TRATAMENTO DE SEMENTES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) COM AZIDA SÓDICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AMBIENTE.

PIERRE-GARDY PHAREL
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Akihiko Ando

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Pharel, Pierre-Gardý

P536t Tratamento de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.)
com azida sódica em diferentes condições de ambiente.
Piracicaba, 1994.
117p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Arroz - Semente - Tratamento ácido 2. Azida sódica 3. Radiação gama em arroz I. Escola Superior de
Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.18
633.521

TRATAMENTO DE SEMENTES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) COM AZIDA SÓDICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AMBIENTE

PIERRE-GARDY PHAREL

Aprovada em: 26/09/94

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Akihiko Ando

ESALQ/USP

Prof. Dr. Geraldo José Aparecido Dario

ESALQ/USP

Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

CENA/USP

Prof. Dr. Akihiko Ando

Orientador

A minha mãe,

M^{me} Germaine Verina PHAREL,

a minha filha,

Soraya Thais PHAREL,

a minha espôsa,

M^{me} Marie Margareth PHAREL,

dedico.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr Akihiko Ando, pela orientação, colaboração, compreensão e estímulo desde sua escolha como meu orientador,

Ao Prof. Dr. Gerhard Bandel, um dos raros Professores extremamente dedicados,

Ao Prof. Giancarlo Conde Xavier Oliveira, um dos meus amigos mais sinceros durante meus 30 meses no Brasil,

Aos Profs. do Centro de Informática na Agricultura (CIAGRI), Marcelo Oliveira e Carlos Fernando Sanches pela ajuda no momento da edição das análises estatísticas,

Ao Setor de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba, pela colaboração na instalação e condução dos experimentos,

Ao Serviço Social e do Centro de Saúde do Campus da USP pela assistência nos momentos cruciais para cuidar dos meus problemas de saúde,

Ao Conselho de Pós-graduação do Departamento da Genética pelo constante apoio e estímulo para a conclusão do Curso de mestrado,

A todos que, de uma certa maneira, contribuíram para minha formação como Pós-Graduando, eu agradeço de coração.

P.G.P.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS.....	i
ÍNDICE.....	iii
SIGLAS.....	vi
LISTA DAS TABELAS.....	vii
LISTA FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
RÉSUMÉ.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Fatores afetando a ação de mutagênicos químicos em sistemas biológicos.....	4
2.1.1 Temperatura.....	4
2.1.2 Concentração do mutagênico e volume de solvente.....	4
2.1.3 Tempo de tratamento.....	5
2.1.4 Acidez da solução mutagênica.....	5
2.2 Curva dose-efeito.....	6
2.3 Eficiência biológica relativa.....	6
2.4 Sensitividade de sementes tratadas por azida sódica ou irradiadas por raios gama.....	7
2.5 Uso da azida sódica nas pesquisas biológicas.....	14

3. MATERIAIS.....	21
3.1 Sementes.....	21
3.2 Solução tampão.....	21
4. MÉTODOS.....	22
4.1 Estimativa do conteúdo de água das sementes.....	22
4.2 Seleção de sementes.....	22
4.3 Preparo das soluções de tratamento.....	23
4.4 Tratamentos.....	27
4.4.1 Tratamentos químicos.....	27
4.4.2 Irradiação.....	28
4.5 Semeadura e observações.....	28
4.6 Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Emergência.....	32
5.1.1 Tratamentos com azida sódica.....	32
5.1.2 Tratamentos com irradiação.....	33
5.1.3 Resultados globais sobre emergência de plântulas.....	34
5.2 Altura de plântulas.....	35
5.2.1 Tratamentos com azida sódica.....	35
5.2.2 Tratamentos com irradiação.....	36
5.2.3 Resultados globais sobre altura de plântulas.....	37
5.3 Sobrevivência	37
5.3.1 Tratamentos com azida sódica.....	37
5.3.2 Tratamentos com irradiação.....	38
5.3.3 Resultados globais sobre sobrevivência de plântulas.....	39

6.DISSCUSSÃO.....	41...
6.1 Tratamento com azida sódica.....	41
6.1.1 Efeito da dose de tratamento.....	41
6.1.2 Efeito do pH da solução de tratamento.....	43
6.1.3 Tempo de tratamento.....	44
6.1.4 Temperatura de tratamento.....	45
6.2 Irradiação.....	45
6.3 Dependência entre os fatores.....	47
6.4 Comparação entre tratamentos com azida sódica e raios gama.....	49
6.5 Recomendação e sugestão.....	51
7. CONCLUSÃO.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
TABELAS.....	62
FIGURAS.....	91

SIGLAS

SA : azida sódica

Exp.1: experimento 1

Exp.2: experimento 2

Exp.3: experimento 3

Exp.4: experimento 4

Exp.5: experimento 5

Exp.6: experimento 6

Exp.7: experimento 7

LD₅₀ : dose que causa 50% de letalidade das sementes em relação à testemunha
(do inglês: lethal dose).

GR₅₀ : dose que causa redução de 50% da altura das plântulas em relação à
testemunha. (do inglês: growth reduction).

CTRL: controle

▲ = dms= diferença mínima significativa

No.: número

LISTA DAS TABELAS

Tabelas	Página
1. Soluções de reagentes gerais especiais.....	24
2. Solução tampão de McIlvaine (fosfato dissódico ácido cítrico) e de Sørensen (glicocol - hidróxido de sódio).....	25
3. Condições de tratamento com SA.....	29
4. Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.1 em relação ao CTRL considerado como 100%..	63
5. Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.2 em relação ao CTRL considerado como 100% .	64
6. Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.3 em relação ao CTRL considerado como 100% .	65
7. Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.4 em relação ao CTRL considerado como 100% .	66
8. Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.5 em relação ao CTRL cosiderado como 100% ..	67
9. Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.6 em relação ao CTRL considerado como 100% .	68
10. Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.7 em relação ao CTRL considerado como 100% .	69

11. Análise da variância de emergência de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração: $1 \times 10^{-3} \text{M}$) e teste de Tukey para médias dos fatores tempo, temperatura e pH.....	70
12. Análise da variância de emergência de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração: $5 \times 10^{-3} \text{M}$) e teste de Tukey para médias dos fatores tempo, temperatura e pH.....	72
13. Análise da variância de emergência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama e teste de Tukey para médias de tratamento.....	74
14. Análise da variância de altura de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração: $1 \times 10^{-3} \text{M}$) e teste de Tukey para médias dos fatores tempo, temperatura e pH.....	75
15. Análise da variância de altura de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração: $5 \times 10^{-3} \text{M}$) e teste de Tukey para médias dos fatores tempo, temperatura e pH.....	77
16. Análise da variância de altura de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama e teste de Tukey para médias de tratamento.....	79
17. Análise da variância do número de plântulas sobreviventes originadas de sementes tratadas com SA (concentração: $1 \times 10^{-3} \text{M}$) e teste de Tukey para médias dos fatores tempo, temperatura e pH.....	80
18. Análise da variância do número de plântulas sobreviventes originadas de sementes tratadas com SA (concentração: $5 \times 10^{-3} \text{M}$) e teste de Tukey para médias dos fatores tempo, temperatura e pH.....	82
19. Análise de variância do número de plântulas sobreviventes originadas de	

sementes irradiadas com raios gama e	
teste de Tukey para médias de tratamento.....	84
20. Redução média de altura de plântulas no caso dos experimentos com SA em 3	
temperaturas. Valores de GR(%).....	85
21. Dose letal no caso dos experimentos com SA. Valores de LD (%).....	85
22. Redução média de altura de plântulas (GR%) e dose letal (LD) no caso dos	
experimentos com raios gama.....	85
23. Porcentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes, e altura	
média dessas plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 4, 8 e 12 horas	
em relação ao CTRL considerado como 100%	86
24. Médias obtidas para cada dose e efeito em função do tempo de	
tratamento.....	86
25. Valores e nível de significância de t experimental.....	87
26. Análise de regressão linear entre emergência (x) e altura de plântulas	
(y) independentemente do tempo de tratamento (concentração: $1 \times 10^{-3} \text{M}$)....	87
27. Análise de regressão linear entre emergência (x) e altura de plântulas	
(y) independente do tempo de tratamento (concentração: $5 \times 10^{-3} \text{M}$).....	88
28. Análise de regressão linear entre emergência (x) e sobrevivência (y)	
de plântulas independentemente do tempo de tratamento (concentra-	
ção: $5 \times 10^{-3} \text{M}$).....	88
29. Análise de regressão linear entre altura de plântulas (x) e o número de sobrevi-	
ventes (y) independentemente do tempo de tratamento (concentra-	
ção: $5 \times 10^{-3} \text{M}$).....	89
30. Análise de regressão linear entre emergência (x) e altura de plântulas (y) originadas	
de sementes irradiadas com raios gama.....	89

31. Análise de regressão linear entre emergência (x) e sobrevivência de
plântulas originadas de sementes (y) irradiadas com raios
gama.....90
32. Análise de regressão linear entre altura (x) e sobrevivência (y) de
plântulas originadas de sementes irradiadas com raios
gama..... 90

LISTA DAS FIGURAS

Figuras	Página
1. Modelo de curva ilustrando o efeito de dose crescente sobre danos fisiológicos.....	92
2. Emergência das sementes nas condições do Exp.1, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	93
3. Emergência das sementes nas condições do Exp.2, em relação ao CTRL cosiderado como 100%.....	94
4. Emergência das sementes nas condições do Exp.4, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	95
5. Emergência das sementes nas condições do Exp.5, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	96
6. Emergência das sementes nas condições do Exp.6, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	97
7. Emergência, sobrevivência e altura de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama em relação ao CTRL considerado como 100%...	98
8. Altura de plântulas nas condições do Exp.1, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	99
9. Altura de plântulas nas condições do Exp.2, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	100
10. Altura de plântulas nas condições do Exp.4, em relação ao CTRL	

considerado como 100%.....	101
11. Altura de plântulas nas condições do Exp.5, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	102
12. Altura de plântulas nas condições do Exp.6, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	103
13. Sobrevivência de plântulas nas condições Exp.4, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	104
14. Sobrevivência de plântulas nas condições do Exp.5, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	105
15. Sobrevivência de plântulas nas condições do Exp.6, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	106
16. Porcentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes e, altura média de plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 4 horas....	107
17. Porcentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes, e altura média de plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 8 horas	108
18. Porcentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes, e altura média de plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 12 horas, em relação ao CTRL considerado como 100%.....	109
19. Regressão e correlação entre emergência e altura de plântulas originadas de de sementes tratadas com SA (dose: $1 \times 10^{-3} \text{M}$).....	110
20. Regressão e correlação entre emergência e altura de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (dose: $5 \times 10^{-3} \text{M}$).....	111
21. Regressão e correlação entre emergência e sobrevivência de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (dose: $5 \times 10^{-3} \text{M}$).....	112
22. Regressão e correlação entre altura e sobrevivência de plântulas	

originadas de sementes tratadas com SA (dose: $5 \times 10^{-3}M$).....	113
23. Regressão e correlação entre altura de plântulas e doses de raios gama (KR) após a irradiação das sementes.....	114
24. Regressão e correlação entre emergência e altura de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama.....	115
25. Regressão e correlação entre emergência e sobrevivência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama.....	116
26. Regressão e correlação entre altura e sobrevivência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama.....	117

