**ESTUDOS DA SENSITIVIDADE DE SEMENTES DE ARROZ
(*Oryza sativa* L.) A RADIAÇÃO GAMA, NEUTRONS, SULFATO
DE DIETILA (DES) E AZIDA SÓDICA (SA)**

ELCIO PERPÉTUO GUIMARÃES

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMBRAPA - CNPAF

Orientador: AKIHIKO ANDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em Genética
e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1978

DEDICO:

ã meus pais GERALDO E TYRZA,

ã minha avô JUDITH,

meus irmãos, minhas irmãs ELOA e ELOISA

e a minha noiva MARIA ALICE.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja manifestar aqui os seus mais profundos e sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente vieram a contribuir para que este trabalho pudesse ser realizado. Em especial às seguintes pessoas e instituições:

- Prof. Dr. AKIHIKO ANDO pela bondade, paciência, estímulo e preciosa orientação no transcorrer das fases deste trabalho;
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade de treinamento a nível de pós-graduação;
- Professores do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela dedicação e esforço para que nos desenvolvessemos cientificamente;
- Funcionários do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela amizade e serviços prestados;
- Funcionários do Setor de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, pela amizade e serviços prestados;
- Prof. Cláudio Visockas Costa pelo auxílio na confecção do "summary";
- Eng^o Agr^o Valdomiro Sigueru Miyada, pela amizade, apoio e estímulo, desde o início do curso de pós-graduação até a apresentação desta;
- Colegas do curso de pós-graduação do ciclo 76/77, que contribuíram sempre para a realização deste trabalho;
- Ao meu pai, companheiro de profissão e Livre Docente pela Universidade Federal do Paraná, meu agradecimento especial pelo amor, compreensão e estímulo dedicado em toda minha formação científica.

BIOGRAFIA DO AUTOR

ELCIO PERPÊTUO GUIMARÃES, de nacionalidade brasileira, nasceu aos 13 de maio de 1954, na cidade paulista de Taubaté, sob a filiação de Geraldo Guimarães e Tyrza Perpétuo Guimarães. Coursou a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", onde obteve a 18 de dezembro de 1975 o grau de Engenheiro Agrônomo.

Aos 10 de março de 1976 foi contratado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), na qualidade de pesquisador, sendo lotado no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz-Feijão (CNPAF), na cidade de Goiânia - Goiás.

ÍNDICE

	<u>página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4. MATERIAL	26
5. MÉTODOS	28
5.1. Tratamentos mutagênicos	28
5.1.1. Mutagênicos físicos	28
5.1.1.1. Irradiação com radiação gama	28
5.1.1.2. Irradiação com neutrons térmicos	29
5.1.1.3. Irradiação com neutrons rápidos	29
5.1.2. Mutagênicos químicos	30
5.1.2.1. Tratamento com DES	30
5.1.2.2. Tratamento com SA	31
5.2. Obtenção dos dados experimentais	32
5.2.1. Sobrevivência de plântulas M_1	33
5.2.2. Altura de plântulas M_1	33
5.2.3. Fertilidade de plantas M_1	34
5.2.4. Frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2 ..	34
5.3. Análise estatística	36
6. RESULTADOS	37
6.1. Experimento preliminar sobre solubilidade do DES	37

	.vii.
	<u>página</u>
6.2. Sobrevivência de plântulas M_1	38
6.3. Altura de plântulas M_1	39
6.4. Fertilidade de plantas M_1	41
6.5. Frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2	42
6.6. LD_{50} e GR_{50}	44
7. DISCUSSÃO	46
7.1. Irradiação com radiação gama	46
7.2. Irradiação com neutrons térmicos e rápidos	48
7.3. Tratamento com mutagênico químico DES	50
7.4. Tratamento com mutagênico químico SA	52
7.5. Comparação dos efeitos biológicos de radiação gama, neu- trons, DES e SA	57
8. CONCLUSÕES	61
9. SUMMARY	63
10. LITERATURA CITADA	65
TABELAS E FIGURAS	73

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1. Porcentagem média de sobrevivência de plântulas, tratadas com álcool etílico 96 ^o . Tomada 14 dias após a semeadura	74
Tabela 2. Porcentagem média de sobrevivência e altura de plântulas M ₁ (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, e fertilidade de plantas M ₁ , nas diferentes dosagens de radiação gama	75
Tabela 3. Porcentagem média de sobrevivência e altura de plântulas M ₁ (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, e fertilidade de plantas M ₁ , nas diferentes concentrações de DES	76
Tabela 4. Porcentagem média de sobrevivência de plântulas M ₁ , tomadas 14 dias após a semeadura, nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA (sem pré-tratamento em água destilada)	77
Tabela 5. Porcentagem média de sobrevivência de plântulas M ₁ , tomadas 14 dias após a semeadura, nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA (Com pré-tratamento em água destilada)	78
Tabela 6. Altura média de plântulas M ₁ (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA (Sem pré-tratamento em água destilada) ..	79
Tabela 7. Altura média de plântulas M ₁ (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, nas diferentes concentrações e pHs do	

mutagênico SA (Com pré-tratamento em água destilada). .	80
Tabela 8. Análise de variância de altura de plântulas M_1 , trata- das com SA, sem pré-tratamento das sementes em água des- tilada.	81
Tabela 9. Análise de variância de altura de plântulas M_1 , trata- das com SA, com pré-tratamento das sementes em água des- tilada.	81
Tabela 10. Fertilidade média das plantas M_1 , nas diferentes concen- trações e pHs do mutagênico, SA. (Sem pré-tratamento em água destilada).	82
Tabela 11. Fertilidade média das plantas M_1 , nas diferentes concen- trações e pHs do mutagênico SA. (Com pré-tratamento em água destilada).	83
Tabela 12. Fertilidade média das plantas M_1 e freqüência de muta- ção de clorofila (baseada no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para neutrons térmicos e rápidos.	84
Tabela 13. Freqüência de mutação de clorofila (baseada no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para a radiação gama e o DES.	85
Tabela 14. Freqüência de mutação de clorofila (baseada no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para o mutagênico SA (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada). .	86

Tabela 15. Frequência de mutação de clorofila (baseado no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para o mutagênico SA (Com pré-tratamento das sementes em água destilada).	87
Tabela 16. Significância dos qui-quadrados entre todas as concentrações de SA, sem e com pré-tratamento em água destilada, tomadas duas a duas. Aplicou-se o "Teste de Independência" aos valores de frequência de mutação de clorofila.	88
Tabela 17. Significância dos qui-quadrados entre todos os pHs das soluções tampão de SA, sem e com pré-tratamento em água destilada, tomados dois a dois. Aplicou-se o "Teste de Independência" aos valores de frequência de mutação de clorofila.	89
Tabela 18. Porcentagem média das classes de mutações para todos os agentes mutagênicos empregados. (Todas as dosagens e concentrações foram englobadas para cada mutagênico). .	90
Tabela 19. Valores de LD_{50} e GR_{50} , estimados a partir das dosagens e concentrações usadas, de radiação gama, DES e SA. ...	90

LISTA DE FIGURAS

	<u>página</u>
Figura 1. Curvas de sobrevivência de plântulas tratadas com álcool etílico 96 ^o	91
Figura 2. Curvas de sobrevivência e altura de plântulas M ₁ , e fertilidade de plantas M ₁ , tratadas com radiação gama. ...	92
Figura 3. Curvas de sobrevivência e altura de plântulas M ₁ , e fertilidade de plantas M ₁ , tratadas com mutagênicos químicos DES.	93
Figura 4. Curvas de sobrevivência de plântulas M ₁ , tratadas com o mutagênico químico SA, a diferentes pHs da solução tampão. (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada)	94
Figura 5. Curvas de sobrevivência de plântulas M ₁ , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Com pré-tratamento das sementes por oito horas em água destilada). .	95
Figura 6. Curvas de altura de plântulas M ₁ , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada).	96
Figura 7. Curvas de altura de plântulas M ₁ , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Com pré-tratamento das sementes por oito horas em água destilada).	97
Figura 8. Curvas de fertilidade de plantas M ₁ , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada).	98

Figura 9. Curvas de fertilidade de plantas M_1 , tratadas com SA, a
diferentes pHs da solução tampão (Com pré-tratamento das
sementes por oito horas de água destilada).

1. RESUMO

O emprego de agentes mutagênicos físicos e químicos, para induzir mutações em plantas, é um método de melhoramento de grande utilidade.

Sementes de arroz de sequeiro, da variedade "Dourado Precoce", foram submetidas a tratamentos mutagênicos com radiação gama, neutrons térmicos e rápidos, sulfato de dietila (DES) e azida sódica (SA).

Nesses tratamentos procurou-se estudar os efeitos biológicos causados na geração M_1 , como por exemplo, o efeito na sobrevivência, altura de plântulas, fertilidade de plantas e mutação de clorofila.

Os dados obtidos foram analisados pelo "Teste de Independência", sendo que, para a altura de plântulas tratadas com SA, foi possível a composição de um quadro de análise de variância. No entanto, para a frequência de mutação de clorofila, usou-se de dois métodos de cálculo: (1) número de mutações por 100 panículas M_1 e (2) número de mutantes por 100 plân-
tulas M_2 .

A radiação gama não mostrou, para a sobrevivência de plântulas M_1 , queda com o aumento das dosagens usadas, mas para o DES, o aumento nas concentrações provocou queda na sobrevivência, o mesmo ocorrendo com a SA. Todavia, para a SA pode-se também constatar tal efeito com o aumento da acidez e a presença de pré-tratamento das sementes em água destilada.

A altura de plântulas M_1 decresceu quando a dosagem de radiação gama, concentrações de DES, concentrações e acidez de SA cresceram. O mesmo ocorreu com a fertilidade de plantas M_1 , que também foi medida para os neutrons e apresentou comportamento similar.

A fertilidade de plantas mostrou-se como a característica mais sensível aos tratamentos mutagênicos, sofrendo reduções drásticas com altas dosagens de radiação gama e neutrons, altas concentrações e acidez de SA.

Com a frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2 , pode-se notar que as respostas variaram de acordo com o agente mutagênico empregado, e também com as condições testadas para cada um deles. O método de cálculo também fez variar essa frequência.

A máxima frequência de mutação de clorofila encontrada coube a SA, que baseada no número de mutações por 100 panículas M_1 induziu 40,74 mutações a concentração de 5×10^{-2} M e pH = 4,0 sem pré-tratamento em água destilada. Para o método dos mutantes por 100 plântulas M_2 , o maior resultado encontrado foi de 10,67 mutantes a 1×10^{-2} M e pH = 4,0, para sementes pré-tratadas em água destilada por oito horas.

O pré-tratamento em água destilada, das sementes tratadas com SA, foi o responsável pelos maiores danos fisiológicos, todavia, implicou nas maiores frequências de mutação.

Com esses parâmetros analisados, pôde-se aquilatar a sensitividade do material aos diferentes mutagênicos empregados, bem como compará-los dentro das condições do experimento.

Desse modo, para a frequência de mutação de clorofila, nas dosagens usadas, ou neutrons térmicos mostraram-se superiores a radiação gama. Com os neutrons rápidos, essa informação não foi possível obter devido a escassez de dados. Contudo, com a SA esse problema não ocorreu e pôde-se claramente perceber seu melhor comportamento diante dos demais mutagênicos usados.

O DES provocou os menores danos fisiológicos, mas não induziu mutações nessas condições usadas, requerendo assim um estudo mais detalhado, para que se possa obter informações mais precisas.

2. INTRODUÇÃO

De Vries, em 1904, denominou de mutações, as mudanças hereditárias que ocorriam nos seres vivos. Verificou que essas alterações apareciam de modo espontâneo em *Oenothera lamarckiana* e eram transmitidas às gerações seguintes.

Entretanto, tais alterações podem também serem induzidas por agentes mutagênicos. MULLER (1927) induziu mutações usando dos raios-X e AUERBACH e ROBSON (1942) conseguiram o mesmo com o gás mostarda, ambos em *Drosophila melanogaster*. Com essas descobertas, um novo campo foi aberto e as mutações passaram a ser obtidas por meio de aplicação de produtos físicos e químicos.

O uso de agentes mutagênicos físicos e químicos em plantas superiores, passou a ter um grande interesse, uma vez que com o uso destes é possível obter-se um sensível aumento na frequência de mutação. Tal aumento, implica em maiores chances de se encontrar mutações de interesse para o melhoramento.

O desenvolvimento desse novo campo foi acelerado, e uma grande quantidade de novos mutagênicos foi e tem sido testados em inúmeras plantas cultivadas. Esse desenvolvimento atingiu o ponto de serem as mutações induzidas consideradas um método de melhoramento, e que é hoje o responsável pela obtenção de diversas variedades melhoradas.

Os mutagênicos mais usados nos estudos de indução de mutação são: os raios-X, as radiações gama, os neutrons, os agentes alquilantes como metano sulfonato de etila (EMS), sulfato de dietila (DES), etilenoimina (EI) e outros.

As plantas autógamas apresentam-se como aquelas mais analisadas nesse campo, sendo que, tais análises referem-se principalmente a danos fisiológicos na germinação, sobrevivência e altura de plântulas, e a alterações genéticas. Com os resultados obtidos de tais análises, pode-se aquilatar a sensibilidade do material e também as condições mais favoráveis para que haja o mínimo de danos fisiológicos e a máxima frequência de mutação.

Foram usados no presente trabalho, agentes mutagênicos físicos (radiação gama, neutrons térmicos e rápidos) e químicos (sulfato de dietila - DES e a azida sódica - SA), visando estudar os efeitos de cada um deles na sobrevivência e altura de plântulas M_1 , fertilidade de plantas M_1 e na frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2 . Além disso, procurou-se também comparar os mutagênicos físicos e químicos, embora todos eles tenham suas condições específicas como dosagens, concentrações e pHs.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O estudo das mutações induzidas passou a ser mais intensificado após os resultados de *MULLER (1927)*, que desenvolveu um método de análise para estudar os efeitos das irradiações com raios-X em *Drosophila melanogaster*. Demonstrou com isso, ser possível a produção de alterações genéticas, elevando assim a frequência de mutação de modo marcante em relação a espontânea.

Trabalhos com plantas superiores vieram logo a seguir e apresentavam resultados positivos no uso de raios-X. *GAGER e BLAKESLEE (1927)* trabalharam com *Datura stramonium* e observaram que as irradiações provocavam aberrações cromossômicas e mutações do tipo gênica.

Os primeiros resultados de cereais irradiados, foram oriundos das pesquisas de *STADLER (1928a, b)*, obtendo-os em milho e cevada, os quais foram semelhantes aos de *MULLER (1927)*.

Dentre os cereais estudados, os primeiros resultados em sementes de arroz, são de *ICHIJIMA (1934)*, que aplicou sobre elas raios-X e

induziu o aparecimento de trissômicos, tetrassômicos e triplóides.

As pesquisas com indução de mutação em sementes de arroz usando de raios-X continuaram nos anos seguintes, e *IMAI (1935)¹*, *KANNA (1935)¹*, *RAMIAH e PARTHASARATHY (1938)¹* e *KAGAWA (1940)¹*, obtiveram em seus estudos mutantes do tipo deficientes em clorofila.

Em 1942, foi relatado o primeiro agente químico capaz de produzir mutações nos organismos. Esse produto, o gás mostarda, foi usado por *AUERBACH e ROBSON²* em moscas *Drosophila melanogaster*, e causou efeito semelhante ao dos raios-X, induzindo mutações letais.

Com essa descoberta o campo de mutagênicos químicos abriu-se e as pesquisas, visando o uso dos mesmos nos estudos genéticos, foram sendo aceleradas. Essa ocorrência deve-se ao atrativo potencial desses mutagênicos, aliado ao custo comparativo mais baixo e a relativa facilidade do uso. Diante dessas perspectivas, uma grande quantidade de produtos químicos têm sido testados, apresentando bons resultados para a finalidade em questão (*KONZAK et alii, 1964*).

Os mutagênicos físicos e químicos apresentam, segundo *GAUL (1970)*, os seguintes tipos de efeitos que são de interesse ao geneticista e ao melhorista de plantas: (1) dano fisiológico; (2) mutação gênica e (3) mutação cromossômica. Dos efeitos citados, as mutações gênicas e cromossômicas podem ser transferidas da geração M_1 às seguintes; no entanto, o dano fisiológico é restrito à geração M_1 .

1 - citado por *CHANDRARATINA (1964)*.

2 - citado por *AUERBACH (1949)*.

Os danos fisiológicos são de natureza diferente das mutações, e representam injúrias que podem ser determinadas citologicamente, sendo que as de maior interesse prático são: o atraso no crescimento e a morte do indivíduo irradiado (*SPARROW, 1961*). No entanto, para o melhoramento de plantas o interesse é voltado a tratamentos mutagênicos de baixo efeito fisiológico e alto efeito genético (*GAUL, 1970*).

OLIVER (1930) estudou as mutações letais produzidas em *Drosophila melanogaster* irradiada com raios-X, e concluiu que a frequência de mutação aumentava proporcionalmente às dosagens de radiação aplicadas. *LEA (1956)* confirmou esse resultado e complementou-o com novas informações como: (1) o efeito de determinada dosagem de radiação não depende da intensidade de dose e (2) para uma determinada dosagem, a irradiação de modo intermitente e ininterrupta não afeta a frequência de mutação.

Há, no entanto, trabalhos de resultados contrários aos obtidos por *OLIVER (1930)* e *LEA (1956)*, como os de *MATSUO et alii (1958)*, e *RUSSEL et alii (1958)* e *MATSUMURA (1964)*.

Por exemplo, em *MATSUO et alii (1958)* tem-se que a baixas dosagens, a frequência de mutações de clorofila que se obteve aumentava proporcionalmente às dosagens, mas quando essas eram altas, (40 KR) a frequência diminuía. *GAUL (1960)* cita mais tarde que essa queda ocorrida à dosagens elevadas, pode ser explicada pelo aumento das aberrações cromossômicas ou pela morte e eliminação das células iniciais mutadas.

RUSSEL et alii (1958) mostraram que nas células metabolicamente ativas de camundongos, havia uma dependência da intensidade de dose

para o efeito da radiação, e também que o modo de aplicação dos raios-X influía nos resultados. Com sementes de arroz e trigo, *MATSUMURA (1964)* estudou os efeitos dos raios-X e, observando as mutações de clorofila, notou uma dependência da intensidade de dose, pois, com irradiações agudas, de um modo geral, a frequência de mutação era maior que com as irradiações crônicas.

Os primeiros pesquisadores que fizeram estudos sobre os efeitos do aumento das dosagens de radiação ionizante, aplicadas em sementes dormentes de plantas, foram *GENTER e BROWN (1941)*. Eles irradiaram sementes de feijão com dosagens variáveis de raios-X, e notaram que a emergência de plântulas e a sobrevivência de plantas decresciam com o aumento das dosagens. Os mesmos resultados foram encontrados por *GAUL (1960)*, com sementes de cevada; *YAMAGUCHI (1962)*, *MIKAELSEN et alii (1968)* em arroz, e por diversos autores em diversas culturas.

BIRDIE YEH e HENDERSON (1963), irradiando sementes de arroz com radiação gama, obtiveram resposta gradual e linear para redução na sobrevivência de plantas com o aumento da dosagem usada, e que essa resposta foi praticamente constante, cabendo a cada aumento de 10 Krads uma queda em 10% de sobrevivência.

Usando-se das radiações, outros fatores são também analisados e estudados. Como por exemplo pode ser citado a taxa de crescimento ou altura de plântulas, aberrações cromossômicas, fertilidade ou esterilidade, frequência de mutação, espectro de mutação, etc.

A altura de plântulas é um dos primeiros parâmetros analisa-

dos nos trabalhos de mutação induzida. Com radiação gama, pode-se observar que, com o aumento das dosagens, há uma redução gradual e linear na altura de plântulas M_1 (*BIRDIE YEH e HENDERSON, 1963, ANDO, 1970 e EL-KEREDY e ABD-ALLA, 1976*). No entanto, o crescimento cessa com dosagens elevadas, e isso é devido à destruição das auxinas ou de seus precursores (*YESODA RAJ et alii, 1972, EL-AISHY et alii, 1976 e EL-KEREDY e ABD-ALLA, 1976*) ou também pela inativação das células meristemáticas (*EL-KEREDY e ABD-ALLA, 1976*).

Para fertilidade de plantas M_1 , há um comportamento similar ao da altura de plântulas M_1 , isto é, aumentando-se as dosagens de radiação obtém-se como resposta um decréscimo da fertilidade (*BIRDIE YEH e HENDERSON, 1963, MIKAELSEN et alii, 1968, MIAH e AWAN, 1971 e EL-KEREDY e ABD-ALLA, 1976*). Contudo, a relação entre o efeito e as dosagens usadas mostrou-se não linear (*YAMAGUCHI, 1962*) sendo variável de acordo com a variedade estudada (*EL-KEREDY e ABD-ALLA, 1976*).

Estudos da fertilidade, levaram à conclusão de que ela se apresenta com diferentes gradações, as quais variam de acordo com as dosagens aplicadas (*WOO et alii, 1971b*). Esses autores, usando radiação gama, encontraram, em dosagens relativamente baixas (20 a 25 Krads), uma predominância de plantas M_1 semi-férteis (53,46 a 40,91%). Com a dosagem de 30 Krads, ocorreram mais semi-estéreis (42,78%) e para 40 e 50 Krads a maioria foi altamente estéril (53,75 e 66,67%).

Quanto às aberrações cromossômicas, o aumento nas dosagens de radiação resultou em uma maior porcentagem de aberrações (*YESODA RAJ et alii, 1972*). Os mesmos autores concluíram que há algum ou alguns fatores

diferentes das aberrações como responsáveis pela esterilidade apresentada.

Quando são aplicados agentes mutagênicos físicos ou químicos em sementes, é de grande interesse uma comparação de freqüências de mutação induzida por mutagênicos. No entanto, há especial interesse em determinar-se a freqüência de mutação cromossômica e de ponto (GAUL, 1960). O autor procurou estudar os problemas da mutação de ponto em sementes de cevada, irradiando-as com raios-X; entretanto, suas conclusões apresentam analogia para as demais culturas.

Para a realização desse estudo, GAUL (1960) teve considerações sobre quatro métodos de determinação da freqüência de mutação após o tratamento das sementes com radiação. Os métodos são: (1) número de mutações por 100 setores de inflorescência M_1 , (2) número de mutações por 100 panículas M_1 , (3) número de mutações por 100 plantas M_1 e (4) número de mutantes por 100 plantas M_2 . Como possíveis fontes de variação a esses métodos citados, temos: (a) seleção diplôntica de células mutadas, (b) pequeno tamanho de setores mutados, (c) variação no tamanho de setores de panículas mutadas e (d) ordem de formação dos perfilhos. Dos métodos acima citados, o autor considera o último como o mais adequado a esse tipo de estudo.

Baseado em tais observações, o mesmo autor sugeriu ser bastante interessante uma comparação entre os métodos citados, quando em um experimento são usadas radiações que agem de modo não similar.

HEINER *et alii* (1960) aplicaram radiação gama em sementes de cevada e analisaram a freqüência de mutação de clorofila, de acordo com três métodos citados por GAUL. Para a porcentagem de mutantes M_2 , a rela-

ção encontrada entre a frequência de mutação e as dosagens, mostrou-se próximo a linearidade, ao passo que para mutação por panículas e por plantas M_1 mostrou-se não linear com doses acima de 60 Krads. No entanto, as maiores diferenças determinadas pelos métodos comparados, foram observadas quando as dosagens eram altas.

WOO *et alii* (1971b) encontraram em seus estudos um alto coeficiente de correlação, $r = 0,94$ entre as taxas de mutação, calculadas com base em plantas M_1 e em mutantes M_2 . As altas dosagens foram as responsáveis pelas maiores taxas de mutação, muito embora fossem essas dosagens as que propiciaram os mais altos valores de esterilidade.

YAMAGATA (1966) achou que o aumento de 1% na esterilidade de sementes de arroz irradiadas com raios-X, proporcionava um aumento de 0,02% na frequência de mutação em plantas M_2 .

Uma queda da frequência de mutação de clorofila, em tratamentos envolvendo dosagens muito altas do mutagênico (aquelas que induzem acima de 90% de letalidade na gerção M_1), poderia ser devido a morte de plântulas mutadas e sua conseqüente eliminação numa determinada população como também pela seleção de setores mutados dentro da mesma plântula chamada de seleção diplôntica (BEKENDAM, 1961, GAUL, 1961 e YAMAGUCHI, 1962).

Em sementes de cevada, GAUL (1958) mostrou que a taxa de mutação de clorofila em plântulas M_2 é independente do grau de esterilidade de panículas M_1 , resultado esse também encontrado por BEKENDAM (1961), para sementes de arroz. No entanto, não somente a frequência de mutação de clorofila é independente do grau de esterilidade de panículas M_1 , mas também o

espectro de mutação (GAUL, 1958).

Relacionado ao espectro de mutação de clorofila, os estudos de HEINER *et alii* (1960) apresentam uma divisão das mutações em classes, de acordo com a coloração apresentada pelo limbo foliar. As classes são divididas em: (1) *albina*, ausente de pigmentos amarelos ou verdes; (2) *viridis*, pigmentos verde-amarelados distribuídos uniformemente ou em gradação; (3) *xantha*, pigmentos amarelos distribuídos uniformemente; (4) *tigrina*, destruição transversal de pigmentos amarelos ou verdes e (5) *striata*, listas longitudinais amarelas ou brancas.

No mesmo trabalho, os autores mostram resultados do tratamento de sementes de cevada com radiação gama, obtendo em plântulas M_2 , 48,6% de *albinos* e 37,7% de *viridis*, restando 13,7% as três classes restantes, e que estão distribuídas de modo aproximadamente igual.

WOO *et alii* (1971b) em seus resultados com sementes de arroz tratadas com radiação gama, encontraram no tipo *albino* a maior porcentagem dentre as classes de mutação de clorofila apresentadas.

Das radiações ionizantes empregadas pelos geneticistas para induzirem mutações em plantas, a radiação X foi a primeira. No entanto, com a introdução dos reatores nucleares, passou-se a utilização dos neutrons.

Os neutrons, segundo apresentado por BRIGGS (1970), são divididos em rápidos e térmicos, com base em seus espectros de energia, e são essencialmente de fissão, variando energeticamente entre 0,5 e 2,0 MeV para neutrons rápidos. Pela reação com moderadores, como o carbono e o hidrogê-

nio, os neutrons rápidos são reduzidos em sua energia a cerca de 0,025 eV, e em tal estado recebem a denominação de neutrons térmicos.

Os neutrons térmicos e rápidos, foram relatados como sendo mais eficientes para induzirem vários efeitos biológicos, incluindo genético e citológicos, quando comparados aos efeitos produzidos pelas radiações esparsamente ionizantes, como os raios-X ou a radiação gama. Contudo, não foram detectadas diferenças nos efeitos biológicos entre os dois tipos de neutrons (CALDECOTT, 1955).

Em 1943, GILES observou que a frequência de todos os tipos de aberrações cromossômicas, de uma ou duas quebras, aumentava linearmente com as dosagens, quando irradiava grãos de pólen de *Tradescantia* com várias dosagens de neutrons rápidos. Conclui ser o comportamento dos raios-X contrário àquele apresentado pelos neutrons, pois todas as aberrações produzidas por neutrons rápidos eram resultantes de um único toque.

Estudos de sobrevivência de plântulas M_1 , mostraram que os neutrons têm seu comportamento semelhante à radiação gama, ocorrendo uma detectável redução na sobrevivência à medida que a dosagem de neutrons é aumentada (BIRDIE YEH e HENDERSON, 1963 e MIKAELSEN *et alii*, 1968). No entanto, para os neutrons essa redução ocorre de modo não linear (YAMAGUCHI, 1962 e BIRDIE YEH e HENDERSON, 1963) e com a radiação gama há uma linearidade válida à dosagens menores que 50 Krads (BIRDIE YEH e HENDERSON, 1963).

CHAO e CHAI (1961) mostraram em sementes de arroz, que a sobrevivência de plântulas M_1 tratadas com neutrons térmicos, apresentou-se

melhor que o controle não tratado, sendo esse resultado similar ao encontrado por CALDECOTT (1952) em cevada. Entretanto, BIRDIE YEH e HENDERSON (1963) afirmam que os resultados encontrados com radiação gama e neutrons em arroz, diferem grandemente daqueles relatados em cevada.

BIRDIE YEH e HENDERSON (1963) em seu trabalho, citam com base nos resultados obtidos que, comparando os tratamentos com neutrons e radiação gama em sementes de arroz, o primeiro apresenta-se relativamente com mais alto efeito letal em plantas do que o efeito em altura de plântulas.

Sementes de arroz irradiadas com raios-X e neutrons térmicos, reduziram a altura de plântula M_1 a um grau considerável. Porém, o coeficiente de variabilidade indicou que as sementes irradiadas com neutrons térmicos foram uniformemente afetadas (CHAO e CHAI, 1961).

Baseado em resultados de altura e sobrevivência de plântulas, obtidos das sementes de cevada irradiadas com neutrons térmicos e raios-X, CALDECOTT (1952) concluiu que, para igual número de aberrações cromossômicas, a irradiação com neutrons térmicos causou menos danos às plântulas que os raios-X. Uma considerável quantidade desses danos induzidos pelos raios-X, são atribuídos a ionizações nos elementos extra-cromossômico das células. Não deseja-se com isso dizer que os neutrons térmicos não tenham efeitos semelhantes, mas sim que, em comparação com os raios-X, mais eventos ocorrem nos cromossomos que fora deles, quando usa-se de irradiações com neutrons.

O equivalente biológico de neutrons térmicos para raios-X, baseado na produção de aberrações cromossômicas, foi calculada por CALDECOTT

et alii (1954), e o resultado obtido foi de que 1 R de raios-X equivale a $3,0 \times 10^8$ Nth/cm² de neutrons térmicos, sendo o mesmo valor válido para produção de mutações.

Para as trocas cromossômicas, o autor encontrou aproximadamente $1,4 \times 10^9$ Nth/cm² de neutrons térmicos, equivalendo a 1 R de raios-X. Esse resultado é próximo ao calculado por *MATSUO et alii* (1958), o qual foi feito com bases na dosagens necessária para induzir em arroz, uma frequência igual a 5% de mutações clorofila-deficientes.

A frequência de mutação de clorofila em sementes de cevada, baseada em equivalente valor de sobrevivência de plântulas M₁, foi calculada por *CALDECOTT et alii* (1954) que obtiveram um maior resultado quando da aplicação dos neutrons térmicos que dos raios-X.

MIKAELSEN et alii (1968) basearam-se em dois métodos para o cálculo da frequência de mutação de clorofila em sementes de arroz. Os métodos usados foram: número de mutações por 100 panículas M₁ e o número de mutantes M₂ por 100 plântulas M₂. O resultado encontrado em ambos os métodos, apresentou duas a três vezes mais mutações de clorofila para a irradiação com os neutrons rápidos que para a radiação gama.

BEARD et alii (1958) calcularam o coeficiente de correlação entre a dosagem de radiação de neutrons térmicos, e alguns caracteres de interesse no estudo das mutações induzidas de cevada e milho. Os resultados obtidos são apresentados na tabela seguinte:

Tabela . Coeficientes de correlação entre dosagem de neutrons térmicos e alguns caracteres de interesse, calculados aos 11 e 32 dias após a germinação e no florescimento.

Correlação entre	Coeficientes de Correlação					
	11 dias		32 dias		florescimento	
	cevada	milho	cevada	milho	cevada	milho
dose-altura						
de plantas	-0,984	-0,995	-0,997	-0,995	-:-	-:-
dose-sobrevivên-						
cia de plântulas	-0,730	-0,526	-0,891	-0,895	-:-	-:-
dose-pólen normal	-:-	-:-	-:-	-:-	-0,960	-0,991

Desse estudo, concluiu que há uma correlação negativa entre a sensibilidade de sementes de cevada e milho e a irradiação com neutrons térmicos. Em sementes de arroz, *SORIANO (1971)* constatou que há também uma associação negativa entre a sensibilidade a irradiação com neutrons rápidos e a altura de plântulas M_1 .

Além dos mutagênicos físicos, outra importante fonte de indução de mutação em plantas cultivadas, são os mutagênicos químicos.

O número de mutagênicos químicos atualmente é bastante grande, e está continuamente crescendo. No entanto, *HELSLOT (1970)* diz que pa-

ra propósitos práticos de indução de mutação, apenas alguns desses são usados, cabendo a classe dos agentes alquilantes a maioria deles.

Para o tratamento de qualquer material com mutagênico químico, deve-se de ante-mão determinar as condições nas quais será ele realizado, sendo que a maior ou menor eficiência do mutagênico em induzir mutações vai depender de vários fatores, os quais afetam a ação desses dentro do sistema biológico (*KONZAK et alii, 1964*). Alguns desses fatores são: concentração (*KONZAK et alii, 1964, SATO, 1966 e MIKAELSEN et alii, 1968*), temperatura (*KONZAK et alii, 1964, NILAN et alii, 1964 e SATO, 1966*), pH da solução mutagênica (*WOO et alii, 1971a, b e KLEINHOF et alii 1974*), tempo de tratamento (*SANDER e MUEHLBAUER, 1977*) pré-tratamento (*FROESE-GERTZEN et alii, 1964*), conteúdo de água nas sementes (*SATO, 1966*), estágio metabólico das sementes (*NILAN et alii, 1973*), etc.

O mutagênico químico DES, que é um agente alquilante (*HESLOT, 1970*), tem sido considerado como um dos mais eficientes mutagênicos químicos, induzindo mutações com alta frequência e reduzindo ao mínimo as aberrações cromossômicas em cevada (*KONZAK et alii, 1961 e NILAN et alii, 1964*).

Quando faz-se uso de DES nos tratamentos de sementes, visando a obtenção de frequências elevadas de mutações, é necessário que cuidados especiais sejam legados a esse mutagênico. O DES é um produto pouco solúvel, e além disso, sua solução apresenta-se muito instável, visto que sua meia vida pode ser bastante curta. Uma comparação com a do metano sulfonato de etila (EMS) é feita por *KAMRA e BRUNNER (1970)*, sendo que esse é um dos mais poderosos mutagênicos químicos da atualidade (*KONZAK et alii, 1964*).

Na tabela seguinte, pode-se visualizar as meias vidas do DES e do EMS a diferentes temperaturas, e desse modo compará-las.

Tabela . Meia vida de hidrólise dos produtos DES e EMS a diferentes temperaturas, segundo os autores *KAMRA e BRUNNER (1970)*.

Temperatura (°C)	Meia vida de hidrólise ^{a/} (h)	
	DES	EMS
40	0,32	7,42
30	1,00	25,90
20	3,34	93,10
10	13,10	378,00
5	27,60	796,00
0	59,20	1716,00

^{a/} Tempo após o qual metade da atividade mutagênica da concentração inicial reagiu com a água para formar ácido e álcool.

De um modo geral, danos na geração M_1 , expressos como redução na altura de plântulas, aumentam com o aumento da concentração, temperatura e tempo de tratamento e com o decréscimo do conteúdo de água nas sementes (*SATO, 1966*).

O pH da solução mutagênica, como influente nos resultados obtidos de tratamentos de sementes, foi estudado por *WOO et alii, (1971a, b)*, que trataram sementes de arroz com DES a níveis de pH variando de 3,0 a 11,0, e em plantas M_2 obtiveram que: a pH = 3,0 a frequência de mutação foi

elevada (12,95%) em contraste com aquela obtida a pH = 11,0 (3,9%). No entanto, a altura de plântulas apresentou danos mais drásticos a soluções tamponadas a pH = 3,0 e 7,0. Com o pH = 11,0 mostraram-se estimuladas para o crescimento.

A explicação encontrada por *WOO et alii* (1971a, b) é a seguinte: com pHs alto, haverá provavelmente menor dano nos genes localizados nas organelas citoplasmáticas, isto é, quando a solução é tamponada a níveis de pHs altos, os danos são menores que a pHs baixos, havendo desse modo uma maior quantidade de plantas M_1 com mutações e que foram capazes de sobreviver.

A temperatura de tratamento com DES influi não só na taxa de hidrólise, mas também na eficiência mutagênica. Segundo *KONZAK et alii* (1964) e *SATO* (1966), quando os tratamentos são realizados a baixas temperaturas (0, 5 e 10 °C), a eficiência mutagênica é maior e relativamente menos injúrias são causadas em plântulas M_1 . Esse resultado é concordante com *NILAN et alii* (1964), que fizeram uso de sementes de cevada.

KONZAK et alii (1964) e *SATO* (1966) relataram que uma taxa diferencial de hidrólise e difusão do produto químico dentro do sistema biológico, resultou em um maior número de mutações nos primórdios das panículas no embrião, justificando assim a variação na eficiência mutagênica encontrada a temperaturas diversas.

A alta concentração do mutagênico DES, tende a causar relativamente grande quantidade de danos *HEINER* (1963). Por outro lado, baixas concentrações do mesmo, aplicadas por um longo período de tempo, produzem

baixa injúria em plântulas M_1 , alta porcentagem de plântulas sobreviventes M_1 e elevada frequência de mutação de clorofila em M_2 (KONZAK *et alii*, 1964).

Pré-tratamento de sementes de cevada em água, segundo FROE-SE-GERTZEN *et alii* (1964), afeta profundamente a quantidade de danos fisiológicos causados pelo mutagênico.

Segundo NILAN *et alii* (1973), a azida sódica (SA) é um inibidor respiratório sendo usado para estudos de danos induzidos pelas radiações nos cromossomos e no DNA de sementes de cevada. Porém, tem sido relevado que esta droga é um potente e eficiente mutagênico químico.

BLIXT (1972)³ postulou que, os efeitos de aberrações foliares seriam um indicativo da existência de aberrações cromossômicas, sendo que os tratamentos com SA não produzem tais danos (SANDER e MUEHLBAUER, 1977) e deste modo, a alta eficiência em induzir mutações parece referir-se às mutações gênicas (KLEINHOFs *et alii*, 1974) ou intra gênicas (SANDER e MUEHLBAUER, 1977).

Os tratamentos com soluções do mutagênico SA são influenciados por fatores como: pH (NILAN *et alii*, 1973 e SANDER e MUEHLBAUER, 1977), tempo de tratamento (SANDER e MUEHLBAUER, 1977), pré-tratamento com O_2 ou N_2 (NILAN *et alii*, 1973 e KLEINHOFs *et alii*, 1974), concentração (NIKNJED, 1976 e SANDER e MUEHLBAUER, 1977), estágio metabólico das sementes (NILAN *et alii*, 1973), etc.

3 - citado por SANDER E MUEHLBAUER (1977)

O pH da solução mutagênica SA, influencia de modo direto o efeito de indução de mutação. Em panículas M_1 de cevada, a frequência de mutação foi grande a pH ácido (pH = 3,0) e não provocou efeito constatável a pH básico (pH = 11,0) (NILAN *et alii*, 1973 e KLEINHOFS *et alii*, 1974). O mesmo resultado foi apresentado para a redução na altura de plântulas M_1 (KLEINHOFS *et alii*, 1974).

Essa grande efetividade em formas ácidas, é provavelmente devido a melhor penetração na membrana celular das moléculas neutras NH_3 (NILAN *et alii*, 1973), uma vez que a azida hidrolizada (NH_3) é a forma predominante em soluções de pHs ácidos (KLEINHOFS *et alii*, 1974).

Sementes de cevada pré-embebidas em O_2 ou N_2 saturados em água, tem como consequência um significativo aumento na indução de mutantes deficientes em clorofila (NILAN *et alii*, 1973 e KLEINHOFS *et alii*, 1974).

NIKNEJED (1976) e PEARSON *et alii*, (1975), obtiveram em sementes de cevada tratadas com SA, um decréscimo na germinação e altura de plântulas M_1 , a medida em que a concentração do mutagênico era elevada.

SANDER e MUEHLBAUER (1977) acharam em *Pisum*, que não só o aumento na concentração, mas também no tempo de tratamento provocava uma redução na porcentagem de germinação de plântulas M_1 . No entanto, parece existir um maior efeito do tempo de tratamento que da concentração usada, justificado pela penetração do mutagênico nas células, que apresenta para o fator tempo uma resposta maior.

PEARSON *et alii* (1975) obtiveram com o aumento da concentra-

ção do mutagênico SA, um atraso na atividade mitótica, síntese de ATP e DNA, e, conseqüentemente, uma redução no crescimento de plântulas M_1 .

O estágio metabólico em que se encontram as sementes a serem tratadas, influi na mutagenicidade da SA, sendo ela um potente mutagênico químico (*NILA et alii*, 1973), quando as células em divisão estão no estágio "S" ou de síntese (*SANDER e NILAN*, 1974b).

O pré-tratamento das sementes com água destilada, é um outro fator que provoca alterações na freqüência de mutação (*SANDER e NILAN*, 1974 a, b). Os autores, trabalhando com sementes de cevada, acharam para 15 horas de pré-tratamento com água e 2 horas de tratamento com SA, uma freqüência de mutação de clorofila igual a 85%, e com 8 horas de pré-tratamento e 2 horas de tratamento, sob as mesmas condições anteriores, o resultado foi de 81%.

Estudos de mutagênicos químicos em sementes de cevada durante a última década, mostraram que alguns desses produtos induzem mutação com freqüência duas a três vezes maiores que as mais altas freqüências encontradas nos tratamentos com radiação (*EHRENBERG et alii*, 1958, *HEINER et alii*, 1960 e *EHRENBERG et alii*, 1961).

Fazendo-se comparações quanto a eficiência de agentes mutagênicos físicos e químicos, baseada na freqüência de mutação de clorofila, na geração M_2 de sementes de cevada, observaram uma taxa máxima de mutação da seguinte ordem: radiação gama 17% (*KONZAK et alii*, 1961); raios-X 15% (*CALDECOTT*, 1955 e *EHRENBERG et alii*, 1961); etilenoimina (EI) 28% (*EHRENBERG et*

alii, 1961); DES 43% (HEINER, 1963); EMS 48 - 57% (EHRENBURG *et alii*, 1961) e SA 52,9 - 85% (NILAN e SANDER, 1974a, b).

Analisando o número de mutações de clorofila por panículas M_1 , SATO (1966) comparou a eficiência mutagênica de diversos mutagênicos, tomando como base a mesma altura de plântulas M_1 . O resultado obtido classificou os mutagênicos na seguinte ordem de eficiência: EI $\approx$ EMS $\gg$ DES $>$ raios-X $>$ EO. No entanto, WOO *et alii* (1975b) citam que geralmente a frequência de mutação induzida por DES é mais baixa que aquela apresentada pelos raios-X, contrariando assim os resultados de SATO (1966).

Quando SATO (1966) analisou a fertilidade de panículas M_1 , baseando-se na mesma redução no crescimento de plântulas M_1 , obteve um resultado diferente do anterior. A classificação agora encontrada, colocou os mutagênicos na seguinte ordem: EO $>$ DES $>$ EI $>$ raios-X $>$ EMS.

Segundo HEINER *et alii* (1960), a sobrevivência de plântulas M_1 foi reduzida nos tratamentos com DES e irradiação. No entanto, uma diferença na sobrevivência para os dois agentes foi observada quando tomou-se para base de comparação, os mesmos danos na altura de plântulas M_1 . O resultado encontrado mostrou valores mais elevados de danos a sobrevivência para o tratamento com DES.

Os resultados obtidos com o uso do método da indução de mutação, indicam que esse pode ser usado eficientemente na obtenção de plantas mutadas e melhoradas, e que irá tornar-se, com o aumento do uso, um método ainda mais eficiente (WOO *et alii*, 1971a).

O maior interesse na aplicação do método da indução de mutação por radiação, está em descobrir-se a combinação das doses de radiação e o estado metabólico do material a ser tratado, que irá fornecer a maior frequência de mutação com os menores danos à progênie (EL-KEREDY e ABD-ALLA, 1976). Para os produtos químicos, o interesse está voltado a escolha das condições mais adequadas de concentração, pH, tempo, temperatura, etc., que irão produzir elevadas frequências de mutação, e com danos mínimos à progênie (KONZAK et alii, 1964).

4. MATERIAL

O material usado para a realização do presente trabalho foi sementes dormentes de arroz (*Oryza sativa* L.), da variedade brasileira Dourado Precoces, usada para as culturas de sequeiro. As sementes foram multiplicadas no Instituto de Genética, ESALQ/USP, no período agrícola de 1974/75.

Antes de ser submetida aos tratamentos mutagênicos, as sementes sofreram uma seleção visual, visando a eliminação das doentes, chochas e também de impurezas físicas.

Como agentes mutagênicos físicos foram utilizadas as radiações gama e os neutrons térmicos e rápidos. A radiação gama foi obtida da fonte de Cobalto-60 do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da ESALQ/USP, em Piracicaba, São Paulo. Para os neutrons térmicos e rápidos, a irradiação foi realizada no Reator Nuclear do Laboratório de Seibersdorf da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), Vienna, Áustria.

Dois compostos mutagênicos químicos foram usados: o sulfato

de dietila $(C_2H_5O)_2SO_4$ de PM = 154,18 (Carlo Erba), que é um agente arqui-
lante e a azida sódica NaN_3 de PM = 65,01 (Merck), um inibidor respiratório.

Para que a expressão dessas drogas químicas no decorrer do
trabalho torne-se mais simples, serão usadas suas abreviações, de acordo com
as citações mais frequentes da literatura, ou seja, DES e SA respectivamen-
te ao mutagênicos citados.

O DES foi usado na forma líquida e a SA como pó, os quais fo-
ram tamponados com ácido cítrico $HOC(COOH)(CH_2COOH)_2.H_2O$ de PM = 210,14
(J.T. Backer) e fosfato de sódio Na_2HPO_4 de PM = 141,96 (Mallinckrodt), de
acordo com os tampões desejados.

5. MÉTODOS

5.1. Tratamentos mutagênicos

5.1.1. Mutagênicos físicos

5.1.1.1. Irradiação com radiação gama

Nas irradiações com raios gama, as dosagens usadas corresponderam a 0, 8, 16, 24 e 32 KR, a uma taxa de dose igual a 5,35 KR/min., sendo que, para a obtenção dessas dosagens, manteve-se constante a distância do material a ser irradiado da fonte, e fez-se variar o tempo de exposição do mesmo. O tratamento foi feito de modo cumulativo.

Nas dosagens usadas, o número de sementes tratadas foi diferente (200, 200, 200, 300 e 400, respectivamente às dosagens), baseado em que, com o aumento das dosagens, o número de sementes germinadas decresce (ANDO, 1970 e WOO *et alii*, 1971a), e para os estudos em questão, precisou-se de pelo menos 100 plântulas germinadas por tratamento efetuado.

5.1.1.2. Irradiação com neutrons térmicos

Os neutrons térmicos foram obtidos num orifício do reator do tipo "swimming pool", com uma potência igual a 7,0 MW, no Laboratório de Seibersdorf (IAEA, Vienna). Para essa irradiação, as sementes foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 x 6,0 cm, no qual eram colocadas 200 sementes por dose. O método empregado foi o do ar comprimido, com o material recebendo um fluxo de radiação de $4,69 \times 10^{10}$ Nth/cm²/seg., com a mínima contaminação de raios gama.

Nessas condições, o material recebeu tratamentos de dosagens iguais a $1,97 \times 10^{13}$, $3,94 \times 10^{13}$ e $5,91 \times 10^{13}$ Nth/cm², sendo que, logo após o tratamento, as sementes foram enviadas ao Brasil.

5.1.1.3. Irradiação com neutrons rápidos

As condições usadas para esse tratamento, foram semelhantes as anteriores, pois o material foi tratado no mesmo reator do tipo "swimming pool" do Laboratório de Seibersdorf. No entanto, para esse tratamento o material foi colocado em saquinhos plásticos e irradiado pelo método de "fishing", dentro da "piscina".

O fluxo de radiação usado foi igual a 1,02 Krad/min., a uma potência de 8,0 MW. Desse modo, as dosagens obtidas foram iguais a 2 e 3 Krads, cabendo 200 sementes a cada uma delas. Logo depois de irradiado, o material foi enviado ao Brasil.

5.1.2. Mutagênicos químicos

5.1.2.1. Tratamento com DES

As soluções de DES foram preparadas no Laboratório do Setor de Radiogenética do CENA, adicionando-se o produto a água destilada pH = 7,0, em diferentes concentrações. Todavia, com esse mutagênico, houve um problema inicial referente a sua solubilidade em água destilada, o qual foi solucionado acrescentando-se 15% de álcool etílico 96° a solução. Tomou-se o cuidado, contudo, da realização de um experimento preliminar, visando medir até que concentração, em volume de álcool, não iria interferir na germinação, sobrevivência e altura de plântulas a ser submetida a tratamento mutagênico.

As concentrações usadas nos tratamentos das sementes com DES foram de 0,0036, 0,0072, 0,0145 e 0,0290 M, tomando-se o cuidado de a cada duas horas de tratamento renovar a solução mutagênica, visto que a meia vida desse produto a temperatura de 25°C, está próxima a esse valor (KAMRA e BRUNNER, 1970).

Para a realização dos tratamentos mutagênicos foram colocadas 400 sementes em placas de Petri, onde manteve-se uma constância do volume de solução por semente a ser tratada de 0,5 ml.

Durante todo o período de embebição no mutagênico, o material permaneceu na câmara de crescimento do Instituto de Genética, a uma temperatura constante de 25°C; disso passaram por uma fase de pós lavagem em água corrente de torneira durante 30 minutos. A finalidade dessa lavagem é a de

eliminar o excesso do protudo presente no exterior das sementes.

5.1.2.2. Tratamento com SA

Com o mutagênico SA foram preparadas soluções tampão pH 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0, feitas no Laboratório do Setor de Radiogenética do CENA, utilizando-se como componentes o ácido cítrico e o fosfato de sódio. O ajuste das soluções tampão foi feito no Laboratório do Departamento de Química da ESALQ, por peagâmetro eletrônico.

Uma série de experimentos foram realizados com o tratamento SA, pois para esse produto mutagênico foram usadas quatro concentrações, quatro pHs, pré-tratamento em água destilada presente e ausente.

As concentrações usadas para a SA foram iguais a 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} e 5×10^{-2} M, preparadas em solução tampão de pH 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 e com pré-tratamento em água destilada por oito e zero horas.

Foi considerada, também para essas combinações a constância de 0,5 ml de solução tratamento por semente, sendo usadas para cada uma delas 400 sementes, colocadas dentro de placas de Petri. Após o tratamento, as sementes foram lavadas em água corrente de torneira durante 30 minutos, visando eliminar o excesso do produto presente em seu exterior. Na tabela seguinte são apresentados todos os 32 tratamentos usados para a SA.

Tabela . Tratamentos com SA em sementes de arroz, envolvendo quatro concentrações, quatro pHs e pré-tratamento em água destilada.

	Concentração (M)				pH
	1×10^{-3} (1)	5×10^{-3} (2)	1×10^{-2} (3)	5×10^{-2} (4)	
Pré-trat. (h)					
8	813	823	833	843	3,0
8	814	824	834	844	4,0
8	815	825	835	845	5,0
8	816	826	836	846	6,0
0	013	023	033	043	3,0
0	014	024	034	044	4,0
0	015	025	035	045	5,0
0	016	026	036	046	6,0

5.2. Obtenção dos dados experimentais

Os dados experimentais foram obtidos tanto para os mutagênicos físicos como para os químicos, seguindo basicamente um mesmo esquema. Contudo, devido uma carência de tempo, fez-se para os mutagênicos químicos, uma variação na parte inicial.

Para que o experimento pudesse caminhar mais rapidamente, se-

meou-se logo após os tratamentos, parte do material no campo experimental , sendo que a outra parte foi semeada nas caixas de madeira dentro da casa de vegetação. Com isso, evitou-se o transplante das mudas das caixas ao campo, e assim a cultura pode ser realizada dentro de seu ciclo normal, e sem prejuízos aos resultados.

5.2.1. Sobrevivência de plântulas M_1

Para que esses resultados fossem obtidos, as sementes que sofreram tratamentos mutagênicos, foram semeadas em caixas de madeira contendo terra preparada para o experimento, com a finalidade de padronizar as condições de tratamento. Essas caixas permaneceram durante todo o tempo de experimento, dentro da casa de vegetação do Instituto de Genética, para que a germinação e o crescimento fossem facilitados e se mantivesse as mesmas condições ambientais a todos tratamentos executados.

A sobrevivência das plântulas M_1 foi anotada 14 dias após a semeadura, contando-se como sobreviventes as plântulas que nesse dia apresentava-se com mais de 3 cm de altura do solo.

5.2.2. Altura de plântulas M_1

A altura de plântulas M_1 , foi protocolada no mesmo dia quando a sobrevivência foi anotada, tomando-se como medida a altura desde o solo até a extremidade superior do limbo foliar da folha maior. Usou-se dos dados provenientes de 100 plântulas medidas.

5.2.3. Fertilidade de plantas M_1

Decorrida essa fase da coleta de dados de sobrevivência e altura de plântulas M_1 , foram elas deixadas sob as mesmas condições por mais 30 dias, após o que realizou-se o transplante para o campo.

Com as plantas M_1 no campo, aguardou-se o estágio final de maturação de suas panículas, ponto esse no qual fez-se a colheita dos três maiores perfilhos férteis (maiores em altura do solo), sendo os mesmos acondicionados em saquinhos de papel e levados ao laboratório, para que fossem submetidos à análise da fertilidade de plantas M_1 .

Na realização dessa contagem, foi tomada uma panícula, das três existentes no interior de cada saquinho, de modo casual. Por meio de dois contadores manuais procedeu-se a contagem, sendo que o critério adotado, foi a distinção visual das sementes férteis e estéreis.

5.2.4. Frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2

A semeadura das panículas M_1 foi realizada em canteiros de areia, dentro da casa de vegetação, onde receberam duas regas diárias (período da manhã e a tarde). Nas épocas mais frias, os canteiros eram cobertos com plásticos para que a germinação fosse facilitada. A contagem das plântulas mutantes e não mutantes ocorreu entre o 12º e o 18º dias após a semeadura.

Nessa fase experimental, anotou-se separadamente o total de plântulas germinadas por panícula e o total de plântulas mutantes por paní-

cula. Considerou-se como plântula germinada aquela que no dia da contagem apresentava-se aproximadamente com mais de 3 cm de altura do solo, e como plântula mutante apenas as com clorofila deficiente.

A classificação desses mutantes, usada por HOLM (1954)⁴, considera as seguintes classes: (1) *albina*, ausência de pigmentos amarelos ou verdes; (2) *viridis*, pigmentos verde-claro distribuídos uniformemente; (3) *xantha*, pigmentos amarelos distribuídos uniformemente; (4) *alvo-viridis*, pigmentos verde-claro e extremidade superior da folha com ausência de pigmentos; (5) *virido-albina*, pigmentos verde-claro na extremidade superior da folha e ausência de pigmentos nas demais partes; (6) *alvo-xantha*, ausência de pigmentos na extremidade superior e demais partes com pigmentos amarelos; (7) *xantha-alva*, pigmentos amarelos na extremidade superior da folha e ausência de pigmentos nas demais partes; (8) *virido-xantha*, pigmentos verde-claro na extremidade superior das folhas e demais partes com pigmentos amarelos; (9) *xantho-viridis*, pigmentos amarelo na extremidade superior e de demais partes com pigmentos verde-claro; (10) *striata*, distribuição transversal de pigmentos amarelos ou verdes e (11) *maculata*, ausência de pigmentos distribuída de modo não uniforme.

Para o objetivo desse trabalho, na apresentação dos resultados, usou-se apenas de quatro classes de mutantes: (a) *albina*, (b) *viridis*, (c) *xantha* e (d) "outras". A quarta classe, denominada de "outras", procurou englobar todas as demais classes citadas. No entanto, para o cálculo da frequência de mutação de clorofila, não foi feita distinção em classes.

A frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2 , foi

4 - citado por STEAGALL (1977)

calculada tomando-se ao acaso 50 saquinhos de cada tratamento, e desses semeou-se as três panículas, o que resultaria ao final, um total de 150 panículas semeadas. Contudo, o número de panículas germinadas não correspondeu ao número de panículas semeadas, uma vez que nem todas apresentaram sementes germinadas, devido ao efeito do tratamento.

Dessa contagem, foi possível analisar-se a frequência de mutação por dois métodos distintos: (1) número de mutações em plântulas M_2 pelo total de panículas M_1 , (nesse método, tomou-se apenas como uma mutação, quando eram encontradas várias do mesmo tipo na mesma panícula M_1); (2) número de plântulas mutantes M_2 pelo total de plântulas M_2 .

5.3. Análise estatística

Para a altura de plântulas, foi feita uma análise de variância. Entretanto, para que essa análise de variância pudesse ser realizada, tomou-se apenas os tratamentos com o mutagênico químico SA. A análise feita foi em fatorial 4×4 (quatro concentrações e quatro pHs), segundo apresentado por *BANCROFT (1968)*.

Devido a ausência de repetições, os valores de "F" apresentados para as concentrações e para os pHs, foram resultantes da comparação de seus quadrados médios com o do "erro dentro". Essa comparação é válida estatisticamente, desde que o "erro dentro", não seja grande a tal ponto de mascarar as diferenças devido aos efeitos dos tratamentos.

Com os demais parâmetros analisados foi aplicado o Teste de Independência.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento preliminar sobre solubilidade do DES

Os primeiros resultados obtidos foram provenientes de um experimento preliminar, no qual tratou-se as sementes de arroz com solução de álcool etílico 96^o, a diversas concentrações, mantendo-se a temperatura constante de 25^oC, durante todo o período de tratamento.

Procurou-se determinar a máxima concentração de álcool etílico que, diluído em água destilada, não causasse danos fisiológicos às sementes, e que possibilitasse aumentar a solubilidade do mutagênico químico DES.

A sobrevivência das plântulas tratadas com essas soluções, encontram-se na Tabela 1 e Figura 1. No primeiro experimento preliminar (Experimento 1), as concentrações usadas estão espaçadas a intervalos de 5%, isso feito, para que fosse possível a determinação de uma concentração onde a queda na sobrevivência aparecesse de modo marcante, o que foi verificado entre 15 e 20% (Figura 1).

Para que a queda fosse determinada com maior precisão, fez-se o segundo experimento preliminar (Experimento 2), no qual, foram usadas concentrações menos espaçadas ao redor da queda drástica encontrada no Experimento 1. Desse modo, variou-se as concentrações de 12 a 18%, e a conclusão a que se chegou foi: a concentração de álcool etílico 96° a atingir o objetivo em questão está ao redor de 15%.

6.2. Sobrevivência de plântulas M_1

A sobrevivência de plântulas M_1 , foi um parâmetro analisado para os tratamentos com radiação gama, DES e SA. Para os neutrons térmicos e rápidos, não foi possível essa análise, pois, quando do início do experimento o material já se encontrava no campo.

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5 e nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Na Tabela 2, os valores apresentados referem-se ao tratamento das sementes com quatro dosagens de radiação gama (8, 16, 24 e 32 KR). Porém, na Figura 2, pode-se observar que não houve uma tendência marcante do efeito das dosagens de radiação gama sobre a sobrevivência de plântulas M_1 .

Nos tratamentos com o mutagênico químico DES, as quatro concentrações usadas (0,0036, 0,0072, 0,0145 e 0,0290 M), apresentaram uma tendência de redução na sobrevivência de plântulas, a medida que as concentrações usadas aumentavam (Tabela 3 e Figura 3).

Os resultados das Tabelas 4 e 5, e as Figuras 4 e 5, refe-

rem-se ao mutagênico químico SA, estando assim divididos baseado na existência ou não do pré-tratamento das sementes por oito horas em água destilada. Na Tabela 4 e Figura 4, tem-se a combinação de quatro concentrações da solução de SA e quatro pHs do tampão, todos sem o pré-tratamento em água destilada. Observa-se uma tendência de redução na sobrevivência de plântulas M_1 , com o aumento das concentrações do mutagênico SA, dentro de um mesmo pH. Todavia, para uma determinada concentração, as diferenças de pH não mostraram uma tendência clara.

Para os tratamentos mutagênicos que receberam oito horas de pré-tratamento em água destilada, os resultados estão na Tabela 5 e Figura 5. Com o aumento da concentração do mutagênico, dentro de um pH, pode-se observar que há uma sensível redução na sobrevivência de plântulas M_1 . Entretanto, diferenças nos pHs das soluções, dentro de uma concentração, não mostraram uma tendência determinada.

6.3. Altura de plântulas M_1

Com a altura de plântulas M_1 , também não foi possível abtenção de resultados para todos os tratamentos, pois os experimentos com neutrons não passaram por essa fase.

Nas Tabelas 2, 3, 6, 7, 8 e 9 e nas Figuras 2, 3, 6 e 7, são mostrados os resultados referentes a altura de plântulas M_1 . Na Tabela 2 e Figura 2, tem-se os tratamentos com radiação gama, e destes pode-se notar uma tendência não clara de redução da altura. Entretanto, todas as doses usadas apresentam-se com alturas menores que o controle.

Os tratamentos com DES, mostraram um decréscimo na altura de plântulas, em relação ao controle, com o aumento das concentrações do mutagênico. Porém, com a concentração mais fraca (0,0036 M), parece que houve um estímulo ao crescimento, pois nessa concentração a altura média das plântulas tratadas foi maior que as não tratadas (Tabela 3 e Figura 3).

As médias das alturas de plântulas M_1 , dos tratamentos com o mutagênico SA, são apresentadas nas Tabelas 6 e 7, e Figuras 6 e 7. Na Tabela 6, as sementes não receberam o pré-tratamento em água destilada, e nessas foi verificada uma tendência de redução no crescimento das plântulas, a medida em que as concentrações foram sendo mais fortes. Essa afirmação é válida para qualquer pH. Fixando-se uma concentração e estudando-se o efeito do pH, pode-se observar que, de um modo geral, há um decréscimo na altura de plântulas com o aumento da acidez.

As sementes pré-tratadas por oito horas em água destilada, apresentaram uma tendência de decréscimo na altura de plântulas M_1 , tanto para o aumento das concentrações como para o aumento da acidez (Tabela 7 e Figura 7).

Com o mutagênico SA, foi possível a elaboração de uma análise de variância, em esquema fatorial 4×4 , onde numa das ordenadas está a concentração e na outra o pH. Desse modo, procedeu-se a análise de variância, com a ressalva de que, os valores encontrados para o "F", foram provenientes da comparação dos quadrados médios das concentrações e pHs, com o quadrado médio do "erro dentro". Isso ocorreu devido ao fato de não possuir repetições para os tratamentos dentro do experimento.

Os resultados obtidos da análise de variância, são mostrados nas Tabelas 8 e 9, de onde, pode-se observar a significância para os valores de "F" obtidos. Para ambos os casos (sem e com pré-tratamento) e para ambas as fontes de variação (concentrações e pHs), o "F" mostrou-se significativo ao nível de 1%.

Os resultados apresentados na Tabela 8, indicam que há diferenças significativas ao nível de 99% de probabilidade, isto indicando que, pelo menos um dos pHs usados difere dos demais significativamente e também que pelo menos uma das concentrações difere significativamente das demais usadas. Na Tabela 9, tem-se os resultados das sementes que receberam o pré-tratamento por oito horas em água destilada, o qual mostrou-se coincidente com os do material não pré-tratado. Houve também uma diferença significativa ao nível de 99% de probabilidade entre as concentrações e entre os pHs.

6.4. Fertilidade de plantas M_1

A fertilidade de plantas M_1 foi uma das características determinadas em todos os tratamentos com mutagênicos físicos e químicos, e seus resultados são apresentados nas Tabelas 2, 3, 10, 11 e 12 e Figuras 2, 3, 8 e 9.

Os tratamentos com neutrons térmicos e rápidos tem seus resultados de fertilidade apresentados na Tabela 12, onde pode-se observar para ambos os tipos de neutrons um decréscimo com o aumento das dosagens de radiação aplicadas.

Com a radiação gama (Tabela 2 e Figura 2), houve um decréscimo

mo da fertilidade de plantas M_1 com o aumento das dosagens, cabendo a mais forte (32 KR), um decréscimo de 75%, em relação do controle não irradiado .

O mutagênico químico DES, que tem seus resultados apresentados na Tabela 3 e Figura 3, não mostrou marcante redução na fertilidade com o aumento das concentrações, havendo apenas uma pequena oscilação de 2 a 3% de queda em relação ao controle tratado com água.

A fertilidade de plantas M_1 para os tratamentos com o mutagênico químico SA, é apresentada nas Tabelas 10 e 11. Os resultados das sementes não pré-tratadas em água destilada não mostraram uma tendência clara de redução na fertilidade de plantas M_1 (Tabela 10 e Figura 8). Já as sementes pré-tratadas em água destilada por oito horas, mostraram uma tendência de redução, a medida que as concentrações e a acidez eram aumentadas (Tabela 11 e Figura 9).

6.5. Frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2

Para o cálculo das frequências de mutação de clorofila em plântulas M_2 , os números de panículas M_1 e plântulas M_2 , foram bastante variáveis para os tratamentos, uma vez que a germinação e a sobrevivência das plântulas M_1 , são afetadas pelo efeito dos tratamentos.

Na Tabela 13, estão presentes os resultados das frequências de mutação de clorofila, calculadas com base no total de panículas M_1 e de plântulas M_2 . Nessa tabela foram agrupados os tratamentos com radiação gama e também aqueles com DES.

Pode-se observar nas Tabelas 12 e 13, que há variações nos resultados obtidos quando o método empregado é o de panículas M_1 ou de plântulas M_2 . Por exemplo, para o método das panículas M_1 , a frequência mais elevada correspondeu a dosagem de $3,94 \times 10^{13}$ Nth/cm² de neutrons térmicos (37,76%); para as plântulas M_2 a dosagem de 24 KR de radiação gama (1,73%). Os tratamentos com DES, não mostraram mutações para ambos os métodos usados para o cálculo da frequência.

Com os tratamentos que envolveram o mutagênico químico SA, construiu-se duas tabelas de resultados (Tabelas 14 e 15). A primeira mostra as frequências de mutações de clorofila, para as sementes que não receberam o pré-tratamento em água destilada cabendo a Tabela 15, os resultados referentes ao material pré-tratado por oito horas em água destilada.

Em todas as tabelas de frequência de mutação pode-se observar a apresentação do número de panículas M_1 e de plântulas M_2 analisadas, para servir de indicativo de precisão dos resultados encontrados.

Os resultados do Teste de Independência para a frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2 , acham-se nas Tabelas 16 e 17. Fazendo-se uma análise dos mesmos, pode-se perceber claramente o comportamento bastante variável do material, quando esse é submetido a tipos diferentes de tratamentos e a dosagens e concentrações variáveis do mesmo mutagênico.

As mutações de clorofila apresentadas nos diversos tratamentos, podem ser classificadas em várias classes segundo HOLM (1954). Toda-

via, para a execução desse trabalho, adotar-se-a a divisão em apenas quatro classes, que são: *albina*, *xantha*, *viridis* e "outras".

O espectro de mutação de clorofila é apresentado na Tabela 18, e observa-se que o tipo albino foi, para todos os mutagênicos, aquele que se apresentou como o mais frequente, correspondendo a 66,67% com neutrons térmicos, 100,00% com neutrons rápidos, 78,57% com radiação gama e 58,79% com o mutagênico químico SA (englobou-se os resultados das sementes pré-tratadas e não pré-tratadas).

6.6. LD₅₀ e GR₅₀

A LD₅₀ (dose que causa 50% de letalidade) e a GR₅₀ (dose que causa uma redução de 50% no crescimento, em termos de altura de plântulas), podem ser estimados a partir das Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Contudo, essas figuras foram construídas baseadas apenas nas dosagens e concentrações usadas no experimento, e com isso, qualquer extrapolação de resultados é uma aproximação daquilo que realmente irá ocorrer.

Com os neutrons térmicos e rápidos não foi possível a obtenção dos dados de sobrevivência e altura de plântulas M₁, e desse modo, não foram estimados os valores da LD₅₀ e da GR₅₀.

Para os tratamentos com radiação gama, não se pode estimar os valores de LD₅₀ e de GR₅₀, apenas citar que correspondem a dosagens superiores a 32 KR, que foi a máxima usada no experimento (Figura 2).

Com o mutagênico químico DES, tem-se na Figura 3, que a máxi

ma concentração usada (0,0290 M), não foi capaz de atingir a LD_{50} e a GR_{50} , de onde pode-se concluir que seus valores estão acima dessa concentração.

Os resultados apresentados na Tabela 19, que foram estimados a partir das Figuras 4, 5, 6 e 7, referem-se ao mutagênico SA. De um modo geral pode-se dizer que, tanto para alcançar os valores de LD_{50} como as de GR_{50} , foi necessário concentrações mais fortes do mutagênico, quando as sementes tratadas não sofreram pré-tratamento em água destilada. Para as sementes pré-tratadas por oito horas em água destilada, as concentrações exigidas para que os valores da LD_{50} e da GR_{50} fossem atingidas, foram mais fracas.

7. DISCUSSÃO

7.1. Irradiação com radiação gama

O uso das radiações gama em sementes de arroz, mostrou os resultados apresentados na Tabela 2 e na Figura 2. A princípio, tais resultados vem indicar que a máxima dosagem usada (32 KR), poderia ser ainda maior, uma vez que, seu efeito na sobrevivência e na altura de plântulas M_1 , não alcançou os valores de LD_{50} e da GR_{50} .

Na geração M_1 , os efeitos fisiológicos de maior interesse, que segundo SPARROW (1961) são a sobrevivência e a altura de plântulas, não mostraram-se pronunciados, chegando mesmo a atingir uma certa constância com o aumento das dosagens usadas (Figura 2), o que vem contrariar trabalhos apresentados por outros autores como GENTER e BROWN (1941), GAUL (1960), YAMAGUCHI (1962), MIKAELSEN *et alii* (1968) e outros, que mostraram existir uma redução na sobrevivência e altura de plântulas com o aumento das dosagens.

Mesmo assim a altura de plântulas sofreu um pequeno decréscimo, mas não linear, e mostrou em todos os tratamentos uma redução em

relação ao controle, não havendo casos como os encontrados por *STEAGALL* (1977), onde a altura de plântulas de alguns tratamentos superou a do controle.

Esses resultados obtidos não concordaram com aqueles encontrados na literatura, como foi citado acima, dentro dessas condições de tratamento do presente trabalho, onde a máxima dosagem usada (32 KR) não foi capaz de atingir os valores de LD_{50} e da GR_{50} . Com isso deseja-se dizer que, usando-se de maiores dosagens, os resultados viriam ser diferentes desses aqui relatados.

Para a fertilidade de plantas M_1 , os resultados mostraram um decréscimo acentuado com o aumento das dosagens (Figura 2). A dosagem mais forte (32 KR) coube uma redução de 75% da fertilidade em relação ao controle e com 24 KR a queda foi de 55%. Com isso, pode-se notar que o efeito da radiação gama sobre a fertilidade foi bem maior que sobre a sobrevivência e altura de plântulas, mostrando assim que a fertilidade é um dos caracteres mais sensíveis a irradiação.

A frequência de mutação de clorofila manteve-se crescente até a dosagem de 24 KR, após o que verificou-se uma queda da mesma a 32 KR, afirmação essa válida para os dois métodos de análise usados. Contudo, isso vem discordar do trabalho de *HEINER et alii* (1960), que usaram métodos de análise diferentes e obtiveram resultados também diferentes.

A queda da frequência de mutação de clorofila nas dosagens altas pode ser justificada pela baixa fertilidade das plantas M_1 . Quando as

plantas foram irradiadas com dosagens elevadas, a fertilidade foi seriamente afetada, perdendo as sementes que poderiam estar carregando mutações, acarretando assim em baixa na frequência de mutação de clorofila.

Baseado nos resultados encontrados, conclui-se que, visando o uso das radiações gama em sementes de arroz, com a finalidade de obter-se os menores danos fisiológicos e as maiores frequências de mutação, a dosagem mais adequada estaria entre 20 e 30 KR. No presente experimento, a dosagem de 24 KR mostrou-se com a maior frequência de mutação de clorofila, para ambos os métodos de análise e concomitantemente apresentou a sobrevivência e a altura de plântulas pouco afetadas. A fertilidade de plantas nessa dosagem, não foi acentuadamente reduzida (Figura 2).

7.2. Irradiação com neutrons térmicos e rápidos

Nas sementes de arroz irradiadas com neutrons térmicos e rápidos, não foi possível a contagem dos sobreviventes nem a medida de altura de plântulas, implicando assim em ausência de informes relacionados aos danos fisiológicos na geração M_1 .

No entanto, os resultados de fertilidade de plantas M_1 mostraram, para os dois tipos de neutrons, uma queda com o aumento das dosagens, sendo que, para os neutrons térmicos essa queda foi mais acentuada (Figura 12). Quanto a frequência de mutação de clorofila, foi observada uma queda gradual com o aumento das dosagens, para ambos os tipos de neutrons, quando o método analisado foi o do número de mutantes por 100 panículas M_2 (Tabela 12).

Essa queda ocorrida na frequência de mutação de clorofila, pode ser explicada tomando-se como base a baixa fertilidade apresentada por esses tratamentos, que devido a isso estaria eliminando plântulas mutantes M_2 , influenciando assim nos resultados encontrados (semelhante a radiação gama).

O uso de dois métodos de análise de frequência de mutação de clorofila, para os neutrons térmicos e rápidos, apresentou variações nos resultados. Para o método do número de mutações por panículas M_1 , os neutrons térmicos com o fluxo de $3,94 \times 10^{13}$ Nth/cm² produziram a maior frequência (36,76). Com os neutrons rápidos, foi a dosagem de 3 Krads que proporcionou a maior frequência (5,53).

O equivalente biológico de neutrons térmicos para a radiação gama, baseado na produção de mutação de clorofila, foi calculada usando-se das dosagens de 32 KR de radiação gama e $1,97 \times 10^{13}$ Nth/cm² de neutrons térmicos, que produziram aproximadamente a mesma frequência de mutação (0,99 e 0,94 respectivamente). Esse cálculo levou ao resultado de que 1 R de radiação gama equivaleu a $1,62 \times 10^9$ Nth/cm² de neutrons térmicos, resultado esse, que difere do encontrado por CALDECOTT (1954) em sementes de cevada, que foi igual a $3,0 \times 10^8$ Nth/cm².

O espectro de mutação de clorofila para os mutagênicos empregados, encontram-se na Tabela 18, onde pode-se observar uma diferença entre os dois tipos de neutrons usados. Pois para os neutrons térmicos a taxa de *albino* foi de 66,67%, enquanto que para os rápidos, todos os mutantes obtidos pertenceram a essa classe, sendo assim 100% a taxa de *albino*. O tipo *xantha* não foi observado para ambos, e o *viridis* está presente com 4,17% para os neutrons térmicos, e o tipo "outros" com 29,17%.

7.3. Tratamento com mutagênico químico DES

O DES foi um dos dois mutagênicos químicos empregados no presente trabalho. Sabe-se que o produto DES é um eficiente agente mutagênico e que seus danos a estrutura cromossômica são baixos (*NILAN et alii, 1964*), sendo esse o motivo de seu uso no trabalho em pauta.

Os danos a sobrevivência de plântulas M_1 que são encontrados na Tabela 3 e Figura 3, foram pequenos, embora com o aumento das concentrações tenha ocorrido um decréscimo dessa, e conseqüentemente um possível aumento nos danos; não alcançando níveis significativos.

Com a altura de plântulas M_1 , foi verificado o mesmo comportamento apresentado pela sobrevivência, pois os danos foram pequenos, embora tenha havido um decréscimo com o aumento das concentrações, que também não chegou a ser significativo. Todavia, com a menor concentração, parece que houve um estímulo ao crescimento, e com isso as plântulas M_1 tratadas (26,07 cm) mostraram-se mais altas que as não tratadas (24,61 cm).

Diante desses resultados obtidos, verifica-se que os danos fisiológicos na geração M_1 , são baixos quando as sementes são tratadas com o mutagênico DES, o que vem concordar com a literatura consultada (*KONZAK et alii, 1961 e NILAN et alii, 1964*).

A fertilidade de plantas M_1 também pouco sofreu com as concentrações empregadas, pois mesmo com a máxima concentração usada (0,0290 M) a fertilidade foi de 97,31% em relação ao controle, concordando com o trabalho de *ANDO (1970)*, que não encontrou redução drástica para a fertilidade.

Dos resultados obtidos com o agente mutagênico DES, a grande surpresa ficou reservada a freqüência de mutação, de clorofila que para ambos os métodos de cálculo mostrou-se igual a zero, em todas as concentrações empregadas.

Deste modo, não foi observado um aumento na freqüência de mutação de clorofila em plântulas M_2 , com o aumento das concentrações do mutagênico DES, contrariando assim os resultados encontrados na literatura, que afirmam existir um aumento proporcional na freqüência de mutação com o aumento das concentrações dos mutagênicos como o DES, EI, EMS e outros (KONZAK *et alii*, 1965, SATO 1966 e MIKAEISEN *et alii*, 1968).

Uma tentativa para explicar esta contradição seria baseada no erro de amostragem em consequência da queda na sobrevivência de plântulas, porém o mesmo não se verificou nesse experimento. Para os tratamentos com os demais mutagênicos a amostra foi de mesmo tamanho, mas, houve sempre uma freqüência de mutação de clorofila diferente de zero. Diante do exposto, ve-se que apenas o erro de amostragem não foi uma explicação suficiente para os resultados encontrados.

Outra dúvida seria a concentração usada, mas para esse problema temos WOO *et alii* (1977b), que usaram uma concentração de 0,01 para o DES, e fazendo variar o tempo de tratamento, obtiveram diversas freqüências de mutação. No presente trabalho, são usadas as concentrações de 0,0145 e 0,0290 M que são superiores àquelas citadas como capazes de induzir mutações. Portanto, uma hipótese de que as concentrações usadas poderiam ser fracas em demasia não tem justificativa.

O DES é um produto pouco solúvel, além do que sua solução é muito instável a temperaturas acima de 25°C (KONZAK *et alii*, 1964). Para resolver esses problemas, foi necessário aumentar-se a solubilidade do produto acrescentando-se a solução água destilada e DES, o álcool etílico 96°, e assim foi conseguida uma solução saturada a 0,0290 M; e ao mesmo tempo realiizou-se o tratamento a temperatura constante de 25°C.

A explicação dos resultados obtidos com o DES, pode ser melhor fundamentada se baseada na solubilidade e na instabilidade do produto.

Com o acréscimo do álcool etílico na água destilada, houve um aumento de temperatura na solução. Esse aumento, juntamente com a temperatura ambiente do local onde a solução foi solubilizada, mais o tempo gasto para tal, poderiam produzir um somatório de efeitos capaz de ultrapassar a meia vida de hidrólise do mutagênico. Isso fez com que esse perdesse sua capacidade, antes mesmo de ser tratado o material.

7.4. Tratamento com mutagênico químico SA

Foram realizados 32 tratamentos com a SA, combinando-se para isso quatro concentrações, quatro pHs e pré-tratamento por oito horas em água destilada presente e ausente. Essa grande quantidade de tratamentos, em relação aos demais mutagênicos, é justificada pela existência de poucas informações a respeito do mutagênico SA aplicado em sementes.

O uso de diferentes pHs na solução tampão, é baseada na influência direta deste na eficiência mutagênica da SA (NILAN *et alii*, 1973 e KLEINHOFs *et alii*, 1974).

Pelos resultados obtidos (Tabelas 4 e 5), a sobrevivência de plântulas M_1 mostrou-se afetada pelo pH e concentração das soluções do mutagênico, bem como pelo pré-tratamento em água destilada. No experimento sem pré-embedição, coube ao pH maior acidez ($\text{pH} = 3,0$) e concentração mais alta ($5 \times 10^{-2} \text{ M}$), um maior efeito que os demais (apenas 17,35% da sobrevivência em relação ao controle).

Quando as sementes foram submetidas a pré-tratamento em água destilada, houve um decréscimo na sobrevivência, o qual foi mais drástico que para as sementes não pré-tratadas. Pois para a concentração mais forte e o pH de maior acidez, os danos fisiológicos foram tão intensos que a sobrevivência caiu a zero.

A LD_{50} foi estimada a partir das Figuras 4 e 5, para todos os pHs usados no mutagênico SA. Essa estimativa pode ser vista na Tabela 19, de onde pode-se perceber que, as sementes pré-tratadas requereram menores concentrações do mutagênico para que a LD_{50} seja atingida. A explicação para tal pode ser dada pela possível melhor penetração do produto no material pré-embebido em água destilada.

A altura de plântulas M_1 apresentou seu comportamento semelhante a sobrevivência. Assim, os maiores danos fisiológicos ocorreram com as concentrações mais elevadas e com os pHs mais ácidos. As sementes que receberam pré-tratamento em água destilada, mostraram-se mais afetadas com o mutagênico, pois tiveram sua altura média bastante reduzida em relação ao controle.

Para a altura de plântulas M_1 , pôde ser estimada a GR_{50} , (Figu-

ras 6 e 7), permitindo com seus valores que se chegasse a seguinte conclusão: quando as sementes eram pré-embebida em água, a GR_{50} apresentava-se com valores menores, em comparação ao material sem o período de pré-embebição (Tabela 19). Tal fato pode ser justificado pela possível melhor penetração do mutagênico no interior das células semelhante ao que ocorre com a altura.

Em uma análise geral, englobando-se sobrevivência e altura de plântulas M_1 , pode-se concluir que os danos fisiológicos foram maiores com as concentrações mais fortes (1×10^{-2} e 5×10^{-2} M), o que já havia sido comprovado por *NIKNJED (1976)* e *PEARSON et alii (1976)* em cevada. Com os pHs mais ácidos (pH = 3,0 e 4,0) e com o pré-tratamento das sementes em água destilada, também houve maiores danos, sendo o mesmo anteriormente constatado por *NILAN et alii (1973)* e *SANDER e NILAN (1974a)*.

Pode-se, de um modo geral, dizer-se que o pré-tratamento das sementes em água destilada, vem atuar sobre a membrana celular, fazendo com isso que a penetração do mutagênico dê-se de forma mais rápida e eficiente.

A fertilidade de plantas M_1 não mostrou-se drasticamente afetada com as mais elevadas concentrações e os pHs mais ácidos, quando as sementes não sofreram pré-tratamento. No entanto, o mesmo não foi verificado para as sementes que receberam pré-tratamento em água destilada, pois para esse caso houve uma ação mais drástica das concentrações elevadas e dos pHs ácidos (Figuras 8 e 9).

A frequência de mutação de clorofila em plântulas M_2 , que pode ser observada nas Tabelas 14 e 15, de um modo geral, mostrou-se crescen

te com o aumento das concentrações de SA. Contudo, essa tendência pode ser mais claramente visualizada para as sementes pré-tratadas, o que pode ser observada em ambos os métodos de cálculo.

Para as sementes que não receberam o pré-tratamento, há uma tendência mais clara para o método do número de mutações por 100 panículas M_1 . Para o método do número de mutantes por 100 plântulas M_2 , ocorreu algumas inversões da frequência, ou seja, onde a concentração foi maior a frequência foi menor e vice-versa.

É relatado por *SANDER e NILAN (1974)*, que há alterações nas frequências de mutação de clorofila, quando as sementes são pré-tratadas em água destilada, em relação as não pré-tratadas, o que também foi verificado no presente trabalho. Sem o pré-tratamento, a frequência máxima encontrada para o método do número de mutantes por 100 plântulas M_2 foi de 5,37 a concentração de 5×10^{-2} M com pH = 5,0 enquanto que para as sementes pré-tratadas, a frequência máxima foi de 10,67 a concentração 1×10^{-2} M com pH = 4,0.

Há casos, entretanto, que o número de panículas M_1 e plântulas M_2 , é muito pequeno para ser representativo como amostragem do tratamento realizado, e deste modo, pode estar influenciando nos resultados obtidos (Tabelas 14 e 15).

Pela aplicação do Teste de Independência para as frequências de mutação de clorofila, obteve-se os valores de qui-quadrado para as concentrações duas a duas, dentro de um mesmo pH (Tabela 16), e também para os pHs dois a dois, dentro de uma mesma concentração (Tabela 17).

Dos resultados obtidos, pode-se perceber que todos os tratamentos diferiram do controle tratado apenas com água destilada. Dentro dos pHs 5,0 e 6,0, para as sementes não pré-tratadas, todas as concentrações foram diferentes entre si, o mesmo ocorrendo para todos os pHs na concentração 5×10^{-2} M. Contudo, para a concentração mais fraca (1×10^{-3} M) praticamente não foi constatada diferenças entre os pHs das soluções tampão.

Desses resultados pode-se concluir que, usando-se de baixas concentrações do mutagênico SA, e um período de pré-tratamento em água destilada, a variação de pH não traz resultados positivos.

Baseado no trabalho realizado por *NILAN et alii* (1973), pode-se tentar uma explicação para o que foi observado, pois pode ocorrer que, com concentrações não muito elevadas e pré-tratamento em água destilada, haja uma igualdade de penetração na membrana a pHs ácidos (pH 3,0) e a pHs menos ácidos (pH 6,0). Desse modo, a azida hidrolizada (NH_3), não levaria vantagens para penetrar nessa ou naquela condição e implicaria em igualdade de ação.

Para pHs não muito ácidos (pH 5,0 e 6,0), a predominância da azida hidrolizada na solução não é verificada (*KLEINHOF et alii*, 1974), e com o pré-tratamento ausente, as diferenças entre as concentrações (1, 5, 10 e 50 vezes), manifestaram-se nas frequências de mutação de clorofila, implicando assim em que, todas as comparações feitas no Teste de Independência mostraram-se com os valores de qui-quadrado significativos para as concentrações (Tabela 16).

De um modo geral, as frequências de mutação de clorofila são maiores para as sementes pré-tratadas em água destilada, quando a análise é feita pelo método do número de mutantes por 100 plântulas M_2 . Entretanto, para o número de mutações por 100 panículas M_1 , o mesmo não foi verificado, pois ocorreram variações nas frequências. Porém, em ambos os métodos usados para o cálculo da frequência de mutações de clorofila, a máxima verificada para as sementes que receberam pré-tratamento em água destilada (39,25 para M_1 e 10,67 para plântulas M_2).

Dos tratamentos realizados com o mutagênico SA pode-se concluir que: (1) o pré-tratamento por oito horas em água destilada, faz com que os danos fisiológicos sejam maiores dentro de qualquer concentração a qualquer pH, e que a frequência de mutantes por plântulas aumente; (2) o aumento da acidez implicou em maiores danos fisiológicos, mas concomitantemente aumentou a frequência de mutação; (3) o aumento da concentração comportou-se semelhantemente ao aumento da acidez, ou seja, aumentando os danos fisiológicos e a frequência de mutação; (4) recomenda-se fazer-se novos estudos com o mutagênico SA, aumentando ainda mais as concentrações, usando de novos pHs para a solução tampão e variando o tempo de pré-tratamento, sempre com o intuito de obter-se menores danos fisiológicos e maiores frequências de mutação.

7.5. Comparação dos efeitos biológicos de radiação gama, neutrons, DES e SA

Para a comparação dos efeitos biológicos de produtos físicos

e químicos, foram consideradas a sobrevivência e a altura de plântulas M_1 , fertilidade de plantas M_1 e mutação de clorofila.

A radiação gama apresentou-se, dentro das dosagens usadas, como um mutagênico físico de baixos danos fisiológicos a sobrevivência e al tura de plântulas M_1 , mostrando-se menos acentuada que a SA. Entretanto, o DES comportou-se de modo similar a radiação, causando baixos danos fisioló gicos a essas duas características.

Com relação a fertilidade de plantas M_1 , os mutagênicos físi cos foram mais drásticos, causando maior redução da mesma com o aumento das dosagens. Com o DES a queda praticamente não existiu, e para a SA variou bastante, mas sempre com maiores efeitos que o DES.

Analisando-se as frequências de mutação de clorofila, calculada pelo método do número de mutações por 100 panículas M_1 , pode-se perceber que, entre os mutagênicos físicos, os neutrons térmicos foram os mais eficientes nas dosagens estudadas.

Esses neutrons reduziram bastante a fertilidade, mas apresentaram uma elevada frequência de mutação de clorofila. Com uma fertilidade de 71,58% induziram 8,62 mutações, e com 37,52% induziram a mais alta frequência para agentes físicos (36,76 mutações).

Os neutrons rápidos foram menos eficientes que a radiação gama, embora tenham mostrado frequências maiores, como 5,53 mutações por 100 panículas M_1 . A fertilidade para esse caso foi reduzida ao nível de 28,84%, o que não ocorreu com a radiação gama.

Deste modo, uma classificação dos agentes físicos, em ordem de eficiência mutagênica, dentro das dosagens empregadas, coloca os neutrons térmicos em primeiro lugar para esse método de cálculo.

Para o DES, não ocorreu mutações em ambos os métodos de cálculo, e assim sendo, sua eficiência não foi mostrada nas concentrações usadas.

A máxima frequência de mutação de clorofila em 100 panículas M_1 foi observada para a SA, sendo igual a 40,74 mutações, e a fertilidade desse tratamento foi de 45,51% em relação ao controle. Em 100 plântulas M_2 , obteve-se 10,67 mutantes; frequências superiores as apresentadas pelos mutagênicos físicos.

Comparando-se mutagênicos físicos e químicos, com base em ambos os métodos de cálculo das frequências de mutação, conclui-se que a SA mostra-se, na maior parte das condições usadas (concentração, pHs e pré-tratamento em água destilada), como mais eficiente.

Com esses resultados, uma classificação envolvendo os agentes físicos e químicos, comparando suas eficiências mutagênicas com base no número de mutações por 100 panículas M_1 , a ordem a que se chega é a seguinte: SA > neutrons térmicos > radiação gama > neutrons rápidos > DES.

Tomando-se como base de comparação o método do número de mutantes por 100 plântulas M_2 , o resultado encontrado, indica uma maior eficiência das radiações gama em relação a ambos os tipos de neutrons. Envolvendo também os produtos químicos, a SA é aquela de maior eficiência.

.60.

No entanto, a classificação dos agentes físico e químicos, quanto a eficiência mutagênica baseada no número de mutantes por 100 plântulas M_2 , é, para as condições deste trabalho, a seguinte: SA > radiação gama > neutrons térmicos > neutrons rápidos > DES. Portanto, difere da encontrada com o método anterior.

A generalização dessa eficiência é arriscada, devido ao fato de que, poucos tratamentos foram utilizados para representar cada mutagênico estudado, mas mesmo assim, a idéia é totalmente válida, e serve como orientação a novos estudos com esses produtos aplicados em sementes de arroz.

8. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, pôde-se apontar as seguintes conclusões:

a. As radiações gama, dentro das dosagens usadas, não mostraram acentuada redução na sobrevivência e altura de plântulas M_1 , com o aumento das dosagens. A fertilidade de plantas M_1 decresceu de modo marcante e a frequência de mutação elevou-se.

b. Os neutrons térmicos e rápidos reduziram a fertilidade de plantas M_1 com o aumento das dosagens usadas, e não mostraram-se mais eficientes em induzir mutações de clorofila que as radiações gama.

c. O DES causou baixos danos fisiológicos a geração M_1 , todavia não induziu o aparecimento de mutantes deficientes em clorofila.

d. A SA mostrou-se com o melhor comportamento diante dos demais mutagênicos, no que diz respeito a indução de mutações e mutantes de clorofila.

e. O aumento das concentrações e da acidez, para o mutagênico SA, implicou em um aumento nos danos fisiológicos, entretanto, a frequência de mutação de clorofila, de um modo geral, também foi crescente.

f. O pré-tratamento das sementes com água destilada fez com que essas apresentassem uma maior sensibilidade aos tratamentos com a SA. Os danos fisiológicos foram maiores e as frequências de mutação de clorofila, alcançaram máximos superiores, ao material não pré-tratado.

g. A fertilidade de plantas M_1 foi o parâmetro mais sensível para estudar-se a sensibilidade das sementes de arroz aos diferentes mutagênicos usados.

9. SUMMARY

Dry rice seeds of the variety "Dourado Precoco" were treated with gamma rays, thermal and fast neutrons, di-ethyl sulphate (DES) and sodium azide (SA).

Biological effects of these treatments were studied in the M_1 generation and survival, seedling height, plant fertility and chlorophyll mutation frequency were calculated.

The obtained data were analysed by "independent test". For plant height, it was possible to organize a variance analysis. For chlorophyll mutations, two analysis methods were used: (1) mutation number for 100 M_1 panicles and (2) mutant number for 100 M_2 seedlings.

The gamma-ray treatments showed no survival decreasing with the increased of dosage, but for DES and SA increased dosages caused the decrease of survival.

However, the same effect was seen in the SA treatments where the increase of acidity of buffer solution accompanied with pre-treatment in

distilled water decreased survival number.

The M_1 seedling height was decreased with the increase of gamma-ray dosage, DES concentration, SA acidity and concentration.

The M_1 plant fertility for neutron treatment was also decreased with dose.

Plant fertility is one of the most sensitive characters for mutagenic treatments, with drastic reductions with higher gamma-ray, and neutron dosages, and with high SA acidity and concentrations.

As for chlorophyll mutations, the responses were varied according to mutagen dosages and test conditions for each one. Calculating methods also affected this frequency.

The maximum chlorophyll mutation frequency was obtained in the SA treatment: 40,74 mutations were observed on the basis of 100 M_1 panicles at 5×10^{-2} M and pH = 4,0 without pre-treatment in distilled water, and 10,67 mutants on the basis of 100 M_2 seedlings at 1×10^{-2} M and pH = 4,0 with pre-treatment in distilled water.

Pre-treated seeds with distilled water showed larger physiological damages in the SA treatments and higher mutation frequencies.

Regarding chlorophyll mutation frequency, thermal neutrons were more efficient than gamma-rays in the present work. For fast neutrons, it was impossible to draw any conclusions due to few informations obtained.

However, SA was the most efficient among the mutagens used.

DES showed lower physiological damages in the M_1 plants but did not induce mutations in the used conditions. More detailed studied will be necessary to draw more accurate conclusions.

10. LITERATURA CITADA

- 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.
- BANCROFT, T.A., 1968. *Topics in intermediate statistical methods*. Ames, The Iowa State University Press. 129 p.
- BEARD, B.H., F.A. HASKINS e C.O. GARDNER, 1958. Comparison of effects of X-rays and thermal neutrons on dormant seeds of barley, maize, mustard and safflower. *Genetics*. Texas, 43(5): 728-736.
- BEKENDAM, J., 1961. X-rays induced mutations in rice. In: Effects of Ionizing Radiations on Seeds. Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 609-629.

- 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.
- BRIGGS, R.W., 1970. Radiation types and sources. In: Manual on Mutation Breeding. Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 9-21.
- CALDECOTT, R.S., E.F. FROLIK e R. MORRIS, 1952. A comparison of the effects of X-rays and thermal neutrons on dormant seeds of barley. *Proceedings of the National Academy Sciences*. Washington, 38: 804-809.
- CALDECOTT, R.S., H.H. BEARD e C.O. GARDNER, 1954. Cytogenetic effects of X-rays and thermal neutrons irradiation on seeds of barley. *Genetics*. Texas, 39(2): 240-259.
- 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.
- CHANDRARATINA, M.F., 1964. Mutations and their exploitation in breeding. In: Genetics and Breeding of Rice. London, Longmans Green and Co LTD. p. 315-327.
- CHAO, C. e S. CHAI, 1961. Cytological and genetic changes induced by X-rays and thermal neutrons in rice. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. Taiwan, 2(1): 15-24.

- EHRENBERG, L., U. LUNDQVIST e G. STROM, 1958. The mutagenic action of ethylene imine in barley. *Hereditas*. Sweden, 44: 330-336.
- EHRENBERG, L., A. GUSTAFSSON e U. LONQUIST, 1961. Viable mutants. induced in Barley ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas*. Sweden, 47: 243-282.
- EL-AISHY, S.M., S.A. ABD-ALLA e M.S. EL-KEREDY, 1976. Effects of growth substances on rice seedlings grown from seeds irradiated with gamma rays. *Environmental and Experimental Botany*. Oxford, 16: 69-75.
- 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.
- FROESE-GERTZEN, E.E., C.F. KONZAK, R.A. NILAN e R.E. HEINER, 1964. The effects of ethyl methanesulfonate on the grown response, chromosome structure and mutation rate in barley. *Radiation Botany*. New York, 45: 61-69.
- GAGER, C. e A.F. BLAKESLEE, 1927. Chromosome and gene mutations in *Datura* following exposure to radium rays. *Proceedings of the National Academy of Science*. Washington, 13: 75-79.
- GAUL, H., 1958. Present aspects of induced mutations in plant breeding. *Euphytica*. Holanda, 7: 275-289.
- GAUL, H., 1960. Critical analysis of the methods for determining the mutation frequency after seed treatment with mutagens. *Genetica Agraria* Roma, 12: 297-318.

- GAUL, H., 1961. Studies on diplontic selection after X-irradiation of barley seeds. *In: Effects of Ionizing Radiations on Seeds.* Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 117-138.
- GAUL, H., 1970. Plant injury and lethality. *In: Manual on Mutation Breeding.* Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 85-90.
- GENTER, C.F. e H.M. BROWN, 1941. X-rays studies on the field bean. *Journal of Heredity.* Washington, 32: 39-44.
- GILES JR., N.H., 1943. Comparative studies of the cytogenetical effects of neutrons and X-rays. *Genetics.* Texas, 28(5): 398-418.
- HEINER, R.E., C.F. KONZAK, R.A. NILAN e R.R. LEGAULT, 1960. Diverse ratios of mutations to chromosome aberrations in barley treated with diethyl sulfate and gamma rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* Washington, 46: 1215-1221.
- HEINER, R.E., 1963. The action of the chemical mutagen, diethyl sulfonate, on barley. Washington, Washington State University, 103 p. (Ph. D. Thesis).
- HESLOT, H., 1970. Review of main mutagenic compounds. *In: Manual on Mutation Breeding.* Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 53-62.
- ICHIJIMA, K., 1934. On the artificially induced mutations and polyploid plants of rice occurring in subsequent generations. *Proceedings of the Imperial Academy Japan.* Japan, 10: 388-391.

- KAMRA, O.P. e H. BRUNNER, 1970. Dose. In: Manual on Mutation Breeding. Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 66-69.
- KLEINHOF, A., C. SANDER, R.A. NILAN e C.F. KONZAK, 1974. Azide mutagenicity-mechanism and nature of mutants produced. In: Polyploid and Induced Mutations in Plant Breeding. Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 195-199.
- KONZAK, C.F., R.A. NILAN, R.R. LEGAULT e R.E. HEINER, 1961. Modification of induced genetic damage in seed. In: Polyploid and Induced Mutation in Plant Breeding. Vienna, International Atomic Energy Agency. p. 195-199.
- KONZAK, C.F., R.A. NILAN, J. WAGNER e R.J. FOSTER, 1964. Efficient chemical mutagenesis. *Radiation Botany*. New York, 5: 49-70 (supplement).
- LEA, D.E., 1956. *Actions of radiations on living cells*. 2^o ed. London, Cambridge University Press. 416 p.
- MATSUMURA, S., 1964. Relation between radiation effects and dose rate of X and gamma rays in cereals. *The Japanese Journal of Genetics*. Japan, 40: 1-11 (supplement).
- 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.
- MAH, 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.

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

NILAN, R.A., C.F. KONZAK, R.E. HEINER e E.E. FROESE-GERTZEN, 1964. Chemical mutagenesis in barley. *Barley Genetics I*. Wageningen, p. 35-54.

NILAN, R.A., E.G. SIDERS, A. KLEINHOF, C. SANDER e C.F. KONZAK, 1973. Azide-a potent mutagen. *Mutation Research*. Amsterdam, 17: 142-144.

NIKNJED, M., (s/d). The effect of duration and conditions of post-treatment storage on the biological damage and mutation frequency of barley treated with different concentrations of sodium azide. 86 Coll. Agric., Pahlavi Univ., Shiraz, Iran. *In: Plant Breeding Abstracts*. Cambridge, 46(6): 441 1976.

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

PEARSON, O.W., C. SANDER e R.A. NILAN, 1975. The effect of sodium azide on cell processes in the embryonic barley shoot. *Radiation Botany*. New York, 15(4): 315-322.

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

- SANDER, C. e R.A. NILAN, 1974a. Increasing the mutagenic efficiency of sodium azide in barley. *Barley Genetics Newsletter*. Pullman, 4: 63-65.
- SANDER, C. e R.A. NILAN, 1974b. Induction of chlorophyll-deficient mutations in *Steptoe* by sodium azide. *Barley Genetics Newsletter*. Pullman, 4: 55-56.
- SANDER, C. e F.J. MUEHLBAUER, 1977. Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in *Pisum*. *Environmental and Experimental Botany*. Oxford, 17: 43-47.
- SATO, H., 1966. Induction of mutations in rice by some chemicals In: Gamma Field Symposia, 5. 1966. *Mutations induced by RI and chemicals*. Ohmiya-machi, p. 71-81.
- SORIANO, J.D., 1971. The response of several rice varieties to fast neutrons. *Radiation Botany*. New York, 11: 341-346.
- SPARROW, A.H., 1961. Types of ionizing radiation and their cytogenetic effects. In: Mutation and Plant Breeding. NAS-NRC-891. p. 55-119.
- STADLER, L.J., 1928a. Genetic effects of X-rays in maize. *Proceedings of the National Academy of Science*. Washington, 14: 69-75.
- STADLER, L.J., 1928b. Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*. Washington, 68: 186-187.
- STEAGALL, M.L., 1977. Sensitividade à radiação gama de diferentes populações de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 149 p. (Dissertação de Mestrado).

WOO, S.C., C.M. NG e E.M. TYE, 1971a. Induction of mutations in cultivated rice by chemical and physical agents. I. The effects of isopropyl methanesulfonate, diethyl sulfate, and gamma radiations on seed germination and seedling height injury. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Taiwan, 12(1): 10-23.

WOO, S.C., C.M. NG e E.M. TYE, 1971b. 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.

YAMAGATA, H., 1966. Mutagenic effects of several alkylating substances in rice with reference to the method of treatment. In: Gamma Field Symposia, 5. 1966. *Mutations induced by RI chemicals*. Ohmiya-machi, p. 63-68.

YAMAGUCHI, H., 1962. The chimaeric formation in an X_1 panicle after irradiation of dormant rice seed. *Radiation Botany*. New York, 2: 71-77.

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.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Porcentagem média de sobrevivência de plântulas, tratadas com álcool etílico 96^o. Tomada 14 dias após a semeadura.

Concentração (% em volume)	Experimento 1	Experimento 2
0	94(100,00)	96(100,00)
5	90(95,75)	- : -
10	88(93,62)	- : -
12	- : -	86(89,58)
13	- : -	98(102,08)
14	- : -	94(97,92)
15	96(102,13)	92(95,83)
16	- : -	10(10,42)
17	- : -	4(4,17)
18	- : -	4(4,17)
20	6(6,38)	- : -
25	2(2,13)	- : -
30	2(2,13)	- : -

Tabela 2. Porcentagem média de sobrevivência e altura de plântulas M_1 (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, e fertilidade de plantas M_1 , nas diferentes dosagens de radiação gama.

	Dosagens (KR)				
	0	8	16	24	32
Sobrevivência	93,50(100,00)	92,50(98,93)	90,50(96,79)	84,67(90,56)	90,75(97,06)
Altura de plântulas	24,61(100,00)	21,63(87,89)	19,97(81,15)	21,19(86,10)	18,57(75,46)
Fertilidade	82,36(100,00)	63,56(77,17)	51,12(62,07)	37,09(45,03)	20,72(25,16)

Tabela 3. Porcentagem média de sobrevivência e altura de plântulas M_1 (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, e fertilidade de plantas M_1 , nas diferentes concentrações de DES

	Concentrações (M)				
	0	0,0036	0,0072	0,0145	0,0290
Sobrevivência	93,50(100,00)	89,25(94,45)	78,50(83,96)	78,25(83,69)	72,25(77,27)
Altura de plântulas	24,61(100,00)	26,07(105,93)	24,48(99,47)	22,52(91,51)	19,39(78,79)
Fertilidade	82,36(100,00)	79,65(96,71)	80,13(97,29)	77,69(94,33)	80,14(97,31)

Tabela 4. Porcentagem média de sobrevivência de plântulas M_1 , tomadas 14 dias após a semeadura, nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA (Sem pré-tratamento em água destilada).

pH	Concentração (M)				
	0	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}
3	93,50(100,00)	85,50(91,44)	85,00(90,91)	61,00(65,24)	16,50(17,65)
4	93,50(100,00)	92,50(98,93)	53,50(57,22)	91,50(97,86)	75,50(80,75)
5	93,50(100,00)	94,50(101,07)	84,50(90,37)	78,50(83,96)	37,00(39,57)
6	93,50(100,00)	95,25(101,87)	94,50(101,07)	88,50(94,65)	90,00(96,26)

Tabela 5. Porcentagem média de sobrevivência de plântulas M_1 , tomadas 14 dias após a sementeira, nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA (Com pré-tratamento em água destilada).

pH	Concentração (M)				
	0	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}
3	93,50(100,00)	68,00(72,73)	48,00(51,34)	7,00(7,49)	- : -
4	93,50(100,00)	84,00(89,84)	69,00(73,80)	31,50(33,69)	20,00(21,39)
5	93,50(100,00)	68,50(73,26)	51,50(55,08)	62,50(66,85)	35,50(37,97)
6	93,50(100,00)	93,00(99,47)	90,00(96,26)	84,50(90,37)	40,50(43,31)

Tabela 6. Altura média de plântulas M_1 (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA (Sem pré-tratamento em água destilada).

pH	Concentração (M)				
	0	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}
3	24,61(100,00)	21,62(87,75)	10,35(42,06)	6,58(26,74)	3,10(12,60)
4	24,61(100,00)	25,40(103,21)	15,75(64,00)	15,67(63,67)	10,24(41,61)
5	24,61(100,00)	21,55(87,57)	19,10(77,61)	14,48(58,84)	7,57(30,76)
6	24,61(100,00)	23,58(95,81)	23,54(95,65)	23,33(94,80)	13,58(55,18)

Tabela 7: Altura média de plântulas M_1 (em cm), tomadas 14 dias após a semeadura, nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA (Com pré-tratamento em água destilada).

pH	Concentração (M)				
	0	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}
3	24,61(100,00)	21,77(88,46)	3,84(15,60)	1,28(5,20)	- : -
4	24,61(100,00)	23,93(97,24)	9,72(39,50)	3,83(15,65)	3,40(13,81)
5	24,61(100,00)	24,28(98,66)	12,59(51,16)	9,92(40,31)	5,11(20,76)
6	24,61(100,00)	27,98(113,69)	25,47(103,49)	21,34(86,71)	9,40(38,20)

Tabela 8. Análise de variância de altura de plântulas M_1 , tratadas com SA, sem pré-tratamento das sementes em água destilada.

Fonte de Variação	GL	QM	F
Entre	15		
pH	3	77,6443	593,7108 **
Concentração	3	140,8684	1077,1569 **
pH x Concentração	9	8,2592	63,1544 **
Dentro	1517	0,1308	
Total	1532		

Tabela 9. Análise de variância de altura de plântulas M_1 , tratadas com SA, com pré-tratamento das sementes em água destilada.

Fonte de Variação	GL	QM	F
Entre	15		
pH	3	155,5622	863,7546 **
concentração	3	297,1052	1649,6680 **
pH x concentração	9	12,6897	70,4592 **
Dentro	1249	0,1801	
Total	1264		

** significância ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 10. Fertilidade média de plantas M_1 , nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico, SA, (Sem pré-tratamento em água destilada).

pH	Concentração (M)				
	0	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}
3	82,46(100,00)	71,68(86,93)	39,75(48,21)	33,08(40,12)	59,28(71,89)
4	82,46(100,00)	76,35(92,59)	35,75(43,35)	27,47(33,31)	37,53(45,51)
5	82,46(100,00)	52,76(63,98)	41,72(50,59)	27,00(32,74)	30,55(37,05)
6	82,46(100,00)	54,64(66,26)	58,88(71,40)	58,51(70,96)	41,52(50,35)

Tabela 11. Fertilidade média de plantas M_1 , nas diferentes concentrações e pHs do mutagênico SA. (Com pré-tratamento em água destilada).

pH.	Concentração (M)				
	0	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-2}
3	82,46(100,00)	79,27(96,13)	49,11(59,57)	8,44(10,23)	- : -
4	82,46(100,00)	73,78(89,47)	25,09(30,43)	12,62(15,30)	- : -
5	82,46(100,00)	45,80(55,54)	40,56(49,19)	19,72(23,91)	5,84(7,08)
6	82,46(100,00)	73,96(89,69)	80,50(97,62)	66,52(80,67)	27,41(33,24)

Tabela 12. Fertilidade média de plantas M_1 e frequência de mutação de clorofila (baseada no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para neutrons térmicos e rápidos.

Tratamentos	Fertilidade	Nº panículas		Nº plântulas		Nº mutações por		Nº mutantes por	
		M ₁		M ₂		100 panículas M ₁		100 plântulas M ₂	
Neutrons térmicos (x 10 ¹³ Nth/cm ²)									
1,97	58,95(71,58)	232		15.596		8,62		0,94	
3,94	30,90(37,52)	185		8.979		36,76		0,78	
5,91	10,63(12,91)	172		4.361		2,23		0,27	
Neutrons rápidos (Krad)									
2	47,39(57,54)	206		10.840		0,38		0,98	
3	23,75(28,84)	199		7.889		5,53		0,38	
Controle	82,36(100,00)	150		16.302		0,00		0,00	

Tabela 13. Frequência de mutação de clorofila (baseada no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para a radiação gama e o DES.

Tratamentos	Nº panículas		Nº plântulas		Nº mutações por		Nº mutantes por	
	M_1	M_2	M_1	M_2	100 panículas M_1	100 plântulas M_2	100 panículas M_1	100 plântulas M_2
Radiação Gama (KR)								
8	149	10.148			4,03	0,36		
16	123	6.171			4,07	0,37		
24	77	2.078			10,39	1,73		
32	117	3.958			7,69	0,99		
DES (M)								
0,0036	150	11.123			0,00	0,00		
0,0072	45	3.825			0,00	0,00		
0,0145	120	7.141			0,00	0,00		
0,0290	58	4.621			0,00	0,00		
Controle	150	16.302			0,00	0,00		

Tabela 14. Frequência de mutação de clorofila (baseada no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para o mutagênico SA (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada).

Tratamentos		Nº panículas		Nº plântulas	Nº mutações por		Nº mutantes por	
pH	Concentração (M)	M ₁	M ₂	M ₂	100 panículas M ₁	100 panículas M ₁	100 plântulas M ₂	
3	1 x 10 ⁻³	91	7.231	7.231	5,49	5,49	0,11	
3	5 x 10 ⁻³	57	1.994	1.994	36,84	36,84	4,36	
3	1 x 10 ⁻²	12	795	795	0,00	0,00	0,00	
3	5 x 10 ⁻²	78	5.000	5.000	0,00	0,00	0,00	
4	1 x 10 ⁻³	106	7.442	7.442	6,60	6,60	0,42	
4	5 x 10 ⁻³	43	3.133	3.133	18,60	18,60	0,41	
4	1 x 10 ⁻²	11	170	170	18,18	18,18	5,29	
4	5 x 10 ⁻²	27	635	635	40,74	40,74	3,47	
5	1 x 10 ⁻³	115	7.761	7.761	3,48	3,48	0,37	
5	5 x 10 ⁻³	120	8.221	8.221	14,17	14,17	1,09	
5	1 x 10 ⁻²	98	4.536	4.536	38,77	38,77	4,19	
5	5 x 10 ⁻²	83	2.438	2.438	37,35	37,35	5,37	
6	1 x 10 ⁻³	124	7.992	7.992	0,00	0,00	0,00	
6	5 x 10 ⁻³	51	3.457	3.457	0,00	0,00	0,00	
6	1 x 10 ⁻²	115	7.437	7.437	20,91	20,91	2,07	
6	5 x 10 ⁻²	110	5.278	5.278	14,78	14,78	1,02	
Controle		150	16.302	16.302	0,00	0,00	0,00	

Tabela 15. Frequência de mutação de clorofila (baseada no total de panículas M_1 e plântulas M_2), para o mutagênico SA (Com pré-tratamento das sementes em água destilada).

Tratamentos		Nº panículas M_1	Nº plântulas M_2	Nº mutações por 100 panículas M_1	Nº mutantes por 100 plântulas M_2
PH	Concentração (M)				
3	1×10^{-3}	113	7.105	1,77	0,27
3	5×10^{-3}	88	2.688	35,23	8,30
3	1×10^{-2}	6	55	16,67	7,27
3	5×10^{-2}	- : -	- : -	- : -	- : -
4	1×10^{-3}	139	7.388	2,16	0,46
4	5×10^{-3}	107	2.231	39,25	9,77
4	1×10^{-2}	40	703	35,00	10,67
4	5×10^{-2}	- : -	- : -	- : -	- : -
5	1×10^{-3}	122	4.491	1,64	0,25
5	5×10^{-3}	140	3.789	17,86	2,51
5	1×10^{-2}	62	1.402	38,71	3,85
5	5×10^{-2}	13	79	0,00	0,00
6	1×10^{-3}	97	7.254	8,25	0,50
6	5×10^{-3}	96	8.765	9,37	0,52
6	1×10^{-2}	37	2.264	13,51	1,41
6	5×10^{-2}	44	738	34,09	4,34
controle		150	16.302	0,00	0,00

Tabela 16. Significância dos qui-quadrados entre todas as concentrações de SA, sem e com pré-tratamento em água destilada, tomadas duas a duas. Aplicou-se o "Teste de Independência" aos valores de frequência de mutação de clorofila.

pH	3				4				5				6			
	Concentração				Concentração				Concentração				Concentração			
sem pré-tratamento	0	***	***	-	-	***	***	***	***	***	***	***	-	-	***	***
	1	-	***	NS	*	-	NS	***	***	-	***	***	-	-	***	***
	2	-	-	***	***	-	-	***	***	-	-	***	***	-	***	***
	3	-	-	-	-	-	-	NS	NS	-	-	*	-	-	-	***
com pré-tratamento	0	***	***	***	-	***	***	***	-	***	***	***	-	***	***	***
	1	-	***	***	-	-	***	***	-	-	***	***	NS	-	NS	***
	2	-	-	NS	-	-	-	NS	NS	-	-	*	NS	-	***	***
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	-	-	***

concentração 0 = material não tratado com mutagênico *** significância ao nível de 1^o/oo de probabilidade

1 = 1 x 10⁻³ M

2 = 5 x 10⁻³ M

3 = 1 x 10⁻² M

4 = 5 x 10⁻² M

** significância ao nível de 1% de probabilidade

* significância ao nível de 5% de probabilidade

NS não significância

Tabela 17. Significância dos qui-quadrados entre todos os pHs das soluções tampão de SA, sem e com pré-tratamento em água destilada, tomados dois a dois. Aplicou-se o "Teste de Independência" aos valores de frequência de mutação de clorofila.

Concentração	1					2					3					4				
	3	4	5	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4	5
sem pré-tratamento	4 ***	-	-	***	-	***	-	-	***	-	-	***	-	-	***	-	-	***	-	-
	5 **	NS	-	***	***	-	***	NS	***	NS	-	***	***	*	***	*	-	***	*	-
	6 **	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	***	*	***	*	***	***	*	***
com pré-tratamento	4 NS	-	-	NS	-	NS	-	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5 NS	NS	-	***	***	***	***	NS	***	***	-	NS	***	-	-	-	-	-	-	-
	6 *	NS	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	-	-	NS	-	-	NS

Concentração

*** significância ao nível de 1°/oo de probabilidade

** significância ao nível de 1% de probabilidade

* significância ao nível de 5% de probabilidade

NS não significância

1 = 1×10^{-3} M

2 = 5×10^{-3} M

3 = 1×10^{-2} M

4 = 5×10^{-2} M

Tabela 18. Porcentagem média das classes de mutações para todos os agentes mutagênicos empregados. (Todas as dosagens e concentrações foram englobados para cada mutagênico).

Tratamentos	Classes de Mutações (%)			
	<i>albina</i>	<i>xantha</i>	<i>viridis</i>	"outras"
Radiação Gama	78,57	10,71	10,17	0,00
Neutrons Térmicos	66,67	0,00	4,17	29,17
Neutrons Rápidos	100,00	0,00	0,00	0,00
Azida Sódica	58,79	23,35	12,36	5,50

Tabela 19. Valores de LD_{50} e GR_{50} , estimados a partir das dosagens e concentrações usadas, de radiação gama, DES e SA.

Tratamentos	LD_{50}	GR_{50}
Radiação Gama (KR)	>32	>32
DES (M)	>0,0290	>0,0290
SA (M) (sem pré-tratamento)		
pH = 3,0	1×10^{-2} a 3×10^{-2}	5×10^{-3} a 7×10^{-3}
pH = 4,0	$>5 \times 10^{-2}$	2×10^{-2} a 4×10^{-2}
pH = 5,0	3×10^{-2} a 5×10^{-2}	1×10^{-2} a 3×10^{-2}
pH = 6,0	$>5 \times 10^{-2}$	$>5 \times 10^{-2}$
SA (M) (com pré-tratamento)		
pH = 3,0	5×10^{-3} a 7×10^{-3}	2×10^{-3} a 4×10^{-3}
pH = 4,0	1×10^{-2} a 3×10^{-2}	3×10^{-3} a 5×10^{-3}
pH = 5,0	2×10^{-2} a 4×10^{-2}	5×10^{-3} a 7×10^{-3}
pH = 6,0	3×10^{-2} a 5×10^{-2}	3×10^{-2} a 5×10^{-2}

Figura 1. Curvas de sobrevivência de plântulas tratadas com álcool etílico 96^o.

Figura 2. Curvas de sobrevivência e altura de plântulas M_1 , e fertilidade de plantas M_1 , tratadas com radiação gama.

Figura 3. Curvas de sobrevivência e altura de plântulas M_1 , e fertilidade de plantas M_1 , tratadas com o mutagênico químico DES.

Figura 4. Curvas de sobrevivência de plântulas M_1 , tratadas com o mutagênico químico SA, a diferentes pHs da solução tampão. (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada)

Figura 5. Curvas de sobrevivência de plântulas M_1 , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Com pré-tratamento das sementes por oito horas em água destilada).

Figura 6. Curvas de altura de plântulas M_1 , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada).

Figura 7. Curvas de altura de plântulas M_1 , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Com pré-tratamento das sementes por oito horas em água destilada).

Figura 8. Curvas de fertilidade de plantas M_1 , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Sem pré-tratamento das sementes em água destilada).

Figura 9. Curvas de fertilidade de plantas M_1 , tratadas com SA, a diferentes pHs da solução tampão (Com pré-tratamento das sementes por oito horas de água destilada).