ESTUDOS SOBRE A ONTOGENIA E ALGUNS CARACTERES DO FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.) A PARTIR DE SEMENTES IRRADIADAS
COM NEUTRONS RÁPIDOS

MARIA LÚCIA STEAGALL

Orientador: AKIHIKO ANDO

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
Estado de São Paulo-Brasil
Maio, 1982

Aos meus pais,
de quem muito me orgulho de ser filha
e pela felicidade que me dão por existirem;

Às minhas irmãs
e demais familiares,

D E D I C O

Ao Prof. Dr. Akihiko Ando,

Ao Prof. Dr. José Theophilo do Amaral Gurgel,

Ao Sr. Antonio de Oliveira (in memoriam),

O F E R E Ç O

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial a:

- Prof. Dr. Akihiko Ando
- Profa. Dra. Maria Ruth Buzzato Alleoni
- Prof. Dr. Ernesto Paterniani
- Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto
- Prof. Dr. José Otávio Machado Menten
- Prof. Dr. Fabrizio D'Ayala Valva
- Profa. Marlene Kiyoni Hosaki
- Professores do Departamento de Genética
- Funcionários do Departamento de Genética, em particular à: Sra. Eisa A.A. César, Sra. Terezinha de Jesus Lodovico Barrete, Sr. Alaor de Oliveira, Sr. Antonio Capobianco, Sr. Humberto Gorga Filho, e Sr. José Broglio.
- Sr. Armando Adilson de Oliveira
- Amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação
- Laboratório de Seibersdorf da Agência Internacional de Energia Atômica, Viena, Áustria, na pessoa do Dr. Helmut Brunner
- CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)
- Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Goiás
- Meus pais, Angela Rossin Steagall e Eduardo Steagall

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades sobre a indução de mutações no melhoramen to de plantas	3
2.2. Fertilidade de plantas M_1	8
2.3. Coloração do tegumento e sua relação com a coloração do hipocótilo	9
2.4. Quimerismo em plantas	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material	16
3.2. Métodos	17
3.2.1. Tratamentos mutagênicos	17
3.2.2. Execução experimental	18
3.2.3. Classificação das mutações	19
3.2.4. Fertilidade das plantas M_1	21
3.2.5. Taxa de Segregação	21
3.2.6. Número de células iniciais presentes no embrião das sementes e estrutura quimérica das plantas M_1	22
3.2.7. Análises estatísticas	23
3.2.7.1. Fertilidade das plantas M_1	23
3.2.7.2. Germinação e sobrevivência na geração M_2 ..	24
3.2.7.3. Germinação na geração M_3	24
3.2.7.4. Frequências de mutações em plântulas M_3 ..	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Fertilidade das plantas M_1	26
4.2. Germinação das sementes e sobrevivência das plantas na geração M_2	29
4.3. Germinação das sementes na geração M_3	33
4.4. Frequências de mutações na geração M_3	37

4.5. Taxas de segregação, número de células iniciais presentes no embrião e estrutura quimérica das plantas M_1	51
5. CONCLUSÕES	71
6. LITERATURA CITADA	73

TabelaPágina

8 - Número de: plantas M_1 e M_2 estudadas, sementes M_3 semeadas e percentagem de germinação; e número de mutantes e frequências de mutações para a coloração do hipocótilo, clorofilicas e morfológicas e frequência de mutação total dos diferentes tratamentos com neutrons rápidos	38
9 - Valores de χ^2 obtidos pelo teste de independência, entre todos os tratamentos tomados 2 a 2, para as frequências de mutações, determinadas na geração M_3	51
10 - Taxas de segregação para todos os tipos de mutações efetuados em plântulas M_3 , nos tratamentos com 3 dosagens de neutrons rápidos	54
11 - Taxas de segregação determinadas em plântulas M_3 nas classes de mutações observadas nos diferentes tratamentos com neutrons rápidos	55
12 - Número de plantas M_1 e M_2 estudadas, sementes M_3 semeadas, percentagem de germinação, número de mutantes e taxas de segregação para todos os tipos de mutações considerados em conjunto, nos diferentes tratamentos com neutrons rápidos.	56
13 - Taxa de segregação e número de células iniciais para classes de mutações consideradas em diferentes categorias de plantas M_1 , em duas dosagens de neutrons rápidos	57

Tabela

Página

14 - Número médio de células iniciais para os diferentes tipos de mutações com 2 dosagens de neutrons rápidos ..	58
--	----

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Germinação das sementes e sobrevivência das plantas na geração M_2 em relação às dosagens de neutrons rápidos aplicados às sementes M_1	31
2 - Germinação das sementes M_3 em relação às dosagens de neutrons rápidos aplicadas às sementes M_1	35
3 - Taxas de mutações determinadas na geração M_3 , para as classes de mutações: morfológica, de clorofila e para hipocótilo verde	39
4 - Taxas de mutações determinadas na geração M_3 para todos os tipos de mutações observadas	40
5 - Mutante para coloração rosa do hipocótilo	44
6 - Mutante albino	44
7 - Mutante xanta	45
8 - Mutante com folhas primárias albinas e hipocótilo com coloração verde normal	46
9 - Mutante rosa-verde	47
10 - Mutante verde-xanta	47
11 - Mutante maculada	48

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
12 - Mutante com folhas de coloração verde normal, albinas e albinas com manchas verdes e verdes com manchas brancas .	49
13 - Vista geral do ensaio, instalado em casa de vegetação, mostrando as plântulas M_3	50
14 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 3.21, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para o caráter mutante hipocótilo verde	61
15 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 3.21, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para a mutação verde-xanta	62
16 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 3.24, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para a mutação morfológica trifoliar (3 folhas primárias)	63
17 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 3.24, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para o caráter mutante viridis	64
18 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 3.24, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para o caráter mutante hipocótilo verde ...	65

Figura

Página

- 19 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.05, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante hipocótilo verde 66
- 20 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.05, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante hipocótilo verde-escuro 67
- 21 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.14, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante trifoliar 68
- 22 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.14, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante xanta 69
- 23 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.14, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para o caráter mutante hipocótilo verde 70

ESTUDOS SOBRE A ONTOGENIA E ALGUNS CARACTERES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) A PARTIR DE SEMENTES IRRADIADAS COM NEUTRONS RÁPIDOS

Maria Lúcia Steagall

Akihiko Ando
Orientador

RESUMO

A finalidade principal deste trabalho foi investigar a ontogenia em sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Costa Rica, usando-se como tratamentos mutagênicos, diferentes dosagens de neutrons rápidos. Utilizou-se os dados da contagem das mutações de clorofila, morfologia e coloração do hipocótilo, em progênies na geração M_3 e, taxas de segregação de heterozigotos determinadas em progênies na geração M_2 . A análise topográfica das plantas M_1 foi feita para localizar a posição das mutações dentro das inflorescências, o que permitiu verificar a condição química das plantas M_1 .

Estudos adicionais foram realizados pela determinação dos parâmetros: fertilidade das plantas M_1 , germinação das sementes e sobrevivência das plantas M_2 , germinação das sementes M_3 e frequências de mutações determinadas na geração M_3 .

Os resultados mostraram que o tratamento com 2,0 krad de neutrons rápidos, foi mais eficiente do que com 1,0 krad, causando uma maior

taxa de segregação que correspondeu a uma diminuição no número de células iniciais.

A análise topográfica das plantas M_1 mostrou que um mesmo tipo de mutação apareceu em diversas ramificações primárias de uma planta, e que mais do que um tipo de mutação ocorreu numa mesma ramificação primária. Isso sugeriu que na formação de uma ramificação primária estão envolvidas mais de uma célula inicial e que todas as ramificações primárias de uma planta originam-se das mesmas células iniciais.

Considerando que as mutações aparecem ao acaso e, quando determinadas pelos métodos convencionais, apresentam baixa frequência, os resultados obtidos neste trabalho mostraram a ocorrência de números relativamente altos de mutações por célula.

STUDIES ON ONTOGENY AND SOME CHARACTERS IN BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.)
THROUGH THE SEEDS IRRADIATED WITH FAST NEUTRONS

Maria Lúcia Steagall

Akihiko Ando

Adviser

SUMMARY

The principal purpose of the present study was to investigate the ontogeny of the seed of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), variety Costa Rica, irradiated with different doses of fast neutrons.

The characters analysed were chlorophyll, morphological and hypocotyl color mutations in the M_3 generation. Segregation ratios of the heterozygous seeds for these mutations in the M_2 generation were also considered. Topographical analysis of the M_1 plants were made to elucidate the position of mutations within their inflorescences, which allowed to verify chimeric formation in the M_1 plants originated from the irradiated seeds.

Additional studies were carried out to observe the effects of fast neutrons on: fertility of the M_1 plants, germination and survival of the M_2 plants, germination and mutation frequencies in the M_3 plants.

The results showed that the treatment with 2 krad of fast

neutrons was more effective than that with 1 krad, causing higher segregation ratios and consequent diminution of the initial cell number in the embryo.

The topographical analyses of the M_1 plants showed that the same type of mutations occurred in various primary branches, and more than one type of mutation could be present in a single primary branch, indicating that a primary branch can be differentiated from more than one initial cell.

Considering that mutations occur at random and that mutation rates determined through conventional methods are relatively low, the results of the present work showed that relatively high mutation frequency per cell can be obtained by fast neutron irradiation.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Phaseolus* L. é composto por várias espécies, as quais são agrupadas em "formas asiáticas" e "formas americanas". As "formas americanas" abrangem quatro espécies, das quais *Phaseolus vulgaris* L. é a mais cultivada. Na América Latina, esta espécie é plantada em grande escala, sendo que no Brasil foi sempre uma das culturas alimentares de maior importância, representando um dos principais produtos da dieta humana diária, sobretudo para a população de menor renda, que tem nessa leguminosa sua fonte básica de proteína.

A espécie *Phaseolus vulgaris* L. é amplamente distribuída através do mundo e apresenta grande variabilidade nos caracteres morfológicos e tipos ecológicos, formando um grande conjunto gênico em populações. Além disso, a autogamia e o ciclo vital curto são fatores que favorecem a realização de estudos genéticos nessa espécie que vem sendo estudada desde os tempos de MENDEL.

Em qualquer programa convencional de melhoramento de plantas, os métodos são alicerçados na variabilidade genética existente nas populações ou conseguida através da introdução de plantas de outras variedades e

posterior recombinação seguindo a hibridação e seleção. Entretanto, a utilização de mutagênicos físicos e/ou químicos fornece mais uma alternativa para a criação ou aumento desta variabilidade. Portanto, atualmente, a indução de mutações tem sido utilizada em vários países e, em alguns casos, com êxito, como uma técnica alternativa, ou às vezes como único recurso disponível no melhoramento das mais diversas culturas, principalmente em autógamas.

Desde que existe uma grande reserva de variabilidade genética entre as diferentes espécies de feijoeiro, é de grande interesse estudar quais os tipos e as frequências de mutantes que, realmente, são induzidos por radiações ionizantes e, principalmente, investigar se estas podem induzir certos tipos de mutações que são extremamente raras ou desconhecidas na população natural.

Alguns trabalhos efetuados, utilizando tanto os mutagênicos físicos como os químicos, têm demonstrado a importância do conhecimento da ontogenia da semente do feijoeiro para o melhoramento dessa cultura, por permitir uma estimativa do tamanho amostragem necessária para a detecção da máxima frequência de mutação.

O presente trabalho teve como principal finalidade estudar a ontogenia em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Costa Rica, cujas sementes foram submetidas a tratamentos com diversas dosagens de neutrons rápidos. Esse estudo foi efetuado através das taxas de segregação para mutações de clorofila, morfologia e coloração do hipocótilo, verificadas na geração M_3 . Além disso, procurou-se estabelecer a relação entre as diversas dosagens de radiação aplicadas às sementes e a germinação e sobrevivência na geração M_2 , germinação na geração M_3 e a fertilidade das plantas M_1 , verificando-se também o papel da seleção diplôntica durante o desenvolvimento dessas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os assuntos abordados nesta revisão são apresentados em quatro tópicos: a) Generalidades sobre a indução de mutações no melhoramento de plantas, com ênfase às aquelas produzidas por neutrons rápidos; b) Fertilidade das plantas M_1 ; c) Coloração do tegumento da semente e sua relação com a coloração do hipocótilo; d) Quimerismo em plantas.

2.1. Generalidades sobre a indução de mutações no melhoramento de plantas

Desde a descoberta dos raios-X por ROENTGEN em 1895, muitas investigações têm sido feitas para determinar seus efeitos sobre os organismos vivos. Apesar disso, somente ficou estabelecido que irradiações com raios-X podem acarretar mutações a partir dos resultados obtidos por MULLER (1927) em *Drosophila melanogaster*.

STADLER (1928 a, 1928 b) demonstrou em cevada e em milho o mesmo fenômeno descrito por MULLER (1927), sendo assim obtidos os primeiros resultados em cereais irradiados. Um estudo desse tipo foi feito por GENTER e BROWN em 1938 (publicado em 1941), submetendo à ação dos raios-X

sementes de feijão, com os objetivos de determinar os tipos de mutações que poderiam ser produzidas e as suas respectivas taxas.

OLIVER (1930) e DEMEREC (1933) analisaram a relação entre a frequência de mutação letal em *Drosophila* e a dosagem de raios-X aplicada, e concluíram que a frequência de mutação aumentava proporcionalmente ao aumento da dosagem. Resultados similares foram encontrados por TIMOFÉEFF-RESSOVSKY *et alii* (1935). Desde essa época, os efeitos biológicos das radiações têm sido estudados, tanto sob o ponto de vista básico quanto do aplicado, por grande número de pesquisadores.

Em 1942, Auerbach e Robson, como citado por AUERBACH (1949) descobriram o primeiro agente químico capaz de produzir mutações nos organismos. Essa substância, o gás mostarda, foi usado em *Drosophila me-*
lanogaster causando efeitos semelhantes aos dos raios-X. Com essa descoberta, uma grande quantidade de produtos químicos têm sido tes-
tados, apresentando bons resultados como agentes mutagênicos (KONZAK *et alii*, 1965).

Os estudos dos efeitos dos mutagênicos físicos e químicos po-
dem ser realizados pelo tratamento de todas as partes da planta. Mas, segun
do BRIGGS e KONZAK (1977) e KAMRA e BRUNNER (1977), a escolha a ser feita
pelo pesquisador, concernente à parte da planta ou estágios mais apropria-
dos à exposição aos mutagênicos, deve levar em conta os objetivos do experi-
mento e requer um certo conhecimento do material a ser estudado. Os autores
ressaltam ainda que as sementes parecem constituir material favorável em mui
tos experimentos de indução de mutação.

A radiação-X foi a primeira das radiações ionizantes empre-

gadas pelos geneticistas para a indução de mutações em plantas, como citado anteriormente. No entanto, com a introdução dos reatores nucleares, passou-se a utilização dos neutrons. Os neutrons, segundo BRIGGS e CONSTANTIN (1977), com uma ampla gama de energia, podem ser obtidos de um reator onde o ^{235}U é submetido à fissão nuclear. Assim, com base em seus espectros energéticos, eles são divididos em rápidos e térmicos. A maioria tem energia entre 0,5 e 2,0 MeV e são denominados de neutrons rápidos. Por reação com moderadores, tais como carbono e hidrogênio, os neutrons rápidos são reduzidos em sua energia a cerca de 0,025 eV e recebem, nesse estado, a denominação de neutrons térmicos.

Quando comparados com as radiações esparsamente ionizantes como os raios-X ou a radiação gama, os neutrons térmicos e rápidos são considerados mais eficientes na indução de vários efeitos biológicos. Entretanto, não foram detectadas diferenças nos efeitos biológicos entre os dois tipos de neutrons em trabalhos realizados em cevada por CALDECOTT (1955).

Há algumas décadas atrás, entretanto, o uso dos neutrons foi prejudicado por falta de técnicas dosimétricas adequadas, por falta de dosimetria uniforme para o uso dos vários reatores e pelos diversos procedimentos ao reportar a dosagem e o espectro de neutrons usados (SMITH, 1961). Assim, existe um certo grau de confusão em relação aos resultados dos primeiros experimentos realizados com neutrons.

Os neutrons têm se mostrado altamente eficientes na indução de mutações em plantas. Podemos observar pelos resultados experimentais obtidos em diversos trabalhos com neutrons rápidos, que dependendo da cultivar e da finalidade proposta, eles apresentarão uma maior ou menor

eficiência.

Irradiando grãos de pólen de *Tradescantia spp* com várias dosagens de neutrons rápidos, GILES (1943) observou que as frequências das aberrações cromossômicas aumentavam linearmente com as dosagens. Resultados semelhantes a estes foram obtidos por PILCH (1977) quando irradiou grãos de centeio com dosagens de neutrons rápidos variando de 410 a 2150 rad. Este autor também verificou que o índice mitótico, determinado em células meristemáticas de pontas de raízes, decresceu com o aumento da dosagem de radiação aplicada.

Estudos mostraram que a sobrevivência das plântulas M_1 sofre uma redução proporcional ao aumento das dosagens de neutrons aplicadas (BIRDIE YEH e HENDERSON, 1963; MIKAELSEN *et alii*, 1968; PILCH, 1977).

SARAFI (1974) fez uma comparação de uma variedade controle de feijoeiro com mutantes dessa variedade selecionados na geração M_4 , obtidos por aplicação de neutrons rápidos e demonstrou que: (i) o número de vagens por planta em um dos mutantes foi significativamente mais elevado do que no controle; (ii) o número de sementes por vagem foi mais baixa na maioria dos mutantes; (iii) o peso de 100 sementes foi significativamente mais alto em dois dos mutantes selecionados.

Um experimento efetuado para comparar os efeitos das radiações ionizantes e mutagênicos químicos, foi feito por KULIEV (1978) em *Gossypium hirsutum*. O autor verificou que o mutagênico mais eficiente em termos de frequência de mutação foram os neutrons rápidos, mas em relação à percentagem de mutantes úteis, a etilenimina tomou o primeiro lugar.

Num estudo sobre o uso da irradiação com neutrons no desen-

volvimento de novas variedades de plantas cultivadas, com particular referência ao melhoramento de lentilha, ervilha, feijão, cevada e nabo, UHLIK (1979) apresenta dados sobre a eficácia de ambos neutrons, rápidos e térmicos, em comparação com outros mutagênicos físicos e químicos. As conclusões tiradas foram: para a lentilha, o N-nitroso-N-etilurêia mostrou-se mais eficiente do que os neutrons rápidos ou térmicos, na indução de mutantes de clorofila na geração M_2 ; já para o nabo, os neutrons térmicos foram mais eficientes do que o N-nitroso-N-etilurêia.

Diversos experimentos realizados com neutrons rápidos, mostram a obtenção de mutantes úteis para diferentes características. Entre estes, salientam-se aqueles pelos quais foram selecionados mutantes para:

- (i) maior teor de proteína nos grãos: VASILEVA (1975) em ervilha, NAGL (1979) em *Vicia faba*, SAJÓ (1979) e MONYO e SUGIYAMA (1979) em arroz, HADJICHRISTODOVLOV e DELLA (1979) em cevada;
- (ii) maior número de sementes/planta: VASILEVA (1975) e GOTTS CHALK (1977) em ervilha, MONYO e SUGIYAMA (1979) e SAJÓ (1979) em arroz;
- (iii) mais alta resistência a doenças: SAJÓ (1979) em arroz e STOILOV e POPOV (1978) em linhagens de milho;
- (iv) arquitetura da planta: VASILEVA (1975) em ervilha.

2.2. Fertilidade de plantas M_1

Existem diversos caracteres utilizados para a determinação da fertilidade das plantas M_1 em feijão: número de ramificações/planta, número de vagens/planta, número de sementes/planta, número de vagens/ramificação e número de sementes/ramificação. MOTTO *et alii* (1975), estudando os efeitos de diferentes dosagens de mutagênicos químicos sobre a fertilidade das plantas M_1 de feijão, verificaram que os números médios de ramificações primárias, de vagens e de sementes por planta, decresceram com o aumento das dosagens empregadas. Os caracteres "vagens e sementes por ramificação" não foram significativamente diferentes entre os tratamentos. Concluíram, então, pelos resultados obtidos, que a fertilidade das plantas M_1 parece ser principalmente dependente do número de ramificações.

Estudos efetuados em arroz por BIRDIE YEH e HENDERSON (1963), MIKAELSEN *et alii* (1968), MIAH e AWAN (1971) e EL-KEREDY e ABD-ALLA (1976), levaram à conclusão de que com o aumento das dosagens de radiação ocorre um decréscimo da fertilidade. Mas a relação entre o efeito e as dosagens foi mostrado ser não linear por YAMAGUCHI (1962) e variável de acordo com a variedade estudada (EL-KEREDY e ABD-ALLA, 1976).

WOO *et alii* (1971), aplicando radiação gama em grãos de arroz, verificaram que em dosagens relativamente baixas de 20 a 25 krad, havia uma predominância de plantas M_1 semi-férteis, e para a dosagem de 30 krad apareciam mais semi-estéreis, sendo que para 40 e 50 krad, a maioria das plantas era altamente estéril. Os autores concluíram, portanto, que a fertilidade apresenta-se em diversas gradações que variam proporcionalmente às dosagens empregadas.

Muitos pesquisadores acham que a esterilidade resultante da irradiação pode ser atribuída a anormalidades cromossômicas. Em plantas de arroz, Nagamatsu (1950) e Nishimura (1950), citados por MATSUO *et alii* (1958), reportaram que a maior parte das plantas estéreis produzidas após a explosão da bomba atômica mostraram várias trocas cromossômicas em sua meiose, e além disso, a esterilidade parcial, seguindo-se a irradiação-X era, principalmente, devida a translocações recíprocas dos cromossomos. Concordantemente, MATSUO *et alii* (1958) supuseram que a esterilidade induzida pela irradiação é fundamentalmente devida a aberrações cromossômicas e a elevação do número de panículas completamente estéreis, conforme o aumento das dosagens, deve estar relacionada a uma substituição de um tipo de aberrações cromossômicas por outro mais complicado. YESODA RAJ *et alii* (1972) também verificaram que o aumento nas dosagens de irradiação resultou em uma maior porcentagem de aberrações cromossômicas..

2.3. Coloração do tegumento e sua relação com a coloração do hipocótilo

Os genes que determinam a coloração dos tegumentos seminais do feijão comum têm sido muito estudados por diversos autores, entre os quais LAMPRECHT (1935 a, 1947), SMITH (1939) e PRAKKEN (1942, 1959, 1970). Alguns autores como SHAW e NORTON (1918), KOOIMAN (1931), SMITH (1939), FEENSTRA (1960) e YARNELL (1965), desenvolveram esquemas genéticos que explicam a transmissão da coloração.

Segundo VIEIRA (1967) a coloração do hipocótilo do feijoeiro pode ser classificada em três tipos: vermelho, rosa e verde. Todavia, este é um caráter geneticamente muito complexo, pois envolve uma série de

alelos múltiplos que governam a coloração do hipocótilo e ao mesmo tempo das flores (LAMPRECHT, 1935 b), e também fatores inibidores que têm a capacidade de atuar sobre alguns desses alelos impedindo a sua ação (NAKAYAMA, 1958, 1959, 1965).

Alguns trabalhos efetuados e que são reportados a seguir, e videnciam muito bem a relação existente entre a coloração do tegumento e a do hipocótilo.

MOH (1971), tratando três variedades de feijão preto com di ferentes dosagens de EMS e radiação gama, obteve mutantes para a coloração da semente variando do branco, amarelo a diversos graus de marron. To dos esses mutantes estavam associados com uma mudança na coloração do hipo cótilo de vermelho para verde, possibilitando assim, sua detecção num está gio muito precoce do desenvolvimento da plântula. A maioria dos mutantes selecionados para coloração da semente apresentaram a mesma morfologia geral e hábito de crescimento que os seus parentais originais, mas diferiam também por produzirem sementes menores e em quantidade mais abundante.

CHOMÓN (1972) fazendo uso da correlação existente entre a coloração do hipocótilo e a do tegumento, já verificada por MOH e ALAN em 1971, e empregando EMS em diferentes cultivares de feijoeiro com tegumento preto e hipocótilo vermelho e em outras com tegumento e hipocótilo verme lhos, conseguiu induzir mutação no hipocótilo de coloração vermelha para verde. Assim, selecionou os mutantes no estágio de plântulas M_2 e verificou a existência de mutações para coloração da semente em quatro das seis cultivares estudadas. As mutações obtidas para coloração da semente foram: branca, amarela-pálida, marron, marron amarelado e preto com manchas brancas. Concluiu que estas são de caráter recessivo e monogênicos, transmiti

dos em forma mendeliana simples. Os mutantes para coloração da semente são devidos à mutação do gene *P* que determina a presença ou ausência da coloração do tegumento.

2.4. Quimerismo em plantas

A existência de quimeras em plantas é conhecida há várias centenas de anos. TANAKA (1927) citou a laranja Biazzeria, observada em 1644, como sendo o primeiro exemplo. Essa quimera sintética consiste de *Citrus aurantium* L. e *Citrus medica* L. Entretanto, foi WINKLER (1907), citado por FARESTVEIT em 1968, quem primeiramente usou o termo quimera para descrever uma planta composta de tecidos genotipicamente diferentes. WINKLER empregou o termo para designar plantas que consistem de tecidos de duas espécies diferentes de plantas, enquanto BAUR (1908, 1909), segundo FARESTVEIT (1968), estendeu este termo incluindo plantas compostas de tecidos genotipicamente diferentes derivados de uma mesma espécie de planta. Ao mesmo tempo, essa terminologia foi especificada de modo que as quimeras de WINKLER compreendiam aquelas normalmente instáveis, enquanto as quimeras de BAUR compreendiam as periclinais que ocorrem mais frequentemente e são os únicos tipos estáveis.

Após a descoberta do efeito mutagênico da radiação-X por MULLER, em 1927, o uso generalizado de sementes para a indução de mutação levou a um aumento no interesse do conhecimento sobre a estrutura quimérica das plantas M_1 provenientes de sementes tratadas. São denominadas sementes M_1 aquelas que receberam os tratamentos com mutagênicos físicos e/ou químicos.

STADLER (1930) foi o primeiro a mostrar que em milho as mu-

tações induzidas por irradiação de grãos apareciam como setores nas plantas M_1 . Demonstrou também que em cevada, as células iniciais presentes no embrião das sementes já estão diferenciadas, de modo que a ocorrência de uma mutação afeta somente uma espiga. Desde este tempo têm havido diversas tentativas no sentido de determinar o número de células iniciais presentes no embrião, em muitas espécies de plantas cultivadas.

Os estudos de GUSTAFSSON (1940), FREISLEBEN e LEIN (1943) e KAPLAN (1949, 1951), segundo D'AMATO (1965), sobre a relação de frequência de mutação em clorofila e a dose de radiação em cevada, acentuaram a importância da competição celular durante o desenvolvimento de uma planta M_1 , de semente irradiada.

ANDERSON *et alii* (1949) foram os primeiros a mostrar que a análise de setores mutados pode auxiliar em grande parte o estudo da ontogenia de órgãos em plantas. Relataram também que um pendão de milho tem origem a partir de 7 a 8 células já presentes no ápice da semente dormente.

CALDECOTT e SMITH (1952) e KAUKIS e REITZ (1955) investigando a distribuição de aberrações cromossômicas e de plântulas mutantes induzidas por raios-X em cevada e sorgo, respectivamente, apresentaram dados sobre o número de células embrionárias responsáveis pela organização do tecido generativo de uma espiga e panícula nestas espécies. Os primeiros concluíram que uma espiga de cevada desenvolve-se de uma única célula inicial, enquanto que, para o sorgo, KAUKIS e REITZ (1955) verificaram existir mais de uma célula inicial no embrião da semente.

BLIXT *et alii* (1958) observaram que em *Pisum* só ocorria mutação em uma ramificação e, portanto, concluíram que uma ramificação de

envolve-se de uma única célula inicial.

Em café foi verificado por MOH (1961) que, exceto para a epiderme, o desenvolvimento de um caule jovem ocorre através de uma única célula inicial. O autor baseou sua conclusão na alta frequência de mutantes não-quiméricos em R_1 , nas formas das curvas de resposta à dosagem de raios-X e neutrons e na associação da esterilidade do pólen com alguns mutantes.

ANDO (1970), utilizando radiação gama e EMS, mostrou que na cultivar de arroz Dourado Precoce, as ramificações primárias originam-se de uma única célula inicial. Verificou também que as panículas que floresciam primeiro foram provenientes de um maior número de células iniciais do que as que floresciam mais tardiamente. Além disso, através desse experimento, ficou demonstrado que o número máximo de células iniciais foi de seis e que este sofreu um decréscimo conforme o aumento da dosagem ou da concentração dos mutagênicos aplicados, sendo que esta última conclusão foi corroborada mais recentemente (1975) por MOTTO *et alii*, em feijão.

Em *Phaseolus vulgaris* L. MOTTO *et alii* (1975) determinaram as frequências de mutações por planta levando em consideração as gerações M_2 e M_4 . Trataram sementes dormentes com diferentes concentrações de solução de EMS e, com base nas taxas de segregação obtidas, verificaram que o número de células iniciais presentes no meristema apical do embrião, variou de três a oito para a planta toda e de um a três para as ramificações primárias. Os resultados experimentais indicaram uma origem pós-tratamento das iniciais da ramificação primária. Não foram encontradas evidências da ocorrência de seleção diplôntica durante a ontogenia de uma planta mutante na variedade estudada Royal Red.

Foram verificadas por alguns autores, diferenças quanto aos efeitos de mutagênicos químicos e físicos sobre as taxas de segregação observadas. Um dos trabalhos que demonstraram este fato foi realizado por YAMAGUCHI e MIAH (1964) que compararam os efeitos de radiações ionizantes (raios-X e gama) e etilenimina em doses relativamente baixas sobre grãos da cultivar Kinmaze de arroz. Observaram a existência de uma relação linear entre a frequência de mutação e a dose de raios-X e radiação gama e também que não havia diferença significativa na produção de mutações pelos dois tipos de radiação. Para os materiais irradiados com dose suficientemente baixa e tratados com etilenimina, as taxas de segregação dos mutantes em clorofila nas ramificações X_1 mostraram um grande déficit em recessivos. Com doses mais altas, entretanto, as taxas de segregação aproximaram-se da esperada de 25%.

Geralmente são utilizados três métodos para estimar as frequências de mutações em clorofila, induzidas por mutagênicos: determinação em plantas M_1 , espigas M_1 e plântulas M_2 . GAUL (1960, 1961), segundo MOHAN RAO (1972), trabalhando com cevada, considerou o método de plântulas M_2 superior aos outros dois métodos. Através de considerações teóricas e dados experimentais, concluiu que os métodos de análise de mutação em plantas M_1 e espigas M_1 , geralmente subestimam a verdadeira frequência de mutação, e sugeriu que isto seja causado pela variação do tamanho do setor mutante e esterilidade. Os resultados e cálculos de GAUL indicaram que o método de análise em plântulas M_2 é menos influenciado pela variação em tamanho dos setores mutantes e esterilidade induzida nas espigas. Em contraste, ARNASON *et alii* (1962), conforme MOHAN RAO (1972), acharam que a melhor medida de mutações transmitidas é obtida pelo método de espigas M_1 . Os autores sugeriram que o método de plântulas M_2 não fornece resultados

adequados porque o número total de plântulas mutantes detectadas está relacionado com o tamanho médio do setor mutante nas espigas mutadas, bem como o número de mutações esperadas. Após a comparação dos vários métodos de análise de mutação, SARVELLA *et alii* (1962) concluíram que taxas de mutação dignas de confiança, podem ser obtidas pelo método de espigas M_1 . Mais recentemente, outros autores como MOHAN RAO (1972), obtiveram resultados que concordam com os de GAUL (1960). O autor realizou estudos sobre os três métodos de medida de frequência de mutação em cevada, usando combinações de tratamentos com raios-X ou gama e DES. Considerou o método de plântulas M_2 superior aos outros dois métodos. Concluiu que os métodos de análise de plantas M_1 e espigas M_1 são incapazes de registrar a frequência de células iniciais mutantes em cada primórdio de espiga, que juntamente com a frequência de espiga primordial mutada, determina a frequência total de mutação induzida.

Há autores que sugerem que a determinação de mutantes em pesquisa sobre a formação de quimera oferece resultados mais precisos quando realizada na geração M_3 e que é mais vantajosa, principalmente quando o setor mutado na geração M_1 é de pequeno tamanho. Em cevada, GUSTAFSSON e MOES (1959), citados por MOTTO *et alii* (1975), verificaram que algumas mutações que segregaram na geração M_3 não haviam sido detectadas em M_2 . YAMAGUCHI (1962) realizou uma pesquisa sobre a formação de quimera em panícula X_1 após a irradiação de sementes dormentes de arroz e determinou a proporção de mutantes nas gerações X_2 e X_3 . Verificou que a taxa de segregação nas progênes X_2 foi significativamente menor que o esperado de 25%, mas que as taxas nas progênes X_3 aproximavam-se bastante da normal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O material usado para a realização do presente trabalho foi sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), da cultivar Costa Rica, fornecidas pelo Setor de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Essas sementes foram provenientes de ensaios de seleção efetuados pelo referido setor, junto à Estação Experimental de Tietê, do Instituto Agronômico de Campinas, SP. Tais ensaios foram levados a efeito com o objetivo específico de obter-se material com características bastante uniformes, tornando-se assim, ideal para ser empregado em experimentos de mutações induzidas, nos quais a uniformidade do material é altamente recomendável.

Como agente mutagênico foi utilizada a irradiação com neutrons rápidos, realizada no reator nuclear do Laboratório de Seibersdorf, da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), Viena, Áustria.

Algumas características gerais do material estudado, segundo TULMANN NETO (comunicação pessoal), são apresentadas a seguir: -

Origem da cultivar - Costa Rica

Porte da planta - ereto indeterminado

Coloração da semente - preta

Brilho da semente - fosco

Coloração da flor - violeta

Coloração do hipocótilo e das nervuras - vermelho escuro

Tempo de floração - 52 dias

Ciclo vital - 94 dias .

3.2. Métodos

3.2.1. Tratamentos mutagênicos

Sementes do material que serviu de base para o presente estudo foram irradiadas no reator do tipo "piscina" do Laboratório de Seibersdorf. Para esse tratamento o material foi colocado em saquinhos plásticos, e irradiado pelo método de "mergulho", dentro da "piscina".

A intensidade de radiação usada foi de 0,278 krad/min, a uma potência de 7,5 MW.

Os tratamentos mutagênicos foram realizados através da aplicação de neutrons rápidos nas seguintes dosagens: 0, 0,5 e 1,0 krad em 400 sementes; 1,5, 2,0 e 3,0 krad em 500 sementes e 2,5 krad em 550 sementes. Logo depois de irradiado, o material foi enviado ao Brasil.

3.2.2. Execução experimental

O material tratado com neutrons rápidos foi recebido de Viena em 24/02/77 e o ensaio foi instalado em campo experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, em Piracicaba, em 22/04/77.

As sementes M_1 dos 7 tratamentos foram semeadas em um espaçamento de 40 cm entre fileiras e 20 cm entre covas.

Em julho de 1977, as sementes M_2 produzidas pelas plantas M_1 sobreviventes foram colhidas vagem por vagem, ramificação por ramificação, planta por planta, separadamente em cada tratamento.

Para a obtenção da geração M_2 foram usadas as plantas M_1 que possuíam número razoável de sementes. Assim, foram tomadas sementes M_2 de 10 plantas M_1 , correspondentes a cada uma dos tratamentos de 0 e 1,5 krad e de 15 plantas M_1 , correspondentes aos tratamentos de 0,5, 1,0 e 2,0 krad. As dosagens de 2,5 e 3,0 krad foram letais. A semeadura foi feita em campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em fevereiro de 1979. As sementes M_2 foram semeadas em fileiras, com um espaçamento de 40 cm entre fileiras e 20 cm entre covas. Neste processo tomou-se o cuidado para identificar-se, posteriormente, as vagens pertencentes a uma determinada ramificação e a uma determinada planta. Desse modo, as sementes foram semeadas em progênies de cada vagem, de cada ramificação, pertencentes a uma certa planta, dentro de cada um dos tratamentos.

Aproximadamente 20 dias após a semeadura foram feitas as contagens dos números de sementes germinadas. Em maio, alguns dias antes da colheita, foram contados os números de plantas M_2 sobreviventes.

As plantas M_2 foram colhidas, separadamente, planta por planta, para cada um dos tratamentos.

As observações dos diferentes tipos de mutações originadas, e as determinações das respectivas frequências foram efetuadas em plântulas da geração M_3 . Para a coleta desses dados, as sementes M_3 de cada planta M_2 foram misturadas, tomando-se o cuidado de semear-se, como na geração M_2 , separadamente, sementes provenientes de cada vagem, de cada ramificação, dentro de uma determinada planta M_1 . Devido ao enorme volume de material a ser manipulado, nesta etapa do experimento, foram desprezados os tratamentos com 0,5 e 1,5 krad, utilizando-se assim, somente sementes M_3 oriundas dos tratamentos com 0, 1,0 e 2,0 krad, empregando-se para essa finalidade, respectivamente, progênies de 4, 11 e 11 plantas M_1 . Tais sementes M_3 foram semeadas em canteiros de areia, em casa de vegetação do Departamento de Genética, em um espaçamento de 5 cm entre fileiras e 5 cm entre covas (Figura 13).

Aos 7 e 9 dias após a semeadura foram feitas, respectivamente, as contagens dos números de sementes germinadas e o registro das plântulas mutantes.

Os valores das frequências de mutações foram obtidos pelo quociente entre o número de plântulas mutantes e o número total de plântulas M_3 observadas.

3.2.3. Classificação das mutações

Foram consideradas 5 classes de mutações: hipocótilo verde, hipocótilo rosa, clorofílicas letais, clorofílicas não-letais e morfoló-

gicas.

As mutações clorofílicas letais abrangeram os tipos albina (planta branca), xanta (planta amarela) e rosa-verde. As clorofílicas não-letais incluíram todos os demais tipos de mutações em clorofila registrados, e que também estão compreendidos na classificação de HOLM (1954), feita em cevada:

viridis - planta verde-clara

alvo-viridis - planta com folhas de coloração verde-clara e a extremidade superior de coloração branca

virido-albina - planta com folhas de coloração verde-clara na extremidade superior e branca na parte restante

alvo-xanta - planta cujas folhas são brancas na região superior e amarelas no restante

xanto-alva - planta com folhas brancas, cujas extremidades superiores apresentam cor amarela

virido-xanta - planta com folhas de coloração amarela e a extremidade superior de coloração verde-clara

xanto-viridis - planta com folhas de coloração verde-clara, cuja extremidade superior apresenta cor amarela

estriada - planta com folhas listradas longitudinalmente de branco e verde normal

maculada - planta com folhas manchadas de branco e verde normal

3.2.4. Fertilidade das plantas M_1

Com a finalidade de verificar-se os efeitos das diferentes dosagens de neutrons rápidos sobre a fertilidade das plantas M_1 , foram estudados os caracteres relacionados à fertilidade, tais como: número de ramificações primárias, número de vagens e número de sementes produzidas por planta. Para isto, protocolou-se o número de sementes de cada vagem dentro de uma determinada ramificação, dentro de uma determinada planta e dentro de uma determinada dosagem.

3.2.5. Taxa de segregação

As taxas de segregação obtidas após um tratamento mutagênico podem ser usadas para elucidar a natureza da condição quimérica das plantas tratadas. Para essa análise foram usados os diferentes tipos de mutações observadas na geração M_3 . As determinações foram efetuadas de diversas maneiras, conforme discriminação a seguir:

- (i) em cada tratamento, para todos os tipos de mutações observadas;
- (ii) para as mutações agrupadas em cinco categorias: hipocótilo verde, hipocótilo rosa, clorofílicas letais, clorofílicas não-letais e morfológicas, para cada tratamento;
- (iii) dentro de cada tratamento, conservando-se as categorias de mutações relacionadas no item (ii), mas considerando as plantas divididas em 4 grupos, conforme o número de ramificações primárias presentes em: plantas com uma, com 2, com 3 e com mais do que 3 ramificações primárias;

- (iv) para mutações agrupadas em: hipocótilo verde, hipocótilo rosa, clorofílicas e morfológicas, em plantas classificadas conforme o número de ramificações primárias, como citado no item (iii).

3.2.6. Número de células iniciais presentes no embrião das sementes e estrutura quimérica das plantas M_1

A determinação do número de células iniciais do embrião foi efetuada para cada planta de cada um dos tratamentos com 1,0 e 2,0 krad, para em seguida calcular-se o número médio de células iniciais por tratamento e para cada um dos tipos de mutações consideradas. Para isso, foram catalogados os mutantes das progênies M_3 provenientes de cada uma das plantas M_1 , separadamente. O modo como foram conduzidos os ensaios, descritos no item 3.2.2., tanto no campo, por ocasião do plantio da geração M_2 , quanto na casa de vegetação quando da semeadura das sementes da geração M_3 , permitiu que cada mutante observado pudesse ser identificado de maneira a se saber de qual vagem e de qual ramificação da planta M_1 foi originário. Isso também permitiu a elaboração de uma análise topográfica de cada uma das plantas M_1 com a finalidade de estudar-se a estrutura quimérica destas.

Considerando-se que se uma única célula inicial for envolvida na formação da inflorescência da planta M_1 , e esta sofrer uma mutação recessiva, as sementes M_2 que se originarão terão os genótipos AA, Aa e aa, na proporção de 1 : 2 : 1, para o loco em questão. Assim 50% das sementes M_2 de cada planta M_1 irão segregar na geração M_3 em proporção de 1 : 2 : 1, permitindo a observação dos mutantes recessivos. Para o caso das mutações letais, que apareceriam na geração M_2 em proporção de 25% seriam elimina-

das, sendo que somente plantas homozigotas AA, ou heterozigotas Aa para o referido loco, chegariam a produzir sementes M_3 . Seguindo-se esse raciocínio, os números de células iniciais foram determinados empregando-se as seguintes expressões:

$$x = \frac{z}{y} \quad \text{sendo} \quad y = \frac{a}{b}$$

onde: z = proporção esperada de heterozigotos, apresentando valores iguais a 0,5 (mutações não-letais) e a 0,67 (mutações letais) na geração M_2 ;

y = proporção observada de heterozigotos na geração M_2 ;

a = número de sementes M_2 heterozigotas;

b = número total de sementes M_2 produzidas pela planta M_1

x = número de células iniciais.

3.2.7. Análises estatísticas

3.2.7.1. Fertilidade das plantas M_1

Foram determinadas as médias dos números de: ramificações, vagens e sementes por planta dentro de cada dosagem. A partir destes dados foram efetuadas as relações de: ramificação/planta, vagem/planta, semente/planta, vagem/ramificação, semente/ramificação, dentro de cada tratamento, e os respectivos desvios padrão.

A análise da variância foi feita seguindo-se a Classificação Hierárquica com números desiguais nas sub-classes, e os valores das esperanças do Quadrado Médio foram estimados segundo ANDERSON e BANCROFT (1952), conforme o esquema:

<u>Fonte de Variação</u>	<u>G.L.</u>
Dosagem (D)	2
Planta (P)/D	23
Ramificação (R)/P/D	204
Vagem/R/P/D	414
<hr/>	<hr/>
Total	643

Os valores relativos aos números de sementes foram transformados em $\sqrt{x+1/2}$, segundo recomendação de STEEL e TORRIE (1960).

3.2.7.2. Germinação e sobrevivência na geração M_2

Os números de sementes M_2 germinadas e de plantas M_2 sobreviventes, dentro de cada tratamento, foram analisados, estatisticamente, pela determinação dos valores de χ^2 , aplicando-se o teste de contingência. Este teste foi efetuado para os seguintes casos:

- (i) entre as 5 dosagens conjuntamente;
- (ii) entre a testemunha (0 krad) e as demais dosagens;
- (iii) entre as dosagens de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 krad, combinadas 2 a 2.

3.2.7.3. Germinação na geração M_3

Para analisar-se a germinação das sementes M_3 foram também empregados os valores do χ^2 obtidos pelo teste de contingência realizado entre:

- (i) as 3 dosagens usadas;

- (ii) a testemunha e as demais dosagens;
- (iii) as dosagens de 1,0 e 2,0 krad.

3.2.7.4. Frequências de mutações em plântulas M₃

Os efeitos dos neutrons rápidos sobre as frequências de mutações foram verificadas, estatisticamente, pela determinação dos valores do χ^2 aplicando-se o teste de contingência. Este foi efetuado com os valores observados de plântulas mutantes e não-mutantes, para os mesmos casos citados no item 3.2.7.3. Para a análise foram considerados todos os tipos de mutações em conjunto, isto é, mutações de clorofila, para coloração do hipocótilo e morfológicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fertilidade das plantas M_1

Os danos fisiológicos observados na geração M_1 podem ser me didos quantitativamente de várias maneiras, sendo que uma delas é através da determinação da fertilidade das plantas M_1 .

MÜLLER (1966) em seus estudos realizados em *Arabidopsis thalia* na após tratamentos com EMS, concluiu que a obtenção do aumento das frequên- cias de mutações é limitada pelo aumento da esterilidade das plantas M_1 e não pelo aumento da letalidade na geração M_1 . E, para os propósitos do me lhoramento de plantas é, geralmente, desejável aqueles tratamentos mutagê- nicos que propiciem baixa esterilidade e altas frequências de mutações gê- nicas. Portanto, a fertilidade é um parâmetro importante a ser analisado pois pode representar um limite prático para o aumento da dosagem utili- zada.

Na Tabela 1 são apresentadas as estimativas da média e o respectivo desvio padrão dos caracteres relacionados à fertilidade da plan- ta: ramificações/planta, vagens/planta, sementes/planta, vagens / ramifica-

ção, sementes/ramificação, nos tratamentos com diferentes dosagens de neutrons rápidos. Os resultados obtidos mostraram que para a dosagem de 1,0 krad os valores para todos os caracteres estudados, foram superiores àqueles da dosagem de 2,0 krad, havendo assim, uma redução da fertilidade com o aumento da dosagem aplicada às sementes M_1 . Esses resultados concordam com os obtidos por MOTTO *et alii* (1975), que tratando sementes de feijão da cultivar Royal Red, com doses crescentes de EMS obtiveram uma diminuição nos valores desses mesmos caracteres. Para os referidos autores, a fertilidade depende principalmente, do número de ramificações, no entanto, os caracteres que se mostraram mais influenciados pela radiação no presente trabalho foram vagens/planta e sementes/planta. Em contraposição ao verificado por MOTTO *et alii* (1975), a testemunha apresentou valores inferiores aos dos tratamentos com neutrons rápidos. Provavelmente, isso possa ser explicado pelo pequeno número de plantas (em número de 4) usadas como controle, não se constituindo em uma amostra significativa, em relação ao número de plantas empregado nos tratamentos com neutrons rápidos, que foi de 11, para ambas dosagens (1,0 e 2,0 krad).

Com os dados relativos aos números de sementes, de vagens e ramificações por tratamento, foi realizada uma análise da variância, cujos resultados são apresentados na Tabela 2. A análise da variância mostra, através do Teste F, ao nível de 1% de probabilidade, que houve diferenças significativas entre dosagens, entre plantas dentro de dosagens e entre ramificações dentro de plantas, dentro de dosagens. O fato do F ser significativo para dosagens indica que as diversas dosagens afetaram diferentemente o comportamento das plantas em relação ao número de sementes produzidas. Da mesma forma, o comportamento das ramificações foi diferente dentro das plantas para cada dosagem testada.

TABELA 1 - Estimativa da média e respectivo desvio padrão dos caracteres relacionados à fertilidade das plantas M_1 , nos tratamentos com diferentes dosagens de neutrons rápidos.

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	Nº de Plantas M_1	Ramificações/ Planta	Vagens/ Planta	Sementes/ Planta	Vagens/ Ramificação	Sementes/ Ramificação
0	4	7,0±1,22	13,75±2,21	89,75±21,55	1,96±0,68	12,82±6,72
1	11	10,09±0,88	33,64±4,26	146,73±17,78	3,33±0,34	14,54±1,57
2	11	8,18±0,99	19,0±2,15	78,91±12,08	2,32±1,08	9,64±3,71

TABELA 2 - Análise da variância: efeitos dos neutrons rápidos sobre a fertilidade das plantas M_1 . Dados transformados em $\sqrt{x+1/2}$.

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F
Dosagem (D)	2	6,3449	19,3324**
Planta (P)/D	23	2,7631	11,1542**
Ramificação (R)/P/D	204	0,4327	2,0314**
Vagem/R/P/D	414	0,2190	
Total	643		

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.2. Germinação das sementes e sobrevivência das plantas na geração M_2 .

A Tabela 3 apresenta a percentagem média de germinação das sementes e sobrevivência das plantas na geração M_2 , para as 5 dosagens de radiação empregadas, assim como os valores determinados em relação à testemunha considerada como 100%.

Os valores percentuais de germinação das sementes e sobrevivência das plantas na geração M_2 , foram relacionados com as dosagens de neutrons rápidos recebidas pelas sementes M_1 , em gráficos que são mostrados na Figura 1.

Os resultados mostram (Tabela 3 e Figura 1), que com o aumento gradativo das dosagens de neutrons rápidos aplicadas às sementes,

não houve um decréscimo proporcional nas percentagens de germinação das sementes e sobrevivência das plantas da geração M_2 . Isso está de acordo com o esperado pois a germinação e a sobrevivência são parâmetros que podem ser empregados para determinar a radiosensitividade das plantas na geração M_1 , conforme mostram os resultados obtidos por diversos autores, entre os quais GENTER e BROWN (1941), GAUL (1960), YAMAGUCHI (1962), MIKAELSEN *et alii* (1968), ANDO (1970), BANDEL (1970) e STEAGALL (1977). Assim, na geração M_1 a literatura mostra que ocorre um decréscimo em germinação e sobrevivência com o aumento da dosagem de radiação empregada como um resultado de efeitos fisiológicos causados pelas radiações, e nas gerações subsequentes são detectados apenas os efeitos genéticos provocados pelas radiações.

TABELA 3 - Percentagem média de germinação das sementes e sobrevivência das plantas na geração M_2 , nos tratamentos com diferentes dosagens de neutrons rápidos*

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	Nº de Sementes Semeadas	Germinação (%)	Sobrevivência (%)
0	1145	42,71 (100,00)	32,92 (100,00)
0,5	1736	36,18 (84,71)	26,78 (81,35)
1,0	2386	48,51 (113,58)	38,06 (115,61)
1,5	311	9,65 (22,59)	7,72 (23,46)
2,0	1055	20,38 (47,72)	15,16 (46,05)

*: entre parênteses são apresentados os valores em relação à testemunha considerada como 100%.

FIGURA 1 - Germinação das sementes e sobrevivência das plantas na geração M_2 em relação às dosagens de neutrons rápidos aplicados às sementes M_1 .

O teste de contingência entre sementes germinadas e não germinadas, com todas as dosagens consideradas, mostrou um valor de χ^2 altamente significativo. Desse modo, procedeu-se a aplicação do referido teste, tomando-se a testemunha em relação às demais dosagens e também as outras dosagens consideradas 2 a 2. Os valores de χ^2 obtidos, que são significativos ao nível de 1% de probabilidade, constam da Tabela 4. O mesmo procedimento foi efetuado para plantas sobreviventes e não sobreviventes, sendo que os valores de χ^2 obtidos são mostrados na Tabela 5.

Os valores apresentados nas Tabelas 4 e 5 mostram que tanto para a germinação das sementes M_2 como para a sobrevivência das plantas M_2 houve diferenças significativas entre os valores da testemunha e os das demais dosagens; pode-se também observar, quando se comparou os efeitos das diversas dosagens aplicadas às sementes M_1 , que estas provocaram diferentes respostas, tanto na germinação como na sobrevivência da geração M_2 .

TABELA 4 - Valores de χ^2 obtidos pelo teste de contingência entre todos os tratamentos tomados 2 a 2, para a germinação das sementes M_2 .

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	0,5	1,0	1,5	2,0
0	12,40**	10,46**	116,54**	125,80**
0,5	-	62,24**	85,10**	77,68**
1,0	-	-	168,60**	241,36**
1,5	-	-	-	18,80**

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 5 - Valores de χ^2 obtidos pelo teste de contingência efetuado entre todos os tratamentos tomados 2 a 2, para a sobrevivência das plantas M_2 .

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	0,5	1,0	1,5	2,0
0	12,58**	8,81**	77,87**	93,87**
0,5	-	57,48**	52,74**	50,98**
1,0	-	-	112,01**	179,09**
1,5	-	-	-	11,43**

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Assim, houve um comportamento semelhante entre a germinação das sementes M_2 e a sobrevivência das plantas M_2 , contrariando as conclusões de YAMAGATA e SYAKUDO (1960) que não encontraram correspondência entre a germinação e a sobrevivência, em observações realizadas na geração X_2 , de grãos de arroz irradiadas com diferentes dosagens de radiação gama.

4.3. Germinação das sementes na geração M_3

Os valores percentuais obtidos pela contagem do número de sementes germinadas, aos 7 dias após a semeadura, constam da Tabela 6. Nesta tabela são mostrados os valores médios em percentagem da germinação das sementes M_3 nas 3 dosagens de neutrons rápidos empregadas e também es

tes dados determinados em relação ao valor da testemunha considerada como 100%. Esses valores da percentagem de germinação das sementes M_3 foram relacionados com as dosagens de radiações com neutrons recebidas pelas sementes M_1 e são mostrados num gráfico que é apresentado na Figura 2.

TABELA 6 - Percentagem média de germinação de sementes M_3 nos tratamentos com diferentes dosagens de neutrons rápidos.

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	Nº de Sementes M_3 Semeadas	Percentagem	Percentagem em Relação à Testemunha
0	16782	89,70	100,00
1,0	73048	86,72	96,68
2,0	14365	84,50	94,20

Pode-se verificar que o aumento gradativo das dosagens de neutrons rápidos aplicadas às sementes M_1 causou um decréscimo proporcional na percentagem de germinação das sementes M_3 . Embora, o decréscimo em germinação e sobrevivência, com o aumento da dosagem de radiação empregada, geralmente, seja encontrado quando se analisa a geração M_1 , conforme salientado anteriormente.

A análise estatística efetuada entre os 3 tratamentos considerados mostrou um valor de χ^2 altamente significativo, o que levou à realização do teste de contingência entre as sementes germinadas e não germinadas, com a finalidade de comparar-se o comportamento das sementes M_3 em relação à germinação, quando as sementes foram submetidas às dosagens de

FIGURA 2 - Germinação das sementes M_3 em relação às dosagens de neutrons rápidos aplicadas às sementes M_1 .

1,0 e 2,0 krad de neutrons rápidos. Também foi feita a comparação entre as dosagens de 1,0 e 2,0 krad. Os valores de χ^2 obtidos são mostrados na Tabela 7.

Os resultados obtidos (Tabelas 6 e 7 e Figura 2) indicam que quanto à germinação das sementes M_3 , o efeito foi mais acentuado para a dosagem mais elevada de 2,0 krad, e que os valores de χ^2 foram significativos nos testes efetuados para as comparações das dosagens de 0 e 1,0 krad, 0 e 2,0 krad e entre 1,0 e 2,0 krad. Isso evidencia que a aplicação das diferentes dosagens de radiação às sementes provocou diferenças no comportamento quanto à germinação das sementes M_3 .

TABELA 7 - Valores de χ^2 obtidos pelo teste de contingência entre todos os tratamentos, tomados 2 a 2, para a germinação das sementes M_3 .

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	1,0	2,0
0	109,05**	188,30**
1,0	-	49,60**

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade.

O comportamento da germinação e da sobrevivência na geração M_2 e germinação na geração M_3 , mostrou que houve um decréscimo nesses parâmetros com o aumento das dosagens de radiação aplicadas às sementes. Isso sugere algum efeito genético que seria transmitido às gerações posteriores. Tal assunto merece investigações mais profundas e cuidadosas, o

que não foi feito no presente trabalho, pelo fato de ser outro o objetivo principal deste.

4.4. Frequências de mutações na geração M_3

Para a elaboração desta etapa do trabalho, os mutantes registrados foram, primeiramente, agrupados em 4 classes de mutações: clorofílicas, morfológicas, para hipocótilo verde e para hipocótilo rosa. No entanto, para os cálculos das frequências de mutações foram usados 2 critérios: um, em que todas as mutações foram englobadas, sem distinção de classes, em cada tratamento; e outro no qual, para cada tratamento, as mutações foram consideradas separadamente para cada uma das classes.

Os números de plantas M_1 , M_2 e de sementes M_3 semeadas, foram bastante variáveis entre os tratamentos. Estes números, bem como as frequências de mutações calculadas, segundo o método citado no item 3.2.2., são apresentados na Tabela 8.

Foram construídos os gráficos, relacionando-se as dosagens de neutrons rápidos recebidas pelas sementes e as taxas de mutações obtidas na geração M_3 , os quais são mostrados nas Figuras 3 e 4.

Uma inspeção da Tabela 8 mostra que a frequência total de mutações foi mais alta no tratamento com dosagem mais elevada. Por outro lado, quando os cálculos das frequências de mutações foram realizados de acordo com o segundo critério utilizado, tais frequências para todas as classes de mutações, com exceção daquela para hipocótilo verde, foram mais elevadas na dosagem de 1,0 krad e decresceram na dosagem de 2,0 krad. Por

TABELA 8 - Número de: plantas M_1 e M_2 estudadas, sementes M_3 semeadas e percentagem de germinação; e número de mutantes e frequências de mutações para a coloração do hipocótilo, clorofilicas e morfológicas e frequência de mutação total nos diferentes tratamentos com neutrons rápidos.

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	Nº de Plantas M ₁	Nº de Plantas M ₂	Nº de Sementes M ₃ Semeadas	% de Germi- nação	Número de Mutantes				Frequências de Mutações				TOTAL
					Hipocótilo Verde	Hipocótilo Rosa	Cloro- fílicos	Morfo- lógicos	Hipocótilo Verde	Hipocótilo Rosa	Cloro- fílicas	Morfo- lógicas	
0	4	138	16782	89,70	56	-	2	18	0,0037	-	0,0001	0,0012	0,0050
1,0	11	695	73048	86,72	615	16	305	62	0,0097	0,0002	0,0048	0,0010	0,0158
2,0	11	150	14365	84,70	378	-	30	7	0,0311	-	0,0025	0,0006	0,0342

FIGURA 3 - Taxas de mutações determinadas na geração M_3 , para as classes de mutações: morfológica, de clorofila e para hipocótilo verde.

FIGURA 4 - Taxas de mutações determinadas na geração M_3 para todos os tipos de mutações observadas.

tanto, foram obtidos resultados antagônicos entre os dois critérios empregados. Com base nos fatos de que as 4 classes de mutações estudadas no presente trabalho são devidas a mutações ocorridas em diferentes "loci" e que alguns genes são mais mutáveis e outros mais estáveis como será discutido mais adiante, os resultados mais coerentes são aqueles obtidos quando foram consideradas as 4 classes de mutações distintamente. Essa comparação entre as frequências de mutações obtidas através de duas diferentes maneiras, sugere que o método a ser usado, a título de calcular-se tais frequências, deve ser cuidadosamente escolhido pois, poderá levar a resultados e conclusões totalmente errôneos. Aqueles resultados obtidos e tomados como reais podem ser melhor compreendidos e explicados, levando-se em conta as observações feitas por alguns autores, entre os quais STADLER (1931), KONZAK e SINGLETON (1956), LEA (1956) e SMITH *et alii* (1964), de que a frequência de mutações induzidas por radiação ionizante é diretamente proporcional à dosagem empregada, porém em dosagens muito elevadas, a frequência diminui devido ao aumento da esterilidade causada por aberrações cromossômicas (MOH e NILAN, 1956; MATSUO *et alii*, 1958; EHRENBERG, 1961) ou à morte ou eliminação das células iniciais mutadas (GAUL, 1960).

Pode-se também observar que dentro da mesma dosagem as frequências diferiram bastante, entre os diversos tipos de mutações estudadas. Talvez isso se deva ao fato já bem conhecido de que os diferentes genes não são igualmente mutáveis conforme mencionado anteriormente. Por exemplo, quando estudou a taxa de mutação espontânea em milho, STADLER (1942) encontrou que o gene r (para coloração) é relativamente mutável, enquanto que os genes para endosperma "waxy" (wx) e "shrunk" (sh) são relativamente estáveis. Também COX (1972) sugeriu que as taxas de mutação nos dife-

rentes "loci", na mesma célula podem diferir consideravelmente, e que essas taxas são controladas geneticamente. Supõe então, que os genes nos organismos superiores podem ser organizados não de acordo com a sua função, mas em diferentes segmentos do genoma que têm diferentes taxas de mutações intrínsecas.

Entre todos os tipos de mutações estudados, o que apresentou frequência mais elevada foi aquele para a coloração verde do hipocótilo. Como salientado na Revisão de Literatura, este tipo de mutação tem uma peculiar importância no melhoramento do feijoeiro, por estar correlacionada com a coloração do tegumento da semente. Este fenômeno é, provavelmente, devido ao efeito pleiotrópico do fator recessivo p que determina a ausência de coloração. Assim, experimentalmente, a herança da coloração do tegumento pode ser estudada através do estudo da herança da coloração do hipocótilo.

É bem conhecido o fato de que muitas cultivares de feijão preto têm uma resistência mais alta a doenças e maior capacidade de produção do que as variedades de outras cores (YGLESIAS, 1964), mas por causa de sua coloração o cultivo dessas variedades é limitado em muitas regiões, desde que a maioria do mercado consumidor tem preferência pelas variedades de feijão branco, vermelho ou amarelo. Por esse motivo, é altamente vantajosa a obtenção de mutantes a partir de feijão com tegumento preto, como já tem sido conseguido por alguns autores já mencionados, porque desse modo há oportunidade de isolar mutantes que, conservando as características favoráveis do original, apresente uma coloração do tegumento que permita a sua aceitação por parte da população que habitualmente não consome o feijão preto.

A Figura 5 mostra uma fotografia de um mutante para colora
ção rosa do hipocôtilo.

Quanto aos mutantes de clorofila foram encontrados os mais diversos tipos como por exemplo: albina (Figura 6), xanta (Figura 7), viridis, rosa, verde escuro, albina com hipocôtilo de coloração normal (Figura 8), rosa-verde (Figura 9), verde-rosa, verde-xanta (Figura 10), maculada (Figura 11), e mutante com folhas de coloração verde normal, folhas albinas e algumas verdes com manchas brancas (Figura 12).

As plantas da cultivar original Costa Rica apresentam duas folhas primárias cordiformes e as demais trifolioladas. Os folíolos são inteiros, deltóides, acuminados, sendo um terminal e os outros dois laterais e opostos. Entre os mutantes morfológicos foram observados aqueles com folhas primárias deltiformes. Vale a pena ressaltar que TULMANN NETO (1979) selecionou na cultivar Carioca, após o emprego de agentes mutagênicos, um mutante morfológico deste tipo, fazendo referência a uma possível associação entre esta forma das folhas primárias com a tolerância ao mosaico dourado do feijão. Outros mutantes morfológicos obtidos foram aqueles com 3, 4 ou 6 folhas primárias, os unifoliolares e os com folíolo bipartido.

Uma vista geral do ensaio mostrando as plântulas M_3 em casa de vegetação é apresentada na Figura 13.

O teste de contingência entre as plântulas mutantes e não mutantes, considerando-se todas as classes de mutações em conjunto, em todos os tratamentos, resultou num valor de χ^2 altamente significativo. Assim, procedeu-se à comparação entre as frequências de mutações ob

FIGURA 5 - Mutante para coloração rosa do hipocótilo.

FIGURA 6 - Mutante albino.

FIGURA 7 - Mutante xanta.

FIGURA 8 - Mutante com folhas primárias albinas e hipocótilo com coloração verde normal.

FIGURA 9 - Mutante rosa-verde.

FIGURA 10 - Mutante verde-xanta.

FIGURA 11 - Mutante maculada.

FIGURA 12 - Mutante com folhas de coloração verde normal, albinas e albinas com manchas verdes e verdes com manchas brancas.

FIGURA 13 - Vista geral do ensaio, instalado em casa de vegetação, mostrando as plântulas M_3 .

servadas na testemunha com as das dosagens de 1,0 e 2,0 krad e entre estas 2 últimas dosagens. Os valores de χ^2 obtidos e apresentados na Tabela 9, foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, para todas as comparações. Isso indica que as diferentes dosagens provocaram diferentes respostas em relação à frequência de mutações, quando sementes M_1 foram submetidas às diversas dosagens de neutrons rápidos.

TABELA 9 - Valores de χ^2 obtidos pelo teste de contingência entre todos os tratamentos tomados 2 a 2, para as frequências de mutações, determinadas na geração M_3 .

Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	1,0	2,0
0	103,17**	321,79**
1,0	-	188,42**

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.5. Taxas de segregação, número de células iniciais presentes no embrião e estrutura quimérica das plantas M_1

A semente é constituída de numerosas células e no embrião as diferentes regiões dos meristemas têm a potencialidade de dar origem a uma certa parte da planta. Após a irradiação das sementes é, portanto, esperada que a planta M_1 carregue uma mutação induzida somente em certas

partes, e outras partes sendo normais ou mutadas diferentemente. A região que contém a mutação é referida como sendo um setor mutado da planta que é geneticamente quimera. Portanto, o primeiro passo do pesquisador em um trabalho sobre mutação é determinar a frequência de células que carregam as mutações induzidas.

A grande maioria das mutações gênicas induzidas são recessivas, conseqüentemente não podem ser detectadas até a geração M_2 . Entretanto, o interesse real não consiste em determinar a frequência de mutação em termos do número total de células no embrião, mas sim daquelas iniciais que formarão a chamada linhagem germinativa, ou seja, somente a frequência de mutação daquelas iniciais no embrião que formarão, em última análise, o tecido generativo da inflorescência. O número de células iniciais expressa o número médio de células do qual deriva a geração M_2 (GAUL, 1963), ou o número geneticamente efetivo (LI e REDEI, 1969, citado por YAMAGUCHI em 1980). Assim, segundo esses autores, as células iniciais são aquelas que têm a capacidade de originar as linhagens celulares que podem ser detectadas, e o seu número não corresponde necessariamente ao número original de células iniciais presentes no momento do tratamento, isto é, o termo não tem o mesmo significado daquele usado pelos botânicos para indicar as células que irão formar um certo órgão.

Ocorrendo mutações nas células iniciais elas poderão sofrer seleção intra-somática (KAPLAN, 1951) ou seleção diplôntica (GAUL, 1957), durante o desenvolvimento das sementes, assim como a seleção haplôntica (GAUL, 1957) na meiose. Supondo que esses dois tipos de seleção não ocorram, a taxa de segregação esperada na geração M_2 , de fenótipos normais para mutantes, será de 3 : 1 se na formação do tecido generativo estiver enu

volvida uma única célula inicial ou se a mutação em questão for recessiva monogênica, como no caso da mutação de clorofila. Se mais do que uma inicial tomar parte na formação desse tecido, a taxa de segregação será menor que 25%, desde que as células não sofram a mesma mutação simultaneamente. Se houver seleção haplôntica e/ou diplôntica entre as células mutadas e não mutadas, a taxa de segregação sofrerá uma diminuição em virtude da eliminação das células, a não ser que as células iniciais já estejam bem diferenciadas no momento do tratamento como foi verificado por GAUL (1959). Neste caso, as células normais não poderão substituir aquelas mutadas que foram injuriadas ou lesadas pelo tratamento mutagênico, não havendo, portanto, nenhum dos dois tipos de seleção, fato este que parece ter acontecido no experimento em pauta.

Para a análise das taxas de segregação, foram usadas todas as mutações encontradas, isto é, aquelas que segregaram próximo a proporção de 3:1 como também aquelas extremamente distantes da referida proporção. Esses resultados são mostrados nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

Na Tabela 10 são apresentadas as taxas de segregação para os diferentes tipos de mutações estudados na geração M_3 , para cada um dos tratamentos recebidos pelas sementes na geração M_1 .

Através dos resultados das contagens dos números de mutantes agrupados em 5 classes assim distribuídas: hipocótilo verde, hipocótilo rosa, clorofílicas letais, clorofílicas não-letais e morfológicas, foram determinadas as taxas de segregação que constam da Tabela 11. Por observação dessa tabela pode-se verificar que a taxa de segregação sofreu uma elevação na dosagem de 2,0 krad em relação à dosagem de 1,0 krad, considerando-se as mutações para coloração verde do hipocótilo e clorofílicas

TABELA 10 - Taxas de segregação para todos os tipos de mutações estudados em plântulas M_3 , nos tratamentos com dosagens de neutrons rápidos.

Tipo de Mutação	Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)		
	0	1,0	2,0
Hipocótilo verde	0,3998	1,2931	3,8630
Hipocótilo rosa	-	0,2145	-
Viridis	-	0,1476	-
Xanta	-	0,0800	1,0798
Verde-xanta	0,0197	0,0700	0,1566
Verde com manchas mais claras	0,0197	0,3996	-
Rosa	0,0197	0,5582	-
Verde escuro	-	0,3996	0,3886
Verde-xanta e manchas rosa	-	0,1161	-
Unifoliar	-	0,1633	-
3 Folhas primárias	0,1204	0,0600	0,1137
4 Folhas primárias	-	0,0300	-
6 Folhas primárias	0,0200	-	-
Folha primária reduzida	-	0,3538	-
Folha bifurcada	0,0200	0,0300	-

letais. No caso das clorofílicas não-letais, houve um decréscimo com o aumento da dosagem sendo que as morfológicas praticamente, não foram influenciadas pela dosagem, em relação a taxa de segregação. Assim, os dados desta tabela indicam que não ocorreu um aumento proporcional da taxa de segregação em relação à dosagem, para todos os tipos de mutações considerados.

TABELA 11 - Taxas de segregação determinadas em plântulas M_3 nas classes de mutações observadas nos diferentes tratamentos com neutrons rápidos.

Classe de Mutação	Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)		
	0	1,0	2,0
Hipocótilo verde	0,3998	1,2931	3,8630
Hipocótilo rosa	-	0,2145	-
Clorofílicas letais	0,0197	0,4219	1,0797
Clorofílicas não-letais	0,0197	0,3269	0,2420
Morfológicas	0,1445	0,1128	0,1137

Da Tabela 12, constam as taxas de segregação calculadas de modo a englobar todos os tipos de mutações estudados, em cada um dos tratamentos. Os dados obtidos indicam que ocorreu uma elevação na taxa de segregação com o aumento da dosagem de radiação empregada.

Esses resultados não são compatíveis com as conclusões de MOTTO *et alii* (1975), onde a taxa de segregação não foi dependente da dose

do mutagênico por eles utilizado. Como foi mostrado, para alguns tipos de mutações estudadas no presente trabalho, tais conclusões não podem ser aplicadas.

TABELA 12 - Número de plantas M_1 e M_2 estudadas, sementes M_3 semeadas, percentagem de germinação, número de mutantes e taxas de segregação para todos os tipos de mutações considerados em conjunto, nos diferentes tratamentos com neutrons rápidos.

Dosagem de Neutrons Rápidos*	Nº de Plantas M_1	Nº de Plantas M_2	Nº de Sementes M_3 Semeadas	Porcentagem de Germinação	Nº de Mutantes	Taxa de Segregação
1,0	10	651	69029	85,52	1007	1,7057
2,0	8	115	11424	85,62	415	4,2411

*: em krad

Na Tabela 13 são mostradas as taxas de segregação e os números de células iniciais separadamente, para plantas com uma ramificação primária, com 2, com 3 e com mais do que 3 ramificações primárias em duas dosagens de neutrons rápidos, considerando-se as seguintes classes de mutações: hipocótilo verde, hipocótilo rosa, clorofílicas letais, clorofílicas não-letais e morfológicas. Pelo menos em relação à dosagem de 2,0 krad, de modo geral, a taxa de segregação decresceu com o aumento dos números de ramificações primárias das plantas. Considerando-se uma determinada classe de mutação, quanto maior o número de ramificações primárias que a planta possui maior o número de células iniciais. Essas observações sugerem

TABELA 13 - Taxa de segregação e número de células iniciais para classes de mutações consideradas em diferentes categorias de plantas M_1 , em duas dosagens de neutrons rápidos.

Categoria da Planta M_1	Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	Taxa de Segregação (T.S.) Número de Células Iniciais (N.C.I.)	Classes de Mutações				
			Hipocótilo Verde	Hipocótilo Rosa	Clorofílicas Letais	Clorofílicas Não-Letais	Morfológicas
Plantas com uma ramificação primária	1,0	T.S. N.C.I.	- -	- -	- -	0,04 12,5	0,08 12,5
	2,0	T.S. N.C.I.	50,60 0,6	- -	- -	0,60 1,8	0,29 3,5
Plantas com duas ramificações primárias	1,0	T.S. N.C.I.	- -	- -	- -	- -	- -
	2,0	T.S. N.C.I.	1,42 2,3	- -	1,08 5,9	0,12 8,5	0,14 5,6
Plantas com três ramificações primárias	1,0	T.S. N.C.I.	1,02 3,4	0,05 22,0	1,76 6,6	0,29 12,4	0,24 16,6
	2,0	T.S. N.C.I.	- -	- -	- -	- -	- -
Plantas com mais de três ramificações primárias	1,0	T.S. N.C.I.	1,42 3,9	0,37 25,0	0,04 50,2	0,35 20,6	0,06 20,8
	2,0	T.S. N.C.I.	1,19 1,5	- -	- -	0,13 5,0	0,06 10,0

que o número de células iniciais que sobrevivem na região meristemática de um embrião de feijão após os tratamentos com neutrons rápidos, está relacionado ao subsequente grau de desenvolvimento da planta, como já foi demonstrado em 1975 por MOTTO *et alii*, utilizando mutagênicos químicos.

Os valores médios dos números de células iniciais, calculados para cada tratamento para os diferentes tipos de mutação, constam da Tabela 14. Pode-se verificar que para os tratamentos com 2,0 krad os números encontrados de células iniciais presentes no embrião, para as mutações estudadas, foram menores do que para os tratamentos com 1,0 krad.

TABELA 14 - Número médio de células iniciais para os diferentes tipos de mutações em 2 dosagens de neutrons rápidos.

Tipo de Mutação	Dosagem de Neutrons Rápidos (krad)	
	1,0	2,0
Hipocótilo verde	3,7	1,9
Xanta	36,8	5,9
Verde-xanta	17,1	6,5
3 Folhas primárias	13,1	4,9

O aumento das dosagens de radiação acarreta uma elevação na probabilidade de aparecimento de danos letais nas células mutadas, as quais não poderão ser substituídas devido ao seu estado diferenciado. Consequentemente, a taxa de segregação aumenta e o número de células iniciais

sobreviventes diminui.

Os resultados expressos nas Tabelas 12, 13 e 14 evidenciam que de um modo geral, o tratamento com 2,0 krad de neutrons rápidos foi mais eficiente, causando uma maior taxa de segregação e, conseqüentemente, diminuição do número de células iniciais, quando comparado com a dosagem de 1,0 krad. Tal fato leva à conclusão de que no momento dos tratamentos mutagênicos com neutrons rápidos, as células iniciais presentes no embrião das sementes de feijão, já se encontravam diferenciadas. ANDO (1970) já havia chegado a essa conclusão em relação às células iniciais do embrião de arroz. É um fato bem conhecido que as mutações ocorrem ao acaso, e quando determinadas pelos métodos usuais sugeridos por GAUL (1960), aparecem em baixas frequências, mas o presente trabalho mostra que as mutações por célula ocorrem em frequências relativamente altas. Deste modo é válida a sugestão que ao conduzir-se um experimento com neutrons rápidos, em feijão, deve-se usar dosagem alta que possibilite o emprego de menor número de sementes e oferece oportunidade de obtenção de mais alta frequência de mutantes por célula.

Em pesquisa sobre a formação de quimera, tem sido dispensada atenção especial durante os últimos anos à estimativa do tamanho do setor mutado. Duas estimativas denominadas "a posteriori" e "a priori" têm sido usadas em adição à clássica estimativa baseada nas taxas de segregação M_2 de mutações de clorofila, isto é, sobre a relação inversa entre desvios de 20 - 25% em razões de segregações M_2 (índice para espiga heterozigota) e tamanho do setor mutado (menor o desvio, maior o tamanho). A estimativa "a posteriori" é fornecida pelo auxílio de uma análise "topográfica" que consiste essencialmente de localizar a posição de todos os mutantes

de clorofila dentro de uma inflorescência M_1 (SCARASCIA-MUGNOZZA, 1969).

Foram escolhidas algumas plantas com a finalidade de se demonstrar a análise topográfica realizada em todas as plantas. Os esquemas dessas análises são mostrados nas Figuras de números 14 a 23.

A Figura 14 mostra a representação esquemática, de heterozigotos para o mesmo caráter mutante (hipocótilo verde) em 4 ramificações primárias. Este fato pode ser notado em outros esquemas representativos da estrutura quimérica das plantas M_1 , mostrados nas Figuras 15, 17, 18, 19 e 20. A opinião de MORTO *et alii* (1975) a esse respeito é que tais eventos múltiplos podem derivar de mutações independentes ou podem vir de uma origem comum, isto é, todos os ramos envolvidos serem originários das mesmas células iniciais. Por outro lado, apareceram sementes heterozigotas para dois ou mais tipos de mutações, como pode ser observado por exemplo na planta nº 5.14, cujas análises topográficas são mostradas nas Figuras 21, 22 e 23. Pelas referidas figuras pode-se verificar que existe uma mesma semente heterozigota para os caracteres mutantes trifoliar e xanta, simultaneamente. Isso conduz a duas linhas de pensamento: uma delas é que uma mesma célula inicial sofreu dois ou mais tipos de mutações, e a outra é que a ramificação primária tenha se originado de mais do que uma célula inicial, sendo que cada uma delas tenha sofrido um tipo de mutação. Pelo que se sabe a respeito da probabilidade, infinitamente pequena, de duas mutações diferentes ocorrer na mesma célula, parece mais lógico que a segunda alternativa possa ser a mais aceita, isto é, que uma ramificação primária tenha mais do que uma célula inicial envolvida na sua formação.

FIGURA 14 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M₁ n^o 3.21, mostrando sementes M₂ heterozigotas e homizogotas dominantes para o caráter mutante hipocôtilo verde.

FIGURA 15 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 n° 3.21, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para a mutação verde-xanta.

FIGURA 16 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 n° 3.24, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para a mutação morfológica trifoliar (3 folhas primárias).

FIGURA 17 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 n° 3.24, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para o caráter mutante viridis.

FIGURA 18 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 3.24, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para o caráter mutante hipocótilo verde.

FIGURA 19 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 n° 5.05, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante hipocótilo verde.

FIGURA 20 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.05, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante hipocôtilo verde-escuro.

FIGURA 21 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.14, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante trifoliar.

FIGURA 22 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 n° 5.14, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes, para o caráter mutante xanta.

FIGURA 23 - Representação esquemática da análise topográfica da planta M_1 nº 5.14, mostrando sementes M_2 heterozigotas e homozigotas dominantes para o caráter mutante hipocótilo verde.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos concluiu-se que:

(a) Os caracteres estudados, relacionados à fertilidade das plantas M_1 foram influenciados diferentemente pelas dosagens de neutrons rápidos aplicados às sementes M_1 , sendo que os parâmetros vagens/planta e sementes/planta, mostraram-se mais sensíveis à irradiação.

(b) As sementes M_2 e M_3 e plantas M_2 , quanto à germinação e sobrevivência, mostraram um comportamento que sugeriu a existência de um efeito genético ocorrido em M_1 que, provavelmente, teria sido transmitido às gerações subsequentes. Nessas gerações pode-se observar um decréscimo nos valores dos referidos parâmetros, com o aumento da dosagem de radiação, de modo similar aos efeitos fisiológicos concernentes à M_1 .

(c) Dos resultados antagônicos das frequências de mutações determinadas por dois diferentes critérios (considerando-se todos os tipos de mutações observados em cada tratamento e para cada classe de mutação isoladamente), sugere-se que tais frequências serão mais corretamente estimadas, se estudadas separadamente, para cada tipo de mutação.

(d) Considerando-se os números baixos de plantas M_1 usadas e, as taxas de segregação obtidas, os resultados encontrados mostraram que as mutações por célula ocorrem em frequências relativamente altas, para os caracteres considerados.

(e) Pela comparação dos tratamentos com 1,0 e 2,0 krad, estes últimos foram mais eficientes, causando uma maior taxa de segregação, o que corresponde a uma diminuição no número de células iniciais. Portanto, em experimentos com neutrons rápidos, a dosagem de 2,0 krad permitirá a obtenção de alta frequência de mutantes por célula, a partir de pequeno número de sementes.

(f) As células iniciais presentes no embrião das sementes já se encontravam bem diferenciadas no momento dos tratamentos mutagênicos.

(g) É provável que mais do que uma célula inicial participe da formação de uma ramificação primária.

(h) Todas as ramificações primárias de uma planta originam-se das mesmas células iniciais.

6. LITERATURA CITADA

- ANDERSON, E.G.; E. LONGLEY; C.H. LI e K.L. RETHERFORD, 1949. Hereditary effects produced in maize by radiation from the Bikini atomic bomb. I. Studies on seedlings and pollen of the exposed generation. *Genetics*, Texas, 34: 639-646.
- ANDERSON, R.L. e T.A. BANCROFT, 1952. *Statistical theory in research*. New York, Mc Graw-Hill Book Company, Inc. 399 p.
- ANDO, A., 1970. Efeito biológico da combinação de tratamentos com raios-gama, cisteína e algumas substâncias alquilantes sobre sementes de arroz. Piracicaba, ESALQ/USP, 117 p. (Tese de Doutorado).
- AUERBACH, C., 1949. Chemical mutagenesis. *Biological Review*, Cambridge, 24: 355-391.
- BANDEL, G., 1970. Metodologia da indução de mutações em eucalipto. Piracicaba, ESALQ/USP, 84 p. (Tese de Mestrado).
- BIRDIE YEH e M.T. HENDERSON, 1963. Effects from irradiation of rice seed with gamma rays and neutrons on several characteristics of the R_1

- generation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Taiwan, 4(2): 90-102.
- BLIXT, S.; L. EHRENBORG e O. GELIN, 1958. Quantitative studies of induced mutations in peas. I. Methodological investigations. *Agri Hortique Genetica*, Landskrona, 16: 238-250.
- BRIGGS, R.W. e M.J. CONSTANTIN, 1977. Mutagenic radiation: radiation types and radiation sources. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 2a. ed. p. 33-39.
- BRIGGS, R.W. e C.F. KONZAK, 1977. Mutagenic radiation: objects and methods of treatment. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 2a. ed. p. 33-39.
- CALDECOTT, R.S., 1955. The effects of X-rays, 2 MeV electrons, thermal neutrons and fast neutrons on dormant seeds of barley. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, 59: 514-533.
- CALDECOTT, R.S. e L. SMITH, 1952. A study of X-ray-induced chromosomal aberrations in barley. *Cytologia*, Tokyo, 17: 224-242.
- CHOMÓN, J.C.G., 1972. Inducción de mutaciones de color de Semilla con metanosulfonato de etilo en el frijol. Turrialba, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 38 p. (Tese de Mestrado).
- COX, C.D., 1972. Organization of higher chromosomes. *Nature*, London, New Biol., 239, p. 133.
- D'AMATO, F., 1965. Chimera formation in mutagen treated seeds and diploidy selection. In: *The Use of Induced Mutations in Plant Breeding. Radiation Botany* (Supplement), New York, 5: 303-316.
- DEMEREK, M., 1933. The effect of X-ray dosage on sterility and number of lethals in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy*

- of Science*, Washington, 19: 1015-1020.
- EHRENBERG, A., 1961. Research on free radicals in enzyme chemistry and in radiation biology. Free radicals in biological systems (BLOIS, M.S., Jr., Ed.) Academic Press, New York, p. 337-350.
- EL-KEREDY, M.S. e S.A. ABD-ALLA, 1976. A study of differences in the radiosensitivity of some rice varieties. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, Egito, 5: 48-57.
- FARESTVEIT, B., 1968. Flower colour chimeras in glasshouse carnations, *Dianthus caryophyllus* L. In: *Year Book 1969*. Royal Veterinary and Agricultural College Copenhagen, p. 19-33.
- FEENSTRA, W.J., 1960. Biochemical aspects of seed-coat colour inheritance in *Phaseolus vulgaris* L. *Medelelingen van de Landbouwhogeschool Wageningen*, Netherlands, 60(2): 1-553.
- GAUL, H., 1957. Die verschiedenen bezugssysteme der mutationshaufigkeit bei pflanzen angewendet auf dosis-effektkurven. *Z. Pflanzenz*, 38: 63-76.
- GAUL, H., 1959. Über die Chimarenbildung in Gerstenpflanzen nach Röntgenbestrahlung von Samen. *Flora*, 147: 207-241.
- GAUL, H., 1960. Critical analysis of the methods for determining the mutations frequency after seed treatment with mutagens. *Genetica Agraria*, Roma, 12: 297-318.
- GAUL, H., 1963. Mutationen in der pflanzenzüchtung. *Z. Pflanzenzuecht.*, 50: 194-307.
- GENTER, C.F. e H.M. BROWN, 1941. X-ray studies on the field bean. *The Journal of Heredity*, Washington, 32: 39-44.

- GILES JR., N.H., 1943. Comparative studies of the cytogenetical effects of neutron and X-rays. *Genetics*, Texas, 28(5): 398-418.
- GOTTSCHALK, W., 1977. Fasciated-peas-unusual mutants for breeding and research. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, 2: 27-33.
- HADJICHRISTODOVLOV, A. e A. DELLA, 1979. High protein barley mutants in Cyprus. *Mutation Breeding Newsletter*, Vienna, 13: 11-12.
- HOLM, G., 1954. Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*, Escandinávia, 4: 457-471.
- KAMRA, O.P. e H. BRUNNER, 1977. Chemical mutagens: objects and methods of treatment. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 2a. ed. p. 65-66.
- KAPLAN, R.W., 1951. Chromosomen-und faktormutationsraten in Gerstenkornern bei verschiedenartigen Quellungsbehandlungen oder Kalte wahrend oder nach der Roentgenbestrahlung sowie Dosisfraktionierung. *Z. Ind. Abst. Vereb.*, 83: 347-382.
- KAUKIS, K. e L.P. REITZ, 1955. Ontogeny of the *Sorghum* inflorescence as revealed by seedling mutants. *American Journal of Botany*, California, 42: 660-663.
- KONZAK, C.F. e W.R. SINGLETON, 1956. The effects of thermal neutron radiation on mutation of endosperm loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Science*, New York, 42: 78-84.
- KONZAK, C.F.; R.A. NILAN; J. WAGNER e R.J. FOSTER, 1965. Efficient chemical mutagenesis. In: *The Use of Induced Mutations in Plant Breeding*.

Radiation Botany (Supplement), New York, 5: 49-70.

- KOOIMAN, H.N., 1931. Monograph on the genetics of *Phaseolus* (especially *P. vulgaris* and *P. multiflorus*). *Bibliographia Genetica*, Netherlands, 8: 295-413.
- KULIEV, A.A., 1978. Comparison of the effects of ethyleneimine and ionizing radiation on cotton seeds. In: *Khim. mutagenез i gibridizatsiya*, Moscow, p. 134-136.
- LAMPRECHT, H., 1935 a. Zur Genetik von *Phaseolus vulgaris*. XI. Eine Mutante mit einfachen Blaettern und Ihre Vererbungsweise. *Hereditas*, Landskrona, 20: 238-250.
- LAMPRECHT, H., 1935 b. Zur Genetik von *Phaseolus vulgaris*. XII. Ueber die Vererbung der Blumen- und Stammfarbe. *Hereditas*, Landskrona, 21: 129-166.
- LAMPRECHT, H., 1947. The seven alleles of the genes *R* of *Phaseolus*. *Agri Hortique Genetica*, Landskrona, 5(1-2): 46-64.
- LEA, D.E., 1956. *Actions of radiations on living cells*. 2a. ed. London, Cambridge University Press. 416 p.
- MATSUO, T.; H. YAMAGUCHI e A. ANDO, 1958. A comparison of biological effects between thermal neutrons and X-rays on rice seeds. *Japanese Journal of Breeding*, Japan, 8: 37-45.
- MIAH, A.J. e M.A. AWAN, 1971. Induced mutations in rice. In: *Rice Breeding with Induced Mutations III*. Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 77-89.

- MIKAELSEN, K.; I. KISS e K. OSONE, 1968. Some effects of fast neutrons and gamma radiation on rice. *In: Neutron Irradiation of Seeds II*. Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 49-54.
- MOH, C.C., 1961. Does a coffee plant develop from one initial cell in the shoot apex of an embryo ? *Radiation Botany*, New York, 1: 97-99.
- MOH, C.C., 1971. Mutation breeding in seed-coat colors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, Holanda, 20: 119-125.
- MOH, C.C. e R.A. NILAN, 1956. Reduced gene transmission in radiation-induced mutant barley. *The Journal of Heredity*, Washington, 47: 129-131.
- MOH, C.C. e J.J. ALAN, 1971. Correlation between seed-coat color and the seedling characters in *Phaseolus vulgaris* L. *Turrialba*, Costa Rica, 21: 173-175.
- MOHAN RAO, P.K., 1972. The relative merits of the three methods of measuring mutations frequency in barley. *Radiation Botany*, New York, 12: 323-329.
- MONYO, J.H. e T. SUGIYAMA, 1979. *Improvement of seed protein in rice through mutation breeding*. Tanzania, Fac. Agric., For. & Veterinary Sci., Dar es Salaam Univ.
- MOTTO, M.; G.P. SORESSI e F. SALAMINI, 1975. Mutations frequencies and chimeric formation in *Phaseolus vulgaris* after EMS treatment of dormant seeds. *Radiation Botany*, New York, 15: 291-299.
- MULLER, H.J., 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*, Washington, 66: 84-87.

- MÜLLER, A.J., 1966. Die Induktion von rezessiven Lethalmutationen durch Athylmethansulfonat bei *Arabidopsis*. I. Dosis-Effekt-Beziehungen und deren Beeinflussung durch die Behandlungsbedingungen. *Züchter*, 36: 201-220.
- NAGL, K., 1979. Mutation and breeding work on *Vicia faba* in Austria. *FABIS Newsletter*, Vienna, 19(1).
- NAKAYAMA, R., 1958. Genetical studies on kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) II. On the inheritance of hypocotyl color. 1. *Bulletin of the Faculty of Agriculture of the Hirosaki University*, Japan, 4: 80-87.
- NAKAYAMA, R., 1959. Genetical studies on kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) IV. On the inheritance of hypocotyl color. 2. *Bulletin of the Faculty of Agriculture of the Hirosaki University*, Japan, 5: 6-13.
- NAKAYAMA, R., 1965. Genetical studies on kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). VIII. A new allele at the *C* locus. *Bulletin of the Faculty of Agriculture of the Hirosaki University*, Japan, 11: 55-58.
- OLIVER, C.P., 1930. The effect of varying the duration of X-ray treatment upon the frequency of mutation. *Science*, Washington, 71: 44-46.
- PILCH, J., 1977. The response of an inbred line of the rye Rogalinske H to various doses and kinds of radiation. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 131: 29-40.
- PRAKKEN, R., 1942. Inheritance of colours and pod characters in *Phaseolus vulgaris* L. I. *Genetica*, Netherlands, 16: 177-296.
- PRAKKEN, R., 1959. Induced mutation. *Euphytica*, Netherlands, 8: 270-322.

- PRAKKEN, R., 1970. Inheritance of colour in *Phaseolus vulgaris* L. II. A critical review. Netherlands, Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, 70-20: 1-38.
- SAJÓ, Z., 1979. High-protein rice selections following mutagenic treatment. *Fish Culture Res. Sta. Szarvas*, Hungary, p. 202-203.
- SARAFI, A., 1974. Use of ionizing radiations for beeding of bean *Phaseolus vulgaris* L. In: *Agronomy Abstracts*. Madison.
- SARVELLA, P.; R.A. NILAN e C.F. KONZAK, 1962. Relation of embryo structure, node position, tillering and depth of planting to the effects of X-rays in barley. *Radiation Botany*, New York, 2: 89-108.
- SCARASCIA-MUGNOZZA, G.T., 1969. Mutation on sexually propagated plants. *Genetica Agraria*, Roma, 23(1/4): 187-219.
- SHAW, J.K. e J.B. NORTON, 1918. The inheritance of seed-color in garden beans. *Bulletin of Massachusetts Agriculture Experiment Station*, Massachussets, 135: 59-104.
- SMITH, F.L., 1939. A genetic analysis of red seed-coat color in *Phaseolus vulgaris* L. *Hilgardia*, 12: 553-621.
- SMITH, H.H., 1961. The reactor as a tool for research in plant sciences and agriculture. In: *Programming and Utilizantion of Research Reactors*. Londres, Academic Press, p. 425-438.
- SMITH, H.H.; J.L. BATEMAN; H. QUASTLER e H.H. ROSSI, 1964. RBE of mono-energetic fast neutrons: cytogenetic effects in maize. In: *Symposium Upton*, NY, Vienna, International Atomic Energy Agency, p. 233-248.

- STADLER, L.J., 1928 a. Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*, Washington, 68: 186-187.
- STADLER, L.J., 1928 b. Genetic effects of X-rays in maize. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, 14: 69-75.
- STADLER, L.J., 1930. Some genetic effects of X-rays in plants. *Journal of Heredity*, Washington, 21: 3-19.
- STADLER, L.J., 1931. The experimental modification of heredity in crop plants. I. Induced chromosomal irregularities. *Scientific Agriculture*, Ottawa, 11: 557-572.
- STADLER, L.J., 1942. Some observations on gene variability and spontaneous mutation. The Spragg Memorial Lectures on Plant Breeding, Michigan State College.
- STEAGALL, M.L., 1977. Sensitividade à radiação gama de diferentes populações de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 149 p. (Dissertação de Mestrado).
- STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960. *Principles and procedures of statistics*. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York, 481 p.
- STOILOV, M. e A. POPOV, 1978. Inducing disease resistant maize mutations via ionizing radiation. *Mutation Breeding Newsletter*, 12: 4.
- TANAKA, T., 1927. BIZZARRIA - a clear case of periclinal chimera. *Journal of Genetics*, India, 18: 77-85.
- TIMOFEEFF-RESSOVSKY, N.W.; K.G. ZIMMER e M. DELBRUCK, 1935. Über die Waturden Genmutation und der Genstruktur. Wachr. Ges. Wiss. Gottingen. *Math. physik. k 1, Fachgruppen (6)*, 1: 196-245.
- TULMANN NETO, A., 1979. Obtenção de resistência ou tolerância ao vírus do

- mosaico dourado do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) através de indução de mutação. Piracicaba, ESALQ/USP, 109 p. (Tese de Livre-Docência).
- UHLIK, J., 1979. The use of neutron irradiation in the development of new productive varieties of cultivated plants. (Plant Breeding Abstracts, 49(4)).
- VASILEVA, M., 1975. The application of induced mutation in obtaining genetic diversification in peas. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji, Roslin*, 128/129: 117-131.
- VIEIRA, C., 1967. *O feijoeiro comum: culturas, doenças e melhoramento*. Viçosa, Imprensa Universitária da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais. 220 p.
- YAMAGATA, H. e K. SYAKUDO, 1960. Studies on the utility of artificial mutations in plant breeding. I. X-ray sensitivity of rice and induced aberrant plants in the X_2 generation. *Japanese Journal of Breeding*, Japan, 10: 153-162.
- YAMAGUCHI, H., 1962. The chimaeric formation in and X_1 panicle after irradiation of dormant rice seed. *Radiation Botany*, New York, 2: 71-77.
- YAMAGUCHI, H., 1980. Texto mimeografado do curso "Fundamentos de Indução de Mutação no Melhoramento de Plantas". Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura.
- YAMAGUCHI, H. e A.J. MIAH, 1964. Mutation mosaicism induced by X, γ -rays and ethylene imine in rice. *Radioisotopes*, Tokyo, 13(6): 472-476.

YARNELL, S.H., 1965. Cytogenetics of the vegetable crops. IV. Legumes.

Botanical Review, New York, 31: 247-330.

YESODA RAJ, A.; A. SUDHARSAN RAJ e G. MADHUSUDANA RAO, 1972. Mutagenic

studies of gamma rays on *Oryza sativa* L. *Cytologia*, Tokyo, 37: 469-477.

YGLESIAS, G.E., 1964. Estudio sobre el efecto de la densidad de siembra,

hábito de crecimiento, calor y tamaño de frijol en los ensayos de

variedades. Turrialba, Costa Rica, Publ. misc. n° 22 Inst. Interam.

Cienc. Agric. 22: 39-44.

WOO, S.C.; C.M. NG e E.M. TYE, 1971. Induction of mutations in cultivated

rice by chemical and physical agents. II. The effect of M_1 damage and

M_2 mutations. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Taiwan, 12(2):

66-73.