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.) COM AZIDA
SÓDICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AMBIENTE**

Autor: PIERRE-GARDY PHAREL

ORIENTADOR: PROF. DR. AKIHIKO ANDO

RESUMO

O presente trabalho foi realizado para obter informações sobre a metodologia de tratamento de sementes de arroz com azida sódica (NaN_3), um dos mutagênicos químicos mais potentes e eficientes já conhecidos, em combinação com os seguintes fatores:

- pH da solução tampão,
- temperatura durante o tratamento mutagênico,
- concentração da solução mutagênica,
- tempo de tratamento mutagênico.

Para tanto, foram escolhidos cinco níveis de acidez para a solução tampão: pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 e 11.0, três temperaturas para o tratamento com o mutagênico: 20, 24 e 28 °C, duas concentrações da azida sódica: 1×10^{-3} e 5×10^{-3} M, e três tempos de tratamento com o mutagênico: 4, 8 e 12 horas. Foram semeadas as sementes segundo um delineamento em blocos casualizados com 3 repetições e 16 tratamentos cada, inclusive a

testemunha.

Por outro lado, uma amostra de sementes do mesmo estoque foi irradiada com radiação gama da fonte de ^{60}Co , usando as dosagens de 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 KR a fim de compará-las com os tratamentos de SA. Dados para emergência, altura de plântulas e sobrevivência foram anotados respectivamente 10, 15 e 30 dias após semeadura.

Os fatores "tempo, temperatura e pH" foram testados segundo um esquema fatorial $3 \times 3 \times 5$, o fator "concentração" pelo teste de "t" e o experimento com sementes irradiadas pelo método dos polinômios ortogonais.

Tanto a emergência como a sobrevivência de plântulas diminuíram com o aumento do tempo de tratamento de 4, 8 a 12 horas e da concentração de SA de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ a $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, o que causou um retardamento ao nível do poder germinativo das sementes. Em consequência disso, observou-se em vários casos que a porcentagem de plântulas sobreviventes foi mais elevada do que a emergência.

A altura das plântulas, qualquer que fosse o tipo de mutagênico usado, SA ou raios gama, diminuiu com o aumento das dosagens e também, no caso dos tratamentos com SA, com o aumento do tempo de tratamento. Calculou-se os valores de LD e de GR para cada mutagênico.

Palavras-chaves:

azida sódica, raios gama, sementes de arroz.

**TREATMENT OF RICE (*Oryza sativa* L.)
SEEDS WITH SODIUM AZIDE IN DIFFERENT CONDITIONS OF
ENVIRONMENT**

Author: PIERRE-GARDY PHAREL

Adviser: PROF. DR. AKIHIKO ANDO

SUMMARY

The present work was carried out to obtain informations on the methodology of rice seed treatment with sodium azide (NaN_3), one of the most potent and efficient chemical mutagens already known, combining the following factors:

- pH of the buffer solution,
- temperature during the mutagen treatment,
- concentration of the mutagen solution,
- time of the mutagen treatment.

For buffer solution, five levels of acidity were choosen: pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 and 11.0; three temperatures of treatment: 20, 24 and 28 °C; two concentrations of sodium azide: 1×10^{-3} and 5×10^{-3} M; three times of treatment: 4, 8 and 12 hours. The sowing was made according to factorial design in block at random with three repetitions and 16 treatments everyone, the check included.

On the other hand, a sample of seed of the same stock was irradiated with the following doses of gamma rays from ^{60}Co source: 0, 8, 16, 24, 32, 40 and 48 KR in order

to compare the effects obtained with those of SA treatments. Data for the emergence, seedling height and survival were collected 10, 15 and 30 days respectively after sowing.

The factors "time, temperature and pH" were evaluated by factorial design 3x3x5, the factor "concentration" by the "t" test and the experiment with irradiated seeds by the orthogonal polynomial procedure.

The emergence as well as the survival decreased with the increase of treatment duration from 4, 8 to 12 hours and SA concentration from 1×10^{-3} M to 5×10^{-3} M, which originated a delay on a level of seed germinating capacity. As a result, it was observed in various cases that the percentage of survived seedling was higher than the emergence.

The seedling height, whatever the type of mutagen used, decreased with the increase of the doses and also, in the case of SA treatments, with the increase of treatment time. The LD and GR values were calculated for each mutagen.

Key-words:

sodium azide, gamma ray, rice seeds.

**TRAITEMENT DE SEMENCES DU RIZ (*Oryza sativa* L.)
AVEC AZIDE DE SODIUM DANS DIFFERENTES
CONDITIONS D'ENVIRONNEMENT**

Auteur: PIERRE-GARDY PHAREL

Conseiller: AKIHIKO ANDO

RÉSUMÉ

Le présent travail a été réalisé pour obtenir des informations sur la méthodologie de traitement de semences du riz avec azide de sodium (NaN_3), un des mutagènes chimiques les plus puissants et efficaces déjà connus, en combinant les facteurs suivants:

- pH de la solution tampon,
- température durant le traitement mutagénique,
- concentration de la solution mutagénique,
- durée de traitement mutagénique.

Pour ce faire, il a été choisi cinq niveaux d'acidité de la solution tampon: pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 et 11.0, trois températures de traitement mutagénique: 20, 24 et 28 °C, deux concentrations d'azide de sodium: 1×10^{-3} et 5×10^{-3} M, et trois intervalles de traitement mutagénique: 4, 8 et 12 heures. Le semis a été réalisé en bloc au hasard avec trois répétitions et 16 traitements, y compris le témoin.

Par ailleurs, un échantillon de semences du même stock a été irradié avec rayon gamma de la source ^{60}Co , en utilisant les doses de 0, 8, 16, 24, 32, 40 et 48 KR afin de les comparer avec les traitements de SA. Des données pour l'émégence, hauteur de plante et survivance ont été prélevées respectivement 10, 15 et 30 jours après le semis.

Les facteurs "temps, température et pH" ont été évalués selon un dispositif factoriel $3 \times 3 \times 5$, le facteur "concentration" par le test de "t" et l'expérience dont les semences furent irradiées, par la méthode des polinômes orthogonaux.

L'émérgence autant que la survivance ont diminué avec l'augmentation du temps de traitement de 4, 8 à 12 heures et de la concentration de SA de 1×10^{-3} M à 5×10^{-3} M, ce qui a induit un retard au niveau du pouvoir germinatif des semences. En conséquence, on a observé dans plusieurs cas que le pourcentage de plantules survivantes était plus élevé qu'à l'émérgence.

La hauteur des plantules, quel que soit le type de mutagène utilisé, SA ou rayons gamma, a diminué avec l'augmentation des doses et aussi, dans le cas des traitements avec SA, avec l'augmentation du temps de traitement. On a calculé les valeurs de LD et de GR pour chaque mutagène.

Mots-clés:

Azide de sodium, rayon gamma, semences de riz.

1. INTRODUÇÃO.

Desde a descoberta da mutagenicidade potencialmente alta da azida sódica (SA) por SPENCE (1965) em sementes de cevada (*Hordeum* sp), vários pesquisadores têm-se interessado em determinar mais profundamente o mecanismo de ação desse mutagênico. Assim, no mesmo ano, KONZAK (1965) e colaboradores já achavam que a SA seria o mutagênico mais eficiente de todos aqueles até então testados para a indução de mutação em cevada. As observações começaram a se tornar evidentes quando SIDERIS (1968) e SIDERIS et alii (1969) reconheceram o efeito inibitório da SA sobre o desenvolvimento da leguminosa predominantemente em solução ácida, o que foi claramente confirmado por NILAN et alii (1973).

Em outros cultivos tais como amendoim (LEVY & ASHRI, 1973), ervilha (SANDER & MUEHLBAUER, 1976), aveia (FAY & GORECKI, 1978) e arroz (MUSTAFA, 1976; SARMA et alii, 1978; AWAN et alii, 1980), foram encontrados resultados similares aos obtidos para a eficiência mutagênica da SA em cevada. Como inibidor respiratório, o uso da SA nos materiais biológicos ofereceu algumas vantagens em termos da sua ação fisiológica menos drástica do que as outras substâncias alquilantes que formam o grupo mais importante e mais usado dos mutagênicos químicos para a indução de mutação em plantas cultivadas. Consequentemente, espera-se obter dos materiais tratados maior número de sobreviventes e portanto maior número de descendentes nas gerações posteriores.

O interesse para a utilização da SA se torna cada vez maior pelo fato da sua grande solubilidade em água mesmo na forma de pó juntamente com sua baixa toxicidade e baixa reatividade com as outras substâncias tanto intra como extracelulares, o que facilita muito o manejo e o preparo das soluções de tratamento. Além disso, o custo muito baixo da droga possibilitará os trabalhos de indução de mutação em lugares de baixa tecnologia e onde os recursos são limitados. No entanto, numerosos pesquisadores (CLARK, 1958; MULLER, 1966; SOBELS, 1954-1955) falham em provarem a efetividade mutagênica da SA por usarem tratamentos inadequados nos seus trabalhos. Visto que a ação dos mutagênicos químicos nos materiais biológicos é físico-química, é importante para quem pretende usá-los dominar o emprego de fatores ambientais tais como temperatura e tempo de tratamento, tomando também cuidado com a concentração do mutagênico e o pH da solução tampão.

Nesse sentido, GUIMARÃES (1978) observou desde a geração M1 danos fisiológicos tão intensos que o número de plântulas de arroz sobreviventes caiu a zero por usar um nível bastante acentuado de acidez (pH 3.0) e uma alta concentração de SA (5×10^{-2} M). Também a germinação de sementes de cevada observada 7 dias após semeadura foi completamente inibida em tratamentos com 10^{-1} M e 10^{-2} M de SA durante 6 e 18 horas respectivamente (HASEGAWA & INOUE, 1980a) enquanto NILAN et alii (1973) e Nilan et alii (1976) obtiveram níveis baixos de danos fisiológicos por tratarem as sementes de cevada com 10^{-3} M de SA em solução ácida de pH 3.0.

Parece então que a falta de mutagenicidade da SA, em certos casos, seja devida a tratamentos inadequados. De fato, os experimentos de indução de mutação, para atingir sua maior eficácia, não exigem só a escolha de um mutagênico cujas características convém ao material biológico mas também a aplicação de um método de tratamento apropriado. O presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

1. Analisar os efeitos fisiológicos da SA em termos de emergência, altura de plântulas e sobreviventes na geração M1 de sementes de arroz da cultivar IAC-25 tratadas em diversas condições de tratamento.
2. Determinar os níveis de dependência entre esses efeitos.
3. Definir em cada caso, a LD_{50} e a GR_{50} para cada mutagênico.
4. Comparar os resultados com aqueles obtidos por irradiação das sementes com radiação gama.
5. Estabelecer a metodologia adequada de tratamento de sementes de arroz com SA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FATORES AFETANDO A AÇÃO DE MUTAGÊNICOS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.

2.1.1 Temperatura.

A taxa de difusão da solução mutagênica no tecido pode ser afetada pela temperatura (KONZAK, 1964). A temperatura age principalmente sobre a meia-vida de um produto químico que é reativo com a planta. A meia-vida de um mutagênico químico é definida pelo tempo após o qual a metade da concentração inicial do mutagênico tem reagido (FEHR, 1987).

2.1.2 Concentração do mutagênico e volume de solvente.

Altas concentrações de mutagênico tendem a causar relativamente maiores danos (HEINER, 1963; KONZAK et alii, 1964). A concentração de mutagênico químico no solvente determina sua taxa de difusão através da membrana celular. Quanto maior a concentração do mutagênico em solvente, maior difusão deste no interior da célula. A taxa de difusão interna do mutagênico decrescerá enquanto o equilíbrio está aproximando.

Baixa concentração de mutagênico mostra maior eficiência pelo fato de que injúria, letalidade e esterilidade aumentam com a concentração de mutagênico a taxas mais rápidas do que mutações. Foram encontradas relações similares para doses de radiação. Assim, tratamentos com baixas concentrações durante longo período de tempo (12-24 h) e a baixas temperaturas têm produzido altas frequências de mutação com taxas elevadas de plantas sobreviventes M1 (KONZAK et alii, 1965). Um tratamento exercendo 30-40% de redução de crescimento é geralmente realizado para obter um rendimento ótimo de mutação em cereais (KAMRA & BRUNNER, 1970).

O volume da solução de tratamento também pode desempenhar um papel importante. Em cereais, um volume determinado de solução mutagênica ($\frac{1}{2}$ - 1 ml) por semente têm sido usado para fornecer a cada semente a oportunidade de absorver o mesmo número de moles de mutagênico (KONZAK et alii, 1964). Para assegurar uma concentração uniforme por toda parte do tratamento, a solução com as sementes deveria ser moderadamente agitada. A concentração adequada deve ser determinada por experimentação. Para tratamento de sementes, é geralmente utilizada uma concentração na qual 50% das plântulas M1 morrem, sendo designada LD₅₀ (FEHR, 1987).

2.1.3 Tempo de tratamento.

A duração de tratamento deve ser suficientemente longa para permitir hidratação e infusão completa dos tecidos tratados pelo mutagênico. Porém, esse intervalo de tempo pode ser consideravelmente encurtado quando usa-se sementes pré-embebidas.

2.1.4 Acidez da solução mutagênica.

Para a eficiência mutagênica de alguns mutagênicos químicos, o pH tem papel importante. Neste caso, esse fator deve ser ajustado antes e após o tratamento. Se tampões são usados para fazer a solução de tratamento, os de fosfato são recomendados e não devem ultrapassar a concentração de 0.1 M para evitar injúrias às sementes.

2.2 CURVA DOSE-EFEITO.

GAUL (1963) indicou o modelo de curva capaz de ilustrar o efeito de doses crescentes de mutagênico com relação aos danos fisiológicos observados sobre plântulas M1 de cevada. Trata-se de uma curva sigmoide obtida para os valores médios de altura de planta ou comprimento de raiz ou de sobrevivência. Essa curva é a resposta característica às doses de qualquer mutagênico físico ou químico e para qualquer espécie vegetal (fig. 1).

2.3 EFICIÊNCIA BIOLÓGICA RELATIVA.

Eficiência biológica relativa é, conceitualmente, a razão entre duas doses absorvidas por um mesmo tecido para produzirem efeitos iguais. Geralmente, radiação de menor eficiência como raios-x ou raios gama é tomada como padrão.

A eficiência biológica relativa ou RBE varia com o sistema biológico usado e o nível de danos registrados neste sistema. Para medir a RBE de uma determinada radiação, o primeiro passo é de escolher um sistema biológico no qual o efeito de radiação pode ser registrado quantitativamente. A RBE é uma quantidade muito complexa (I.A.E.A., 1968), dependendo de:

- qualidade de radiação,
- dose de radiação,
- número de frações de doses,
- taxa de dose,
- sistema ou material biológico,
- fatores ambientais.

2.4 SENSITIVIDADE DE SEMENTES TRATADAS POR AZIDA SÓDICA OU IRRADIADAS POR RAIOS GAMA.

Em um ensaio de sensibilidade a raios gama e azida sódica (SA) para a escolha de doses eficientes desses mutagênicos em sementes de duas cultivares de arroz, FARACCO (1990) notou uma diminuição sensível da altura de plântula à medida que aumentou a dose dos mesmos, sendo esse decréscimo mais acentuado para um dos dois materiais quando tratado com raios gama. Tratadas com SA, as cultivares não mostraram grande diferença de sensibilidade e a altura das plântulas é menos reduzida. Isto significa que os materiais experimentados seriam mais sensíveis aos raios gama que à azida sódica e por outro lado, eles responderiam mais uniformemente a esse mutagênico que aos raios gama.

Além disso, o autor notou que o tratamento dos materiais controles apenas com pH 3.0 não resultou em diferenças muito acentuadas em relação às testemunhas com água. De modo geral, ambos os mutagênicos produziam um decréscimo na emergência e sobrevivência; levando-se em conta os parâmetros fisiológicos da geração M1 (emergência, altura de plântulas, sobrevivência e fertilidade), a SA apresentou o maior efeito mutagênico comparativamente aos raios gama (FARACCO, 1990).

As plantas autógamas apresentam-se como aquelas mais analisadas pelo uso de mutagênicos químicos, sendo que, tais análises referem-se principalmente a danos fisiológicos na germinação, sobrevivência, altura de plântulas e alterações genéticas. Com os resultados obtidos, 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 (GUIMARÃES, 1978).

No mesmo trabalho, este pesquisador tratou sementes de arroz de sequeiro por quatro concentrações de SA (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 com pré-tratamento em água destilada por oito e zero horas. Então, ele observou nos experimentos realizados sem o pré-tratamento em água destilada uma redução na sobrevivência de plântulas M1 com o aumento das concentrações do mutagênico dentro de um mesmo pH. Todavia, para uma determinada concentração, as diferenças de pH não mostraram um comportamento determinado. Esse resultado ainda foi mais acentuado e evidente nos experimentos efetuados após oito horas de pré-tratamento em água destilada. Para a concentração mais forte (5×10^{-2} M) e o pH de maior acidez (pH 3.0), os danos fisiológicos foram tão intensos que a sobrevivência caiu a 0.

Quanto à altura das plântulas M1, foi observado, tanto para as sementes pré-tratadas por oito horas em água destilada como para aquelas não pré-tratadas, um decréscimo com o aumento das concentrações, qualquer que seja o pH considerado. A mesma observação também fica válida com o aumento da acidez quando fixando-se uma concentração e estudando-se o efeito do pH. Da mesma maneira que para a sobrevivência, os maiores danos fisiológicos ocorreram com as concentrações mais elevadas e os pH mais ácidos.

Paralelamente a esses resultados obtidos para tratamentos com SA, a irradiação das sementes com dosagem crescente de raios gama (0, 8, 16, 24, 32 KR) não mostrou um

efeito marcante das dosagens sobre a sobrevivência de plântulas M1, nem tampouco sobre a altura, chegando mesmo a atingir uma certa constância com o aumento das dosagens usadas. Entretanto, todas as dosagens usadas apresentam-se com número de sobreviventes e altura de plântulas menores que o controle. A máxima dosagem usada (32 KR) não foi capaz de atingir os valores de LD_{50} e GR_{50} . Com isso, deseja-se dizer que, usando-se maiores dosagens, os resultados passaram a ser diferentes desses relatados (GUIMARÃES, 1978).

NILAN et alii (1973) observaram a pH 3.0 uma maior frequência de mutantes clorofilianos em sementes obtidas de espigas M1 de cevada induzidos pelo tratamento das sementes por SA ao passo que o pH 11.0 não tinha efeito. Assim a pH 3.0, o tipo predominante é a azida hidrogenada HN_3 . A maior efetividade de azida em soluções ácidas é provavelmente devida à melhor penetração das membranas celulares por moléculas neutras HN_3 .

Em comparação com outros mutagênicos poderosos, a SA é relativamente segura de manusear, não persistente e pouco dispendiosa. Assim, a azida pode ser um mutagênico muito útil para aplicações práticas em melhoramento de plantas. Os técnicos que utilizam compostos com base de azida para outras finalidades precisam prestar contas de seu poder mutagênico e dos cuidados a serem tomados.

SANDER & MUEHLBAUER (1976) notaram uma redução da porcentagem de plântulas de ervilhas emergidas fazendo variar a concentração de SA de 10^{-3} a 10^{-2} M e o tempo de tratamento de três a quatro horas. O crescimento foi retardado à concentração de azida mais alta (10^{-2} M) e ao maior tempo de tratamento (4 horas). Esse último fator parecia exercer um maior efeito sobre a altura de planta do que a dosagem. Essa observação sugere que o tempo de tratamento seja um importante fator para penetração do mutagênico ou então outros efeitos citotóxicos como inibição do transporte de eletrons por

azida tornem-se muito preponderantes.

Quando comparadas aos controles e às plantas M1 provenientes de sementes tratadas por azida, as plantas M1 provenientes de sementes tratadas por irradiação gama mostravam muito mais aberrações foliares. Esse efeito que também ocorre em plantas M1 tratadas com agentes alquilantes foi postulado a ser um indicador de danos cromossômicos. A escassez de aberrações foliares nas plantas M1 tratadas por azida sugeriu que o tratamento por esse mutagênico não induzisse aberrações cromossômicas. Semelhantemente, as lesões foliares sobre as plantas irradiadas podem ser sintomas visíveis de conseqüências de aberrações cromossômicas produzidas por radiação ionizante.

SARMA et alii (1978) trataram sementes de arroz da cultivar China-45 com três concentrações (5×10^{-4} , 1×10^{-3} e 2×10^{-3} M) de SA e observaram uma leve mas gradual redução na altura de plântulas, um aumento na esterilidade das sementes e da freqüência de quimeras foliares M1. A taxa de mutação mais alta foi obtida com 2×10^{-3} M do mutagênico. Esse resultado juntamente com os já obtidos por NILAN et alii (1973) a respeito da maior freqüência de mutação induzida por sementes de cevada tratadas com 10^{-3} M de azida e a pH 3.0 levaram os pesquisadores a concluir que a azida, quando administrada à concentração de 10^{-3} M, parece ser mais eficiente. No entanto, a eficiência do mutagênico não depende só da concentração mas também de outras variáveis tais como tempo de pré-embebição, duração do tratamento e pH da solução mutagênica.

Hidratação das sementes por embebição em água é conhecida para facilitar rápida infusão do mutagênico tanto como para aumentar a sensibilidade do material. A sensibilidade intensificada devida à pré-embebição tem sido atribuída a vários fatores tais como mudanças na atividade metabólica das células, iniciação e progresso na síntese de DNA nas células embrionárias (NATARAJAN & SHIVASANKAR, 1965).

HASEGAWA & INOUE (1980a) observaram que a taxa de germinação e a altura de plântulas M1 de cevada foram reduzidas proporcionalmente ao aumento da concentração por 10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1} M de SA durante 2, 4, 8, 16, 18, 20 e 24 horas. Não foi observada redução de crescimento após tratamento com 10^{-4} M da droga. A germinação das sementes foi completamente inibida 7 dias após tratamento com 10^{-1} e 10^{-2} M durante 6 e 18 horas, respectivamente. Em todos os tratamentos, o poder germinativo das sementes foi retardado. Similarmente, a fertilidade de sementes M1 diminuía com o aumento da concentração de azida e a frequência de mutação de clorofila variava de 21.0 a 27.7 por 100 espigas M1 e de 3.00 a 8.38 por 100 plântulas M2, com exceção para o tratamento com dose de 10^{-4} M.

Os mesmos pesquisadores chegaram aos resultados que o limite mais elevado de frequência de mutação de clorofila parece ser aproximadamente 30% na base de espigas M1 e 10% na base de plântulas M2. Conseqüentemente, eles concluíram que a SA é mais efetiva para induzir mutação do que radiação. Num outro trabalho, YAMASHITA et alii (1972) concluíram semelhantemente para a efetividade da droga comparativamente àquela dos agentes alquilantes tais como metano sulfonato de etila (EMS) e N-metila-N-nitrosourea (NMU). A frequência mais alta de mutação de clorofila e a fertilidade mais baixa de sementes M1 têm sido observadas em sementes pré-embebidas durante 12 horas, o que sugere que os efeitos da SA nesses parâmetros dependem do tempo de tratamento.

HASEGAWA & INOUE (1980a) relataram que a SA é muito mais eficiente para induzir mutação quando aplicada à fase S do ciclo mitótico. Essa característica da ação mutagênica da SA, quando correlacionada com a replicação do DNA, é similar àquela da etilenimina (EI) em arroz (NISHIMURA e FUTSUHARA, 1976) mas difere daquela de EMS em cevada (NATARAJAN & SHIVASANKAR, 1965). SARIÉ et alii (1961) irradiaram sementes de quatro variedades de trigo com doses baixas e crescentes de raios gama (500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 7500, 10000, 12500 e 15000R) e notaram que

resultou uma porcentagem de germinação mais ou menos similar à de 0 a 5000 R mas que decresceu às doses mais elevadas. O decréscimo mais notável na taxa de germinação foi à dose de radiação de 15 KR pelo fato da germinação decair cerca de 10% (96-86%).

Por outro lado, certas doses tinham um efeito estimulante sobre a altura de plântulas por crescerem de 2 a 3 cm mais do que o controle e as doses estimulantes são diferentes dependendo das variedades. As doses superiores a 10 KR já acusaram efeitos prejudiciais e as variedades resistiam diferentemente à mesma dose. Os pesquisadores concluíram que "As características de radiorresistência são específicas a cada variedade separadamente. São necessários mais pesquisas nessa área para determinar fatores morfológicos, fisiológicos e outros ligados à radiorresistência de certas variedades definidas".

ANDO (1970) irradiou sementes de arroz da variedade brasileira "Dourado Precoce" com 10, 20 e 30 KR e observou de uma maneira geral que o número de sementes germinadas uma semana após semeadura, a altura das plântulas com 14 dias de idade e o número de sobreviventes na época da colheita diminuíram todos com o aumento da dosagem de raios gama. GAUL (1959a) encontrou uma correlação entre altura de plantas e sobrevivência de sementes de cevada irradiadas por raios X.

ANDO et alii (1980) trataram sementes de arroz da mesma variedade acima referida em solução tampão de ácido cítrico e fosfato de sódio 0.1 M (pH 3.0 a pH 8.0), ou em solução tampão de glicocol 0.1 M e hidróxido de sódio (pH 9.0 a pH 11.0). Eles observaram que os valores baixos de pH das soluções reduzem o número de plantas sobreviventes M_1 na época da colheita. Eles concluíram que o efeito da SA é muito influenciado pelo pH da solução tampão. Os valores mais efetivos de pH encontram-se

perto de 3.0 ou 4.0. Além disso, alta concentração de azida (5×10^{-2} M) tende a induzir mais mutações albina do que não-albina.

AWAN et alii (1980), tratando sementes de arroz com diferentes dosagens de SA, durante 2 e 3 horas de embebição em soluções de tampão de pH 3.0, observaram que decresceu, com concentrações crescentes do mutagênico, a altura média das plântulas com 6 dias de idade. Depois deste tempo, eles continuaram medindo a altura das plântulas a cada período de 24 horas. Então, os valores médios da altura de plântulas tratadas por 3 horas acusaram um efeito inibidor profundo das concentrações de azida sobre o crescimento de plântulas com um dia de idade.

No entanto, exceto às concentrações mais elevadas, as diferenças registradas no crescimento das plântulas entre os diversos tratamentos com concentrações diferentes estreitaram-se entre 3 e 6 dias, o que indica a natureza temporal e amplamente fisiológica da inibição de crescimento. O crescimento de plântulas M1 é amplamente usado como um índice para determinar os efeitos biológicos de vários mutagênicos físicos e químicos (KONZAK et alii, 1972).

Mutagênicos diferem no seu mecanismo e modo de ação no sistema biológico. Daí a extensão de redução em crescimento é ligada ao mecanismo de ação para um determinado mutagênico. Como um inibidor respiratório, a azida pode inibir um sistema suprido de energia (YONETANI & RAY, 1965; VIGERS & ZIEGLER, 1968), resultando na inibição de mitose que pode ser associada com depressão de crescimento de plântulas. As condições fisiológicas da semente no momento do tratamento influenciam muito a magnitude dessa depressão (NILAN et alii, 1976; KLEINHOFES et alii, 1978).

A indução de mutação viável pode fornecer uma fonte válida de variabilidade genética aos melhoristas de plantas. Vários mutagênicos químicos e físicos têm sido usados

para induzir caracteres agrônomicos desejáveis em plantas cultivadas. A azida tem sido relatada como a mais efetiva e eficiente de todos os mutagênicos para cevada (NILAN et alii, 1977; NIKNEJAD, 1976).

O número de plantas sobreviventes M1 é um dos fatores, na prática, que determina a maior concentração possível de um mutagênico a ser aplicado; também esse conceito pode ser usado como uma medida relativa das dosagens empregadas. A esterilidade M1, isto é, a porcentagem de flores estéreis nas espigas M1, pode ser usada também como uma medida do efeito relativo dos mutagênicos (DOLL & SANDFAER, 1969).

2.5 USO DA AZIDA SÓDICA NAS PESQUISAS BIOLÓGICAS.

A SA tem uma ampla variedade de utilidade na indústria, agricultura, medicina e pesquisa biológica. É um reativo comum em sínteses orgânicas. Na agricultura, é usada como inibidor respiratório, estímulo da germinação de sementes, nematicida, esterilizador de solo, herbicida, inibidor da nutrificação e desinfetante em grãos. Em outras pesquisas biológicas, é usada como bactericida e agente de seleção em experimentos com bactérias. Mc Cann et alii¹ e Uland et alii², citado por SANDER et alii (1978), relataram que SA não é carcinogênica. No entanto, sua ação como mutagênico garante considerável atenção.

Os tratamentos com soluções do mutagênico são influenciados por vários fatores como: pH, tempo de tratamento, concentração e outros. Autores demonstraram que um aumento da concentração provocou uma redução na porcentagem de germinação de

¹. Mc CANN J.E. CHOU E. YAMASAKI and AMES B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 5135-5139, 1975.

². ULAND B. WEISBURGER E.K. AND WEISBURGER J.H. Chronic toxicity and carcinogenicity of industrial chemicals and pesticides toxicol. Appl. Pharmacol., 25, 446 (abstract), 1973.

plântulas M1 (SANDER & MUEHLBAUER, 1976). A SA é um mutagênico poderoso em cevada (NILAN, 1973). Sua mutagenicidade é consideravelmente intensificada quando as sementes são pré-embebidas (SANDER & MUEHLBAUER, 1976). Esses últimos pesquisadores chamam também a atenção sobre o uso potencial da azida no melhoramento da ervilha.

A falta de aberrações foliares induzidas por sementes tratadas por azida é provavelmente devida à especificidade única de azida como um mutagênico que produz mutações intragênicas sem aberrações cromossômicas concomitantes. O fato que SA não induz aberração cromossômica sugere que os mutantes induzidos por esse agente são devidos à mutações ao nível gênico (KLEINHOFs et alii, 1974).

A embebição das sementes de arroz durante 4-12 horas produzia a taxa de mutação mais alta com azida. A embebição por mais tempo que 12 horas provocou um declínio na frequência de mutação (13.9 mutações/100 panículas M1). Provavelmente, o mecanismo de mutagenese da azida é absolutamente diferente daquele dos agentes alquilantes e das radiações. KLEINHOFs et alii (1974) observaram que 4 horas de embebição em cevada bastam para o tratamento com azida e que a embebição depois de 5 horas causou excessivos danos fisiológicos.

HASEGAWA & INOUE (1980b) observaram que foi completamente inibido o poder germinativo de sementes dormentes de arroz após tratamento durante 12 e 24 horas à concentração de SA mais alta que 10^{-2} M. A fertilidade de sementes M1 tornou-se levemente reduzida com o aumento das concentrações de SA. Também a frequência de mutações clorofilianas geralmente aumentava com a concentração e a duração de embebição. O tratamento com 10^{-1} M do mutagênico durante 6 horas produziam o rendimento máximo de mutação: 11.1 e 1.22% de panículas M1 e plântulas M2, respectivamente.

Em amendoim, LEVY & ASHRI (1973) sugeriam que a diferença varietal na sensibilidade à SA resultava de processos metabólicos diferentes afetando a ação do agente. Considerando o fato que a sensibilidade à SA é diferente entre as variedades de arroz *japonica* (HASEGAWA et alii, 1975) e que o produto é convertido em um mutagênico real nas células vegetais (OWAIS et alii, 1978; VELEMINSLY et alii, 1979), pode-se conceber que o efeito mutagênico de SA é diferente entre variedades (HASEGAWA & INOUE, 1980b).

O tratamento por SA produziu o maior número de mutações de clorofila nas sementes pré-tratadas durante 48 horas. De acordo com esse resultado, numerosos autores relataram que a SA é mais eficiente quando aplicada na fase S do ciclo celular (NILAN et alii, 1976; SILHANKOVA et alii, 1979); HASEGAWA e INOUE, 1980b). SARMA et alii (1979) indicaram que o rendimento de mutação de clorofila induzida por SA é reduzido depois de 12 horas de pré-embebição.

Azida em soluções ácidas é muito efetiva em reduzir altura de plantas M1 de cevada e em induzir plântulas mutadas M2 deficientes em clorofila enquanto que, em soluções alcalinas, ela é completamente inefetiva. Desde que o pK de SA é a pH 4.8, a espécie predominante a pH 3.0 é azida hidrogenada (HN_3). A falta de outros pesquisadores (SOBELS, 1954-1955; CLARK, 1958 e MULLER, 1966) em observarem o efeito mutagênico de azida pode ter sido devida ao uso de soluções com pH neutro (KLEINHOF et alii, 1974).

Tratamentos por azida não induzem aberrações cromossômicas. Assim, os mutantes encontrados não são provavelmente devidos a danos cromossômicos mas refletem verdadeiras mutações ao nível gênico. A SA é um mutagênico potencialmente muito útil mas pouco usado. Comparada com outros mutagênicos, é também relativamente segura para manusear (SMITH, 1965), não persistente (SMITH, 1966) e barata. Azida tem-se

mostrada um mutagênico químico potente ao mesmo tempo nos organismos superiores e inferiores (SIDERIS & NILAN, 1970; KONZAK et alii, 1972; KLEINHOFs et alii, 1974).

A mutagenese potencialmente alta de azida foi descoberta por SPENCE (1965) estudando o mecanismo de reparo dos danos induzidos por radiação em sementes de cevada (*Hordeum* sp.). Ajustando o pH das soluções de azida tanto como modificando o estado metabólico das sementes tratadas, NILAN & SANDER (1974) induziram freqüências de mutação aproximadamente iguais àquelas mais altas obtidas por EMS. Em cevada, azida parece ser o mutagênico mais eficiente e efetivo de todos aqueles testados para a indução de mutantes deficientes em clorofila, morfológicos e certas mutações bioquímicas (KONZAK et alii, 1965; KLEINHOFs et alii, 1974; KONZAK et alii, 1975; NIKNEJAD, 1976; NILAN et alii, 1976; WALTHER, 1976).

NILAN et alii (1976) relataram que o tratamento por azida produz certo atraso na germinação das sementes e níveis baixos de danos fisiológicos como comprovados por medidas da porcentagem de germinação de sementes M1, crescimento de plântulas e sobreviventes às concentrações de azida produzindo suficientemente descendentes para estudos de mutação. Em estudos recentes, OWAIS et alii (1978) têm demonstrado a existência de uma substância altamente mutagênica em embriões de cevada tratados por azida que eles identificaram como um derivado metabólico de azida.

Ainda há pouca informações disponíveis a respeito da mutagenese da azida em arroz. MUSTAFA (1976) conduziu estudos preliminares sobre o mutagênico e outros efeitos dele em arroz, e observou uma alta freqüência de mutantes deficientes em clorofila em M2. Entre numerosas utilidades, a azida tem sido usada para estimular a germinação de sementes dormentes de aveia selvagem (FAY & GORECKI, 1978).

O crescimento de plântulas de cevada foi fortemente reduzido só quando as

soluções de tratamento com SA foram tratadas com pH 3.0 (SIDERIS, 1968).

O efeito principal de SA sobre o ciclo celular de cevada foi um atraso na iniciação do metabolismo depois da germinação. Isso tem-se originado de um atraso uniforme na atividade mitótica, crescimento de plântulas, síntese de DNA e ATP. Esse atraso foi interpretado como sendo devido a uma deficiência em ATP (PEARSON, 1973; PEARSON, 1975). KLEINHOFs et alii (1978) inicialmente usavam SA em trabalhos de laboratório como um inibidor respiratório para estudar como quebras de cromossomos e mutações poderiam ser induzidas e/ou consertadas em células de cevada irradiadas.

Treze anos antes, azida por se induziu aproximadamente uma frequência de mutantes deficientes em clorofila de 6% na base do número de espigas M1 de cevada (SPENCE, 1965). Essa baixa frequência de mutação foi assumida sendo devida à inibição de catalase e peroxidase, e ao aumento subsequente presumido em concentração de peróxido na célula. A frequência de mutação obtida com tratamentos por meio de SA foi aumentada mais tarde a cerca de 20% por usar soluções de tratamento tendo valores de pH baixo (SIDERIS, 1968; SIDERIS et alii, 1969; SIDERIS & NILAN, 1970).

NILAN et alii (1973) e KLEINHOFs et alii (1974) relataram frequências de mutação sobre uma base do número de espigas M1 utilizadas além de 46 horas de pré-embebição a 20°C. A ação mutagênica de azida em cevada poderia depender do metabolismo ou do estado de DNA, por exemplo da fase S nas células embrionárias da semente. GICHNER et alii (1975) conduziram um experimento no qual eles acharam que a solução de azida com pH 7.0 não foi mutagênica em cevada. KLEINHOFs et alii (1978) relataram que a não mutagenicidade de azida, em certos casos, é devida a tratamento inadequado. De fato, as condições de tratamento podem afetar seriamente as frequências de mutação obtida.

Diferenças varietais em resposta a azida parecem ser ligadas às atividades metabólicas. Uma variedade pode ser altamente sensível à azida sem pré-embebição nenhuma ou ativação de processos metabólicos enquanto outra variedade pode requerer considerável pré-embebição e atividade metabólica para atingir o mesmo grau de sensibilidade em termos de frequência de mutação. Diferenças varietais em resposta à sensibilidade por azida têm sido determinadas no amendoim (LEVY and ASHRI, 1973) onde foi usada pré-embebição de 1 e 24 horas previamente a tratamento por azida. Esses pesquisadores têm demonstrado que etapas precoces de desenvolvimento de embriões de amendoim estiveram mais sensíveis que as etapas tardias.

SIDERIS et alii (1969) escreveram que um produto químico, diferente dos alquilantes, SA, tinha-se mostrado a mutagenicidade mais eficiente e efetiva em cevada quando o pH da solução variava abaixo de 7.0. Um rendimento de 17% de espigas mutantes depois de 4 horas de tratamento com uma concentração de 10^{-3} M de azida, a pH 3.0, classifica certamente esse produto entre os mutagênicos altamente efetivos. Parece que a azida mereça um lugar de destaque entre os mutagênicos mais eficientes.

A razão rendimento mutacional/células aberrantes prova que os tratamentos com azida, 10^{-3} M, a pH 3.0 e pH 7.0 são altamente eficientes. A forma neutra da molécula de azida é, de fato, mais abundante *in vitro* a pH baixo do que alto. Consequentemente, o efeito do pH sobre o sistema químico *in vitro* deve ser considerado independente, mas em relação às moléculas que atravessam as membranas biológicas.

O efeito do tratamento com SA sobre o crescimento de plântulas de cevada depende altamente do pH. Uma solução de SA, 10^{-2} M, reduziu fortemente a altura de plantas provenientes de sementes tratadas a pH 3.0, enquanto que a mesma concentração foi inefetiva a pH 11.0. Então, a concentração não tinha efeito apreciável sobre os danos induzidos pelo mutagênico (SIDERIS et alii, 1969). Resumidamente, o efeito inibitório da

azida sobre o desenvolvimento de plântulas de cevada aparece predominantemente quando estas são tratadas em soluções ácidas.

3. MATERIAIS.

3.1 SEMENTES.

O material de trabalho compõe-se de sementes da cultivar IAC-25, assim nomeada pelo Instituto Agronômico de Campinas. Essa amostra provém da multiplicação de sementes da safra de 1991/92 realizada pelo Departamento de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba.

3.2 SOLUÇÃO TAMPÃO.

A solução tampão de McIlvaine cujos componentes são o fosfato dissódico (Na_2HPO_4 0.2 M) e o ácido cítrico [$\text{HO}(\text{COOH}) (\text{CH}_2\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 M] de peso molecular (PM) 141.96 e 210.14, respectivamente, foi utilizada para a obtenção das soluções de pH 3.0, 5.0 e 7.0. As soluções de pH 9.0 e 11.0 foram obtidas através da solução tampão de Sørensen constituída de glicocol $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CH}_2\text{COOH}$ 0.1 M (PM=75.07) e de hidróxido de sódio NaOH (PM=40). Foi usado o inibidor respiratório, azida sódica SA, de fórmula química NaN_3 (PM=65) na forma de pó, da fabricação MERCK.

4. MÉTODOS.

4.1 ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE ÁGUA DAS SEMENTES.

O grau de umidade das sementes foi calculado segundo o método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ prescrito pela R.A.S (Regras para Análise de Sementes), baseado na diferença do peso bruto das sementes úmidas (Pu) antes da secagem e de seu peso seco (Ps) após a secagem através da seguinte expressão:

$$\%U_{(bu)} = \frac{Pu - Ps}{A - T} \times 100$$

$U_{(bu)}$: porcentagem de água calculada em função do peso das sementes úmidas.

T: peso do recipiente (tara).

A: peso total do conjunto, sementes e recipiente, antes da secagem.

Essa estimativa, feita no início e depois do experimento (97 dias), em 24 horas cada vez, muda pouco de 11.1 a 10.2, respectivamente, do fim do inverno ao fim da primavera.

4.2 SELEÇÃO DE SEMENTES.

A amostra de sementes foi submetida a uma seleção visual a fim de eliminar

os grãos aparentemente anormais de cor ou de tamanho, grãos furados, doentes, chochos e as impurezas físicas. Um total de 20600 grãos foi dessa maneira selecionado e dividido em lotes de 200 e ensacados.

Foram utilizados semanalmente dezesseis saquinhos ao acaso por seis vezes para serem submetidos ao tratamento por mutagênico químico. Os sete últimos saquinhos foram irradiados por raios gama, representando assim o sétimo experimento da série.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO.

Para cada um dos seis experimentos cujas sementes deveriam ser submetidas ao tratamento por SA, o procedimento foi o seguinte:

Dissolvem-se a quantidade necessária de reagentes em água destilada e dilui-se até 500ml, o que pode ser sucintamente resumido na tabela seguinte:

Tabela 1: Soluções de reagentes gerais especiais.

	Peso necessário (g)	Volume da Solução (ml)
Fosfato dissódico Na_2HPO_4 0.2M	14.1965	500
Ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0.2M	10.5070	500
Solução de glicocol $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$ 0.1 M	3.7535	500
Hidróxido de Sódio NaOH 0.1 M	2.0000	500

As soluções assim preparadas servem para ajustar as diversas soluções de tampão, as de McIlvaine (pH 3.0; 5.0 e 7.0) e as de Sörensen (pH 9.0 e 11.0) da seguinte maneira:

Tabela 2: Solução tampão de McIlvaine (fosfato dissódico - ácido cítrico) e de Sörensen (glicocol - hidróxido de sódio).

pH	Fosfato dissódico Na_2HPO_4 0.2 M (ml)	Ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0.1 M (ml)	Solução de glicocol $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$ (ml)	hidróxido de sódio NaOH 0.1 M (ml)
3	4.11	15.89	---	---
5	10.30	9.70	---	---
7	16.47	3.53	---	---
9	---	---	9.0	1.0
11	---	---	5.1	4.9

Seiscentos mililitros de solução foram obtidos em frascos de vidro para cada preparação de pH de maneira a tratar 600 sementes de arroz na proporção de 1 ml por grão, o que permite oferecer a cada semente a oportunidade de absorver o mesmo número de moles do mutagênico.

O conteúdo de cada frasco foi então subdividido em três partes de 200 ml e transvasado em erlen-meyers. Aí as soluções subdivididas foram tratadas pela concentração prevista no caso referente de SA.

Logo que a SA tivesse sido adicionada às soluções de tampão, ocorreu um desequilíbrio dessas soluções para uma tendência frequentemente alcalina. Foi então sempre necessário fazer o reajuste por meio do reagente ácido (Tabela 1).

Tão rápido quanto foi possível de maneira que o tempo de tratamento fosse o mesmo para cada material, as sementes foram vertidas nos erlen-meyers previamente marcados aos lápizes de vidro, do pH e das temperaturas de tratamento. O material foi então colocado na câmara de incubação com temperaturas graduadas.

As soluções foram agitadas manualmente a cada 30 minutos conforme aconselhado por KONZAK et alii (1964) para assegurar um tratamento uniforme em toda parte dentro do frasco.

Placas de Petri com tampas identificadas foram rotuladas para receber as sementes tratadas e lavadas cuidadosamente por 30 minutos em água corrente de torneira a fim de eliminar o excesso de substâncias mutagênicas das sementes. A identificação do material nas placas foi feita da seguinte maneira:

- .primeiro algarismo: concentração de SA,
- .segundo algarismo: pH da solução mutagênica,
- .terceiro algarismo: temperatura de tratamento,
- .quarto algarismo: tempo de tratamento em hora.

Foi adotado esse modo de rotulagem para identificar também os tratamentos

no delineamento experimental. Os grãos chochos que tinham sido confundidos no momento da seleção visual das sementes viáveis subiram então à superfície da solução de tratamento por serem mais leves. Estes foram eliminados na hora da lavagem pois é necessário só 150 sementes para o correto seguimento do trabalho.

As sementes em placa de Petri foram secadas à temperatura do laboratório durante uma noite e semeadas cedo no dia seguinte.

O procedimento até aqui descrito é o mesmo para todos os tratamentos com SA. Só diferem, segundo o objetivo da preparação, o tempo de tratamento e a taxa de dose (Tabela 3).

4.4 TRATAMENTOS.

Foram desenvolvidos sete experimentos diferentes entre os quais seis utilizando tratamentos com SA referidos aqui como Exp.1, Exp.2, Exp.3, Exp.4, Exp.5 e Exp.6, e um empregando-se raios gama a fim de comparação com os anteriores e designado de Exp.7.

4.4.1 Tratamentos químicos.

Foi usado o mutagênico SA em duas concentrações: 1×10^{-3} M nos casos dos Exp.1, Exp.2 e Exp.3 e 5×10^{-3} M nos casos dos Exp.4, Exp.5 e Exp.6. Nas duas concentrações, foram usados os pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 e 11.0, e as temperaturas 20, 24 e 28°C. O tempo de tratamento foi de:

- . 4 horas para os Exp.1 e Exp.4,
- . 8 horas para os Exp.2 e Exp.5,

. 12 horas para os Exp.3 e Exp.6
conforme resumido na Tabela 3.

As sementes do tratamento controle permaneceram sempre na água destilada enquanto que as sementes ensaiadas sofreram o efeito da solução mutagênica.

4.4.2 Irradiação.

Foi usada a fonte de ^{60}Co , tipo "GAMMA BEAM 650" do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP, em Piracicaba, no Campus "Luiz de Queiroz". As sementes colocadas em saquinhos de papel e dispostas a 14 cm da fonte, foram irradiadas com a taxa de 299.2 KR/hora durante 33 minutos e 6 segundos, sendo uma dosagem diferente para cada saquinho: 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48 KR.

4.5 SEMEADURA E OBSERVAÇÕES.

O material tratado e secado foi semeado em caixas de madeira de 152 X 108.8 cm na casa de vegetação segundo um delineamento fatorial em blocos completos casualizados com três repetições pela razão de 50 sementes por repetição. Cada bloco envolveu 15 tratamentos mutagênicos e a testemunha.

Tabela 3: Condições de tratamento com SA.

Exp.1 Exp.4 Exp.2 Exp.5 Exp.3 Exp.6 ----- CONCENTRAÇÃO (M)	pH da solução mutagê- nica	Tempera- tura de tratamento (°C)	TEMPO DE TRATAMENTO (hora) ----- Exp.1 Exp.2 Exp.3 Exp.4 Exp.5 Exp.6		
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	3.0	20	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	3.0	24	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	3.0	28	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	5.0	20	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	5.0	24	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	5.0	28	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	7.0	20	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	7.0	24	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	7.0	28	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	9.0	20	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	9.0	24	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	9.0	28	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	11.0	20	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	11.0	24	4	8	12
1x10 ⁻³ 5x10 ⁻³	11.0	28	4	8	12

Manteve-se constantes as mesmas condições ambientais com o decorrer do tempo do experimento. Observações foram anotadas em todos os experimentos sobre a emergência, a sobrevivência e 30 plântulas para a altura por repetição tomadas ao acaso respectivamente 10, 30 e 15 dias após semeadura. A sobrevivência foi calculada na base de plântulas emergidas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados experimentais foram analisados da seguinte maneira:

1. Os efeitos dos 3 níveis do fator tempo, dos 3 níveis de temperatura e dos 5 níveis de pH foram testados segundo um esquema fatorial de 3x3x5 para avaliar a influência da temperatura e do pH sobre a emergência, altura e a sobrevivência das plântulas. Em cada caso, o teste de Tukey foi aplicado para apontar onde, entre as médias dos tratamentos, existiria uma eventual diferença significativa ou não sugerida pelo teste de F.

2. Os Exp.1, Exp.2, Exp.3 de um lado e os Exp.4, Exp.5, Exp.6 do outro formam dois grupos distintos segundo a concentração de SA de 1×10^{-3} M e 5×10^{-3} M pela qual as sementes foram tratadas. No entanto, dentro de um mesmo grupo, os experimentos diferem pelo tempo de tratamento. Então, os experimentos cujos tempos de tratamento são os mesmos e que pois diferem somente pela dosagem permitem descobrir o efeito do fator "dose" pelo uso dos seguintes contrastes:

$$\hat{Y}_1 = m_1 - m_4 \text{ (Exp.1 vs Exp.4)}$$

$$\hat{Y}_2 = m_2 - m_5 \text{ (Exp.2 vs Exp.5)}$$

$$\hat{Y}_3 = m_3 - m_6 \text{ (Exp.3 vs Exp.6)}$$

onde m_1 e m_4 , médias da emergência, altura e sobrevivência de todas as plântulas que

foram tratadas respectivamente com 1×10^{-3} M e 5×10^{-3} M de concentração da SA durante 4 horas, sendo uma média " m_1 " e uma média " m_4 " para cada efeito separadamente. O mesmo procedimento foi aplicado para m_2 e m_5 , m_3 e m_6 , respectivamente. $\hat{Y}_1$, $\hat{Y}_2$ e $\hat{Y}_3$ indicam contrastes entre duas médias apenas (Tabela 24).

As comparações tornam-se possíveis pela aplicação da fórmula proposta por GOMES (1990) para testar um contraste entre duas médias apenas, tal que:

$$t = \frac{m_1 - m_2}{s \sqrt{\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}}}$$

sendo m_1 e m_2 , doses médias de cada grupo 1 e 2, respectivamente; igualmente para r_1 e r_2 , número de repetições e s , erro padrão residual (Tabela 25).

3. O número de plântulas emergidas sendo fixo, o grau de dependência entre esse número e a altura de plântulas de um lado, a sobrevivência do outro lado, é determinado pelo coeficiente de correlação e a equação de regressão linear. O mesmo procedimento permite também avaliar a correlação e a regressão quando existirem entre altura de plântulas e o número de sobreviventes, usando a altura como variável preditora.

4. Os resultados obtidos para o experimento cujas sementes foram irradiadas por raios gama foram analisados segundo o método dos polinômios ortogonais através do uso da regressão.

5. RESULTADOS.

5.1 EMERGÊNCIA.

5.1.1 Tratamentos com azida sódica.

Os resultados experimentais obtidos para a performance das sementes tratadas com SA são apresentados nas Tabelas 4 a 9. As curvas correspondentes a esses dados para a emergência são desenhadas nas Figuras 2 a 6. A análise estatística é resumida nas Tabelas 11 e 12.

Experimento 1: As curvas se agrupam na vizinhança de 100% e quase se sobrepõem, o que significa que o efeito da temperatura e da acidez pouco influencia a emergência das sementes. De uma maneira geral, as plântulas emergem similarmente ao controle. Somente uma diferença significativa pode ser deduzida entre a curva obtida para o pH de maior acidez (pH 3.0) e aquela de pH 9.0 que encerram as três outras curvas tracejadas (Tabela 4 e Figura 2).

Experimento 2: O papel desempenhado pela temperatura quando ajustada a 28°C e a acidez a pH 3.0, e a interação entre esses dois níveis tornam altamente significativo o efeito do tratamento. De fato, a pH 3.0 e a 28°C, o número de plântulas emergidas caiu a 56.82% paralelamente às outras condições do tratamento onde, como mostra a Figura 3, nenhuma diferença significativa pode ser descoberta pelo fato da

emergência das sementes tratadas ser similar e se avizinhar àquela do controle (Tabela 5 e Figura 3).

Experimento 3: Nem a temperatura, nem a acidez tem efeito sobre a germinação das sementes. Os resultados foram aproximadamente os mesmos para o controle e cada um dos 15 tratamentos (Tabela 6).

Experimento 4: O efeito da acidez a pH 3.0 causou uma redução média de 36.64% na emergência das plântulas. A temperatura isoladamente não tem influência mas interage significativamente com o pH (Tabela 7 e Figura 4).

Experimento 5: O efeito do tratamento se manifesta de modo similar ao que foi observado para o Exp.2 e o Exp.4. A pH 3.0 e às temperaturas de 24-28°C, existe uma diferença altamente significativa entre o número médio de plântula emergidas relativamente ao controle e as outras condições do tratamento que dão praticamente os mesmos resultados (Tabela 8 e Figura 5).

Experimento 6: A emergência caiu com o aumento da acidez. O efeito da SA se acentua em solução tampão ácida com o aumento da dose e do tempo de tratamento (Tabela 9 e Figura 6).

5.1.2 Tratamentos com irradiação.

Na Tabela 10, se encontram os resultados anotados para a emergência de plântulas originadas de sementes irradiadas. A Figura 7 ilustra esses dados e a análise estatística é apresentada na Tabela 13.

A emergência começou a diminuir com o aumento das dosagens de raios

gama de 0 a 16 KR mas de repente subiu até atingir 32 KR onde caiu de novo e drasticamente de 97.20% até 40.56% quando a dosagem for de 48 KR de raios gama. Nenhuma das concentrações de SA aplicadas consegue matar todas essas sementes quanto à dose de 48 KR (Tabela 10 e Figura 7).

5.1.3 Resultados globais sobre emergência de plântulas.

Sempre que a concentração de SA for de 1×10^{-3} M, observou-se que só desempenham um papel significativo a acidez da solução mutagênica e o tempo de tratamento. Independentemente deste último fator, tudo aconteceu como se inexistisse o efeito da temperatura. O tratamento foi mais severo quando demorava por 4 ou 8 horas e a pH 3.0.

Ao se usar uma concentração de 5×10^{-3} M de SA, tanto a temperatura como o pH e o tempo de tratamento desempenharam um papel significativo apesar da não existência da interação entre eles. O efeito do tratamento foi mais intenso quando as sementes foram tratadas por 4 ou 12 horas, a 28°C e a pH 3.0 com o aumento da dose.

O efeito do tratamento na emergência das sementes irradiadas é altamente significativo e, quando decomposto em seus componentes polinomiais, são também significativos ao nível de 1% os componentes de 1°, de 2° e de 3° grau. A dose de 48 KR, a mais elevada do trabalho, foi a que produziu os maiores efeitos fisiológicos, diferindo significativamente dos demais.

5.2 ALTURA DE PLÂNTULAS.

5.2.1 Tratamentos com azida sódica.

Os resultados experimentais correspondentes a dados de altura de plântulas são apresentados nas Tabelas 4 a 9. As curvas relativas a esses dados são desenhadas nas Figuras 8 a 12. A análise estatística é mostrada nas Tabelas 14 e 15.

Experimento 1: Com exceção das plântulas provenientes de sementes tratadas em solução tampão de pH 9.0 a 24°C, todas as outras têm sua altura reduzida. A redução de crescimento foi significativa só a pH 3.0 (30.21%) mas a dose de SA utilizada não conseguiu reduzir 50% da altura normal das plantas. A temperatura não exerceu um efeito significativo (Tabela 4 e Figura 8).

Experimento 2: A maioria das plântulas cresceram mais que a testemunha. Apesar disso, houve uma redução significativa de crescimento quando as sementes são tratadas a pH 3.0 (25.31%). O efeito da temperatura não foi significativa (Tabela 5 e Figura 9).

Experimento 3: As plântulas cresceram similarmente ao controle. Nem a acidez, nem a temperatura teve efeito significativo sobre sua altura (Tabela 6).

Experimento 4: Devido ao aumento da dose de tratamento, o efeito da SA foi principalmente acentuado em solução tampão ácida de pH 3.0 onde a altura das plântulas foi reduzida acima de 50% (Tabela 20). Somente uma diferença significativa pode ser observada a pH 5.0 paralelamente aos outros níveis de acidez em que os resultados foram similares (Tabela 7 e Figura 10).

Experimento 5: Com exceção dos tratamentos a pH 11.0 e 20°C, a altura das plântulas foi reduzida gradualmente com o aumento da acidez da solução mutagênica. Devido ao aumento do tempo de tratamento, a redução de crescimento foi mais sensível comparativamente ao experimento anterior, especialmente a pH 3.0 e secundariamente aos pH 5.0 e 7.0. Desta vez, a temperatura também agiu significativamente, principalmente a 28°C (Tabela 8 e Figura 11).

Experimento 6: Nesse experimento onde usa-se simultaneamente a maior concentração de SA e o tempo mais prolongado de tratamento, os danos fisiológicos registrados foram conseqüentemente mais intensos. A redução de crescimento das plântulas foi significativa quaisquer que sejam as condições de tratamento apesar da inativação da temperatura. Não existe diferença significativa entre os resultados obtidos para a altura das plântulas provindo de sementes tratadas com soluções de pH 7.0, 9.0 e 11.0 (Tabela 9 e Figura 15).

5.2.2 Tratamentos com Irradiação.

Os resultados experimentais anotados para altura de plântulas no caso das sementes irradiadas são mostrados na Tabela 10. A curva dose-efeito resultante é desenhada na Figura 7, em porcentagem ao controle suposto 100%. A Tabela 16 mostra a análise estatística.

A irradiação das sementes com 8 KR de raios gama não afetou a altura das plântulas. A partir daí, a altura foi reduzida com o aumento das dosagens até 73.45% (Tabela 22) que foi a maior porcentagem de redução de crescimento registrada desde o início do trabalho. Na Figura 7, pode-se observar que a curva dose-efeito obtido tem exatamente a harmonia indicada por GAUL (1963).

5.2.3 Resultados globais sobre altura de plântulas.

Como já se observou no caso da emergência, quando a concentração de SA foi de 1×10^{-3} M, a temperatura não agiu significativamente também sobre a altura das plântulas e nem interagiu com o tempo de tratamento e a acidez da solução mutagênica. Então, é claro que os resultados, nessas condições de tratamento, não mudariam se tivesse usado a própria temperatura ambiente. O tempo, a acidez e sua interação foram significativos. Sua ocorrência foi maior quando o tratamento demorava por 8 horas e a pH 3.0 (Tabela 14).

Com o aumento da dose de SA, o papel da temperatura tornou-se significativo e o do tempo de tratamento e do pH reforçou-se apesar da interação das três simultaneamente não ser significativa. Agora, para acentuar o efeito do tratamento, só o tempo de 4 horas basta e é o mais adequado; a temperatura deve ser a mais elevada que possível e o nível requerido de acidez permanece a pH 3.0 (Tabela 15).

A análise de variância efetuada para os dados de altura com relação a sementes irradiadas revelou que o tratamento foi significativo até o componente quadrático (Tabela 16). A altura diminui com o aumento das dosagens de raios gama.

5.3 SOBREVIVÊNCIA.

5.3.1 Tratamentos com azida sódica.

Os resultados experimentais observados para o número de plântulas sobreviventes provenientes dos tratamentos com SA constam das Tabelas 4 a 9. As curvas em relação a esses dados são desenhadas nas Figuras 13 a 15. A análise estatística pode

ser vista nas Tabelas 17 e 18.

Experimentos 1,2,3: Não houve uma tendência marcante do efeito do mutagênico sobre a sobrevivência das plântulas. O efeito do tratamento não foi significativo (Tabelas 4, 5 e 6).

Experimento 4: Devido ao aumento da dose de tratamento, o efeito da SA foi significativo sobre a sobrevivência das plântulas a pH 3.0 e 28°C onde o número de plântulas sobreviventes caiu a 65.25 % contrariamente aos experimentos anteriores (Tabela 17 e Figura 13).

Experimento 5: Devido ao aumento do tempo de tratamento, as sementes sofreram mais da ação do pH 3.0. Conseqüentemente, as plântulas mais débeis morreram cedo em maior número (Tabela 8 e Figura 14).

Experimento 6: Similarmente aos experimentos 4 e 5, a SA foi mais eficiente na solução tampão de pH 3.0 mas o número de sobreviventes é maior neste caso (Tabela 9 e Figura 15).

5.3.2 Tratamentos com irradiação.

Pode-se observar os resultados anotados para a sobrevivência das sementes irradiadas na Tabela 10. A curva é desenhada na Figura 7 e a análise estatística é apresentada na Tabela 19.

A curva de sobrevivência ilustrada para sementes irradiadas quase se confunde com aquela da emergência. Então, como no caso da emergência, o número de

plântulas sobreviventes diminuiu com o aumento das dosagens de raios gama abaixo de 60% da população à dose de 48 KR (Tabela 10 e Figura 7).

5.3.3 Resultados globais sobre sobrevivência de plântulas.

Quando a concentração de SA utilizada for de 1×10^{-3} M, somente o tempo de tratamento agiu significativamente do ponto de vista estatística. Assim, pelo teste de Tukey, sabe-se que, nos tratamentos efetuados durante 8 horas, a SA foi mais ativa (Tabela 17).

Quando a dose de SA sobe até 5×10^{-3} M, os resultados são mais consistentes (Tabela 18). A análise de variância mostra que o tempo, a temperatura e o pH foram significativos. A análise das médias de cada um dos três fatores pelo meio do teste de Tukey especifica que, o mutagênico teria ainda mais influência se as sementes fossem tratadas durante 4 horas só, a 24 ou 28°C e a pH 3.0 particularmente.

O que chama a atenção nos tratamentos químicos é o fato do número de plântulas sobreviventes superar freqüentemente as emergidas em alguns tratamentos de cada experimento, mormente no Exp.4, especialmente a pH 3.0. Para tornar visível essa observação, ela foi assinalada com um asterisco nas Tabelas 4 a 9. Isso evidencia um atraso certo na emergência dessas sementes tratadas. Além disso, o número de sobreviventes é sempre muito elevado, de 90 até mais de 100% na maioria dos casos.

Quanto à irradiação das sementes, é claro que a dose de 48 KR de raios gama afetou seriamente o embrião das sementes. Mais de 60% da população morreram e as plântulas sobreviventes, visivelmente, estavam fracas, pouco viáveis e inaptas após 30 dias para serem eventualmente transplantadas. Ao contrário, a irradiação das sementes com 40 KR mata 31% da população relativamente ao controle mas as plântulas

sobreviventes parecem ainda bem vigorosas no final do experimento (Tabela 22). Além disso, a análise de variância deu resultados significativos até o componente cúbico (Tabela 19).

6. DISCUSSÃO.

6.1 TRATAMENTOS COM AZIDA SÓDICA.

6.1.1 Efeito da dose de tratamento.

Os dados da análise estatística se encontram nas Tabelas 11 a 12, 14 a 15, 17 a 18, 20 a 21, 23 a 29 e nas Figuras 2 a 6, 8 a 22.

Para discutir o efeito da dose de tratamento, irá-se considerar basicamente:

1. a significância das curvas dose-efeito, conceituadas segundo os experimentos pares, 1 e 4, 2 e 5, 3 e 6 que foram feitos respectivamente durante 4, 8 e 12 horas sendo dentro de cada par, o primeiro realizado com 1×10^{-3} M e o segundo com 5×10^{-3} M (Tabela 3).

2. os resultados da análise estatística conforme prevista no item 4.6 do presente trabalho.

O número médio de plântulas sobreviventes supera as emergidas em certos casos. Como a emergência é avaliada desde 10 dias após semeadura e a sobrevivência só depois de 30 dias, pode ter ocorrido uma demora na emergência de várias sementes devido ao efeito do mutagênico depois do tratamento. A SA, agindo sobre o ciclo celular da semente, provavelmente causou um atraso na atividade mitótica e na iniciação do metabolismo.

Com a irrigação regular que foi feita durante o experimento, as sementes

neste estado não demoraram para emergir. Conseqüentemente, o número de sobreviventes contados após um mês superou normalmente o número emergente. Essa observação que foi comprovada para cada um dos seis experimentos realizados com tratamento por SA confirmou os resultados do relatório de NILAN et alii (1976) a respeito do atraso na germinação de sementes M1, tratadas por SA, e dos níveis baixos de danos fisiológicos na sobrevivência das plântulas.

Conforme as Figuras 16, 17 e 18, essa tendência é mais acentuada quando as concentrações do mutagênico são maiores. Também com o aumento do tempo de tratamento caíram a emergência de 98.41 % a 89.18% e a sobrevivência de 99.53% a 94.14% (Tabela 23). Esses resultados estão de acordo com os de KONZAK et alii (1965) segundo os quais o número de plantas sobreviventes é sempre maior nos tratamentos com baixas concentrações durante longo período de tempo. A análise estatística feita segundo o teste t permite dizer que existe uma diferença altamente significativa entre o tratamento das sementes com 1×10^{-3} M ou 5×10^{-3} M de SA (Tabelas 23 e 24) quanto à emergência e sobrevivência.

As maiores porcentagens de letalidade registrada foram encontradas nos experimentos cujas sementes foram tratadas com 5×10^{-3} M de SA. Apesar disso, essa dose que provocou (Exp.6) uma redução sensível da altura das plântulas (Tabela 20) sem causar danos fisiológicos intensos na sobrevivência se revelou satisfatória e poderia ser adotada na condução de futuros trabalhos de melhoramento de plantas por mutação. No entanto, precisa utilizar uma dosagem ainda maior para atingir a LD₅₀ (Tabela 21).

A altura das plântulas, assim como a emergência e a sobrevivência, diminuiu com o aumento da concentração de SA de 1×10^{-3} a 5×10^{-3} M conforme obtido por vários predecessores tais como GUIMARÃES (1978) e FARACCO (1990) entre outros; a porcentagem de crescimento em relação ao controle varia de 96.3 (1×10^{-3} M) a 77,72

(5×10^{-3}) (Tabela 23, Figuras 16, 17 e 18). Os valores da redução de crescimento são tanto maiores quanto mais elevados forem a dose de tratamento e o tempo utilizado.

A análise estatística indicou que o efeito da maior concentração sobre a altura das plântulas é significativo somente quando as sementes são tratadas a pH 3.0; essa tendência se tornou ainda mais evidente com o aumento do tempo de tratamento.

A dose de 1×10^{-3} M teve um efeito estimulante sobre a altura das plântulas no Exp.2 que cresceram 3.31% mais do que o tratamento controle (Tabela 2). Neste sentido, os resultados aproximam-se daqueles obtidos por SARIÉ et alii (1961) que irradiaram sementes de Trigo com doses fracas e crescentes de raios gama.

6.1.2 Efeito do pH da solução de tratamento.

A solução de tratamento é importante para a ação do mutagênico quanto ao seu volume e sua acidez. A quantidade de 1 ml por semente usada e o fato de agitar regularmente os frascos de vidro permitiram obter um tratamento uniforme das sementes. Na análise estatística dos dados para testar os níveis de significância da emergência, altura de plântulas e sobrevivência (Tabelas 11, 12, 14, 15 e 18), o pH é freqüentemente altamente significativo. Os testes de Tukey efetuados para descobrir em que nível de pH dentre os cinco considerados, o efeito da SA foi mais acentuado, sempre mostram que foi o pH 3.0.

Comparando os Exp.1, Exp.2 e Exp.3 com os Exp.4, Exp.5 e Exp.6 onde o tempo de tratamento foi igualmente 4, 8, 12 horas, porém, a dose de SA 1×10^{-3} M e 5×10^{-3} M, respectivamente, pode-se observar que não existem diferenças práticas e estatísticas entre os pH 5.0, 7.0, 9.0 e 11.0 quanto à emergência das plântulas (Tabelas 11 e 12). Além do pH 3.0, os efeitos fisiológicos baseados na altura de plântulas são também

significativos a pH 5.0 quando a concentração de SA for de 5×10^{-3} M (Tabela 15). Quanto à sobrevivência, a acidez das soluções mutagênicas não tem nenhuma significância estatística sempre que a concentração de SA for de 1×10^{-3} M; no entanto, se os mesmos experimentos fossem realizados com uma concentração de 5×10^{-3} M, aquelas soluções mutagênicas, tampadas com pH 3.0, teriam uma alta significância conforme comprovado pelos Exp. 4, Exp.5 e Exp.6 (Tabela 18).

A Partir desse raciocínio, pode-se afirmar que o efeito fisiológico do mutagênico SA é essencialmente ativado em solução tampão ácida (pH 3.0 e pH 5.0 no caso deste experimento) enquanto que em solução alcalina, ela é completamente inefetiva. KLEINHOFs et alii (1974) concluíram semelhantemente para a mutagenicidade da SA em reduzir altura de plântulas de cevada. Por outro lado, considerando o efeito da SA sobre a sobrevivência das plântulas, quando tratada a 5×10^{-3} M, essa concentração pode ser usada com segurança em outros trabalhos de indução de mutação por SA.

6.1.3 Tempo de tratamento.

O tempo de tratamento pode ser um importante fator para facilitar a hidratação dos tecidos em estudo e a penetração do mutagênico. No entanto, para se obter um tratamento adequado, esse intervalo não deve ser prolongado demais para se evitar excessivas injúrias primárias na geração M1.

Na análise estatística dos resultados, