
2+DS$_2$, 2+C+DS$_2$	ns		
3+DS$_2$, 3+C+DS$_2$	ns		
1+DS$_3$, 1+C+DS$_3$	ns	1+C+DS$_1$, 1+C+DS$_2$, 1+C+DS$_3$, 1+C+DS$_4$	ns
2+DS$_3$, 2+C+DS$_3$	ns		
0+DS$_4$, 0+C+DS$_4$	**		
2+DS$_4$, 2+C+DS$_4$	**		
3+DS$_4$, 3+C+DS$_4$	ns	2+C+DS$_1$, 2+C+DS$_2$, 2+C+DS$_3$, 2+C+DS$_4$	*
0+DS$_1$, 0+DS$_2$, 0+DS$_4$	ns		
		3+C+DS$_2$, 3+C+DS$_4$	ns
1+DS$_1$, 1+DS$_2$, 1+DS$_3$	*		

**, * ... significativo ao nível de 1% e 5%, respectivamente.
ns ... não significativo.

(N.B. - Sòmente os tratamentos com mais de 50 panículas observadas foram considerados na comparação.)

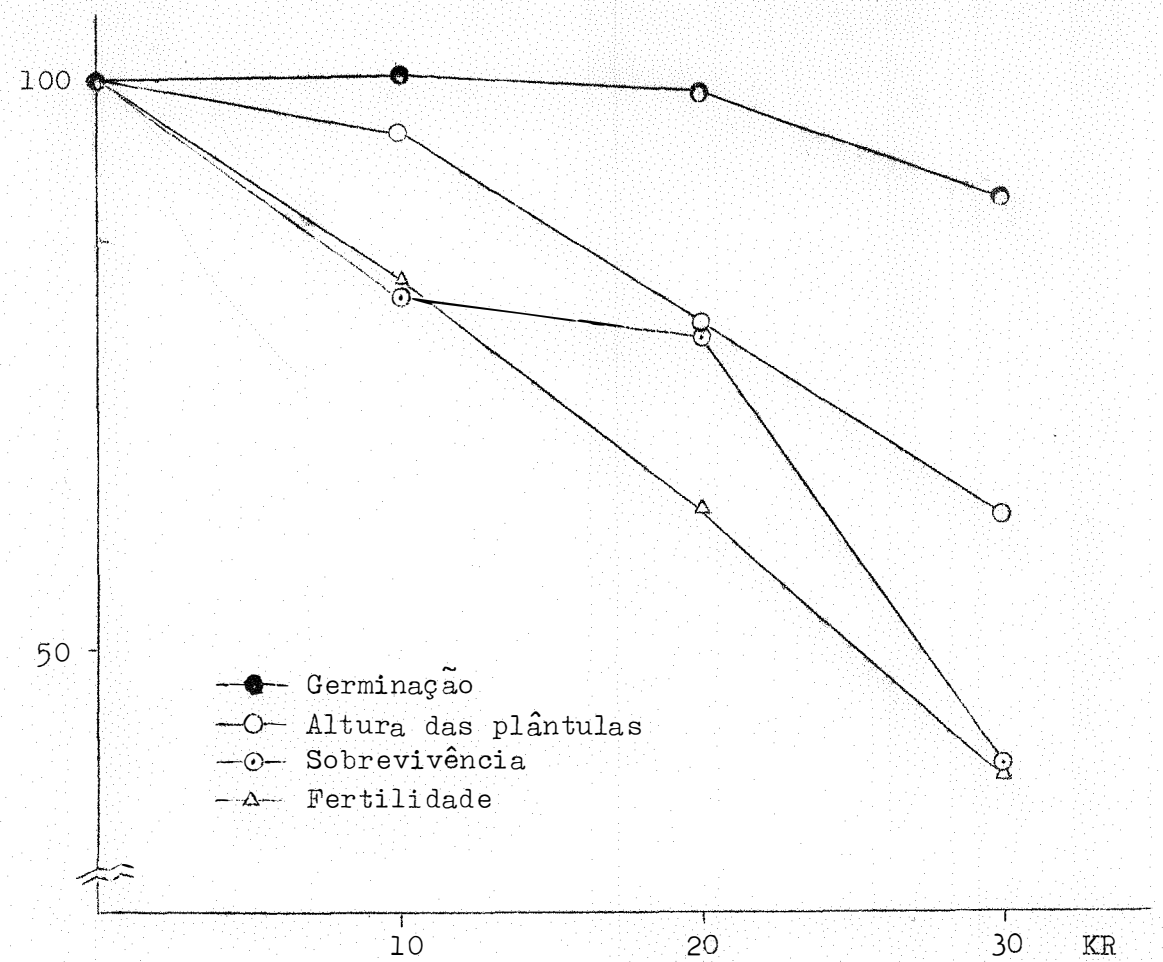


Figura 20 - Médias ponderadas dos tratamentos com raios-gama durante quatro anos de experimento.

Dose (KR)	Germinação	Altura das plântulas	Sobrevivência	Fertilidade
0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	100,6	95,4	81,0	82,2
20	98,8	78,3	77,2	62,1
30	89,3	61,4	39,3	38,5

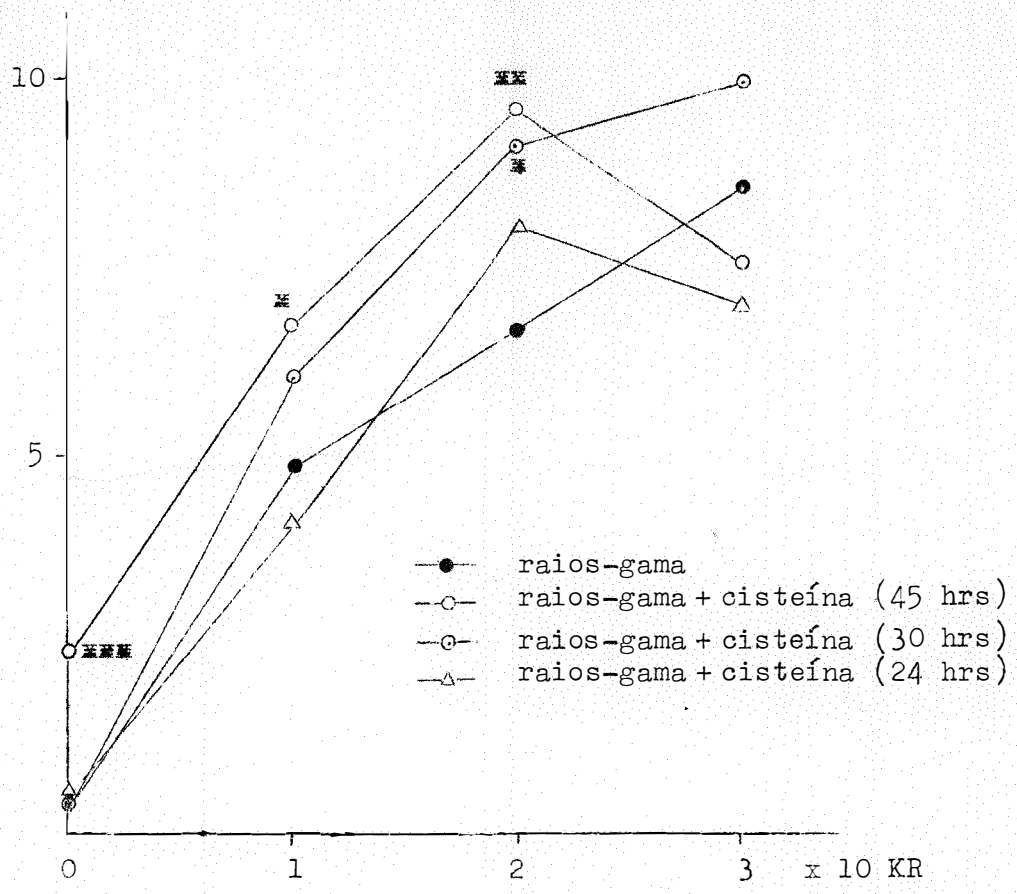


Figura 21 - Pós-tratamentos com cisteína e freqüência de mutação de clorofila.

xxx, xx, x ... significativo ao nível de 0,1%, 1% e 5%, respectivamente, em comparação com o tratamento com apenas raios-gama.

Trat. / Dose	R	R + C (C: 45 hrs.)	R + C (C: 30 hrs.)	R + C (C: 24 hrs.)
0KR	0,39	2,43	0,35	0,58
10KR	4,82	6,72	6,05	4,10
20KR	6,67	9,59	9,11	7,99
30KR	8,42	7,54	9,96	6,96

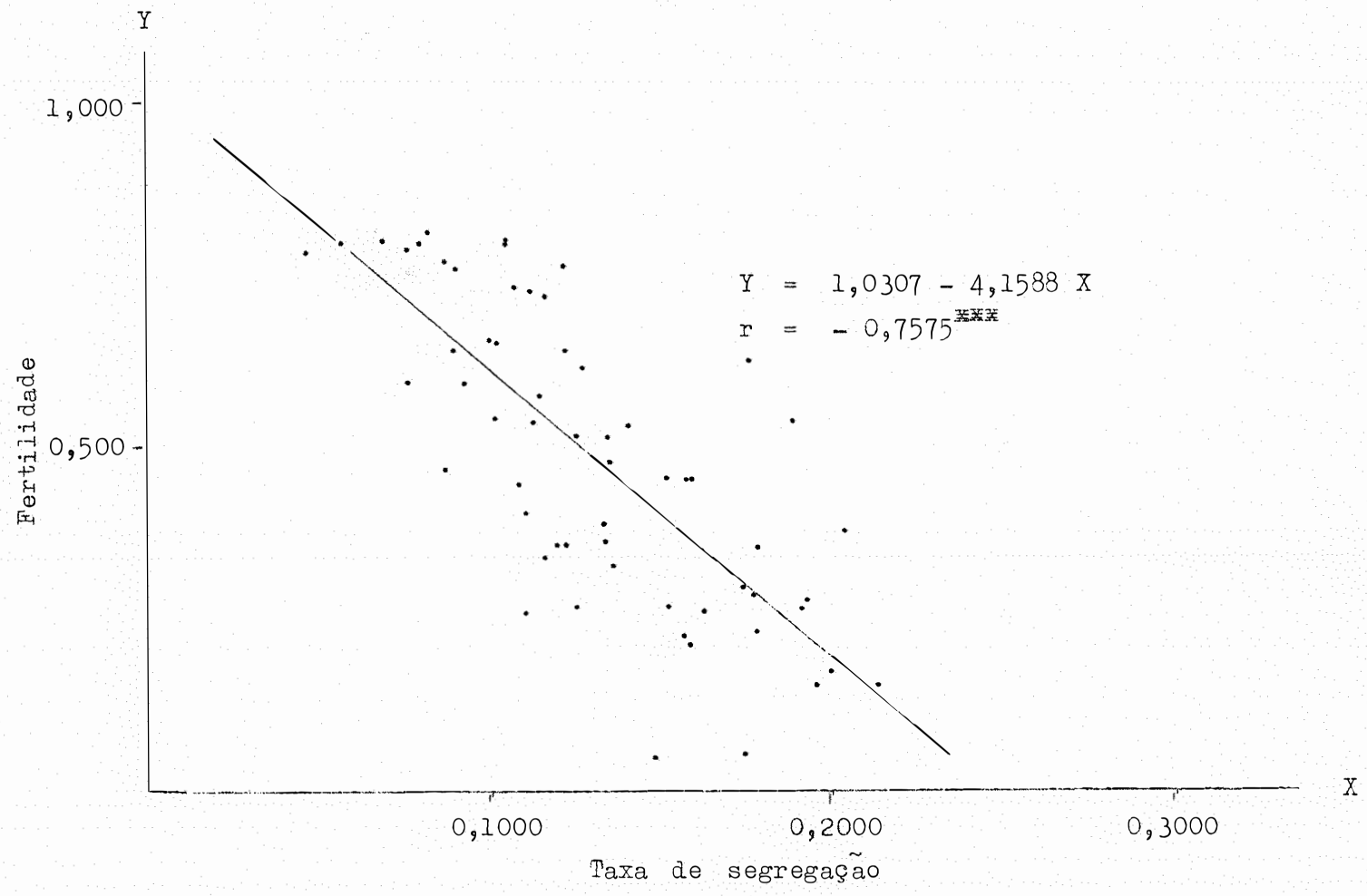


Figura 22 - Regressão e correlação entre taxa de segregação e fertilidade.

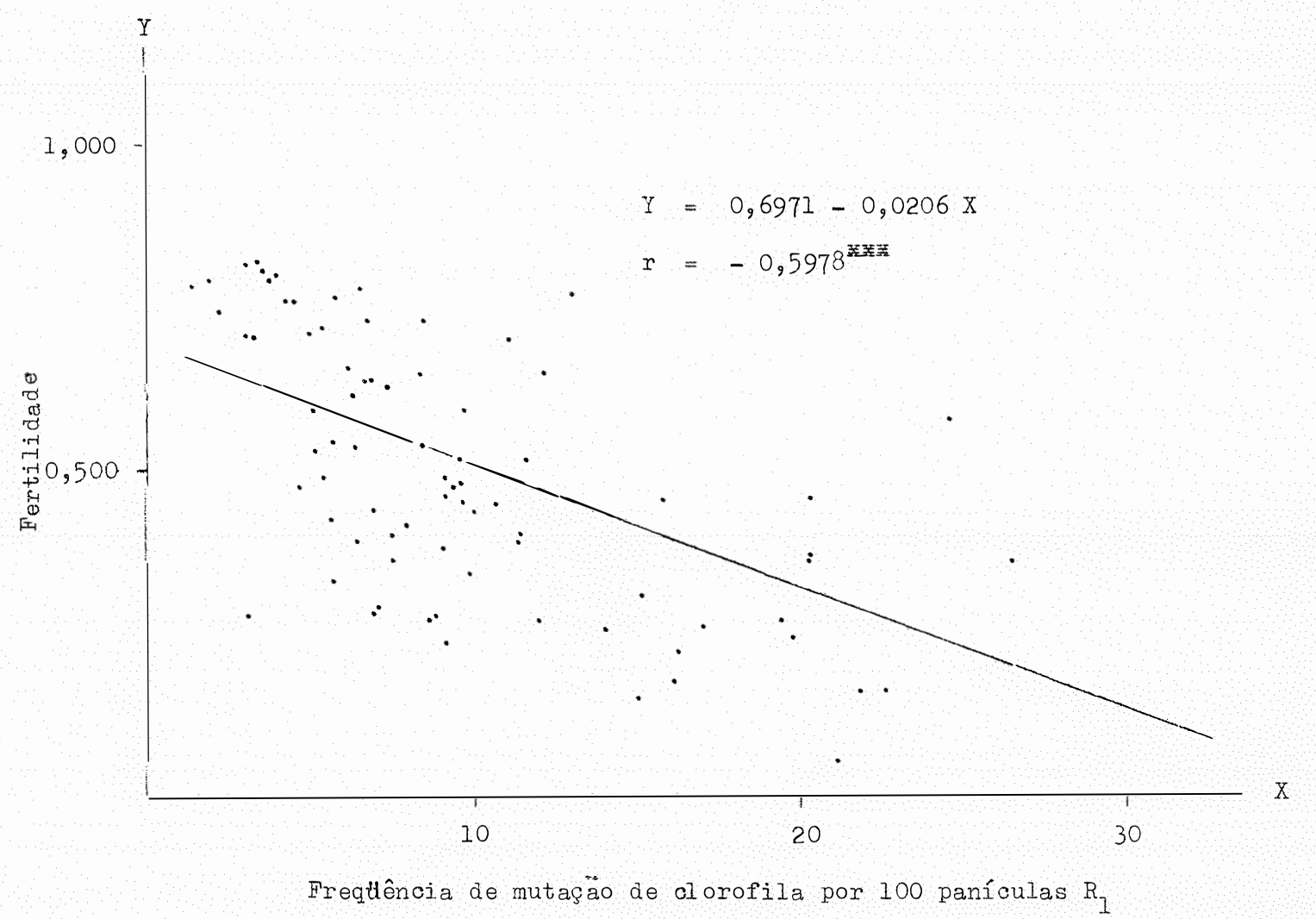


Figura 23 - Regressão e correlação entre freqüência de mutação de clorofila e fertilidade.

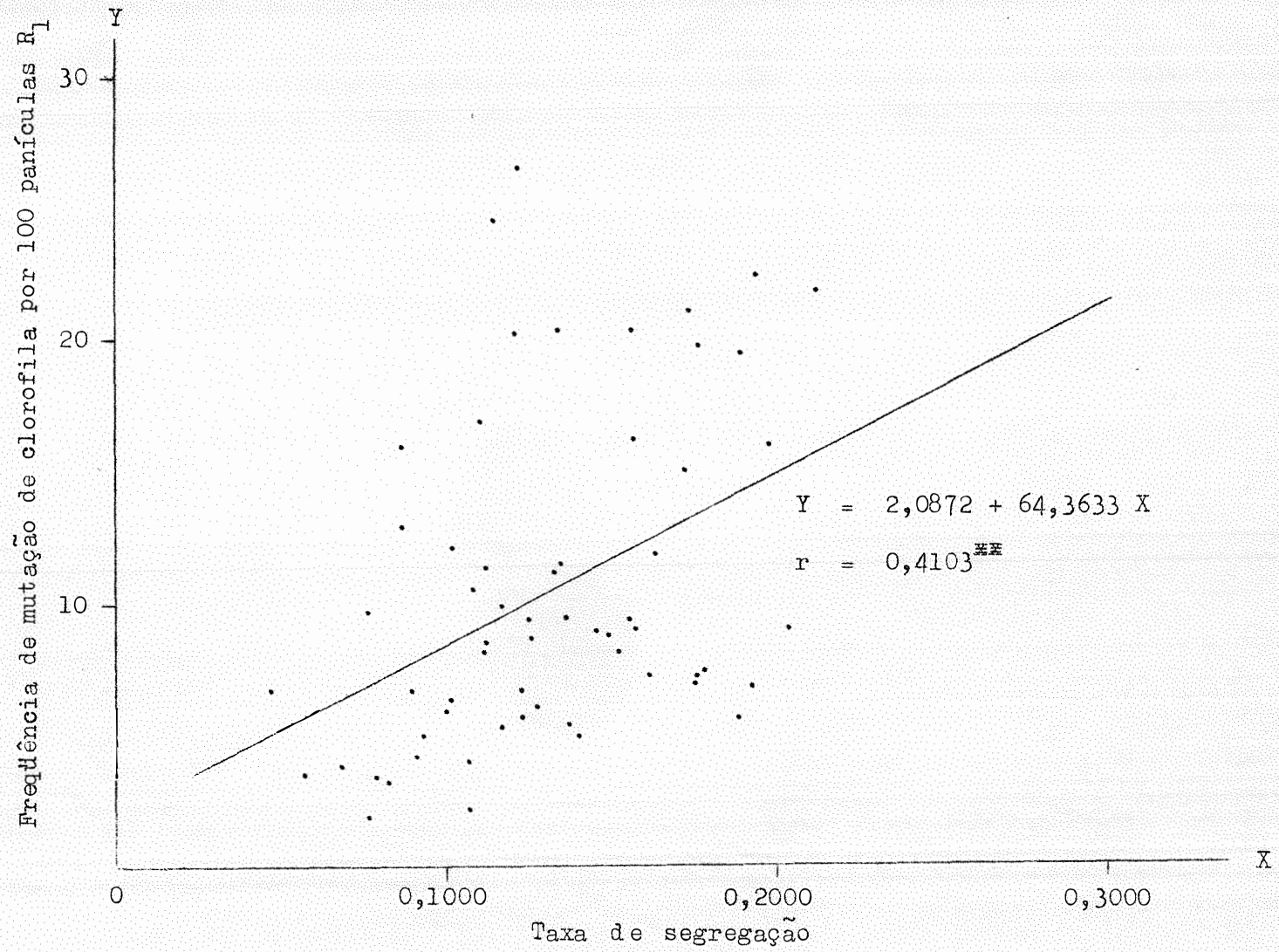


Figura 24 - Regressão e correlação entre taxa de segregação e freqüência de mutação de clorofila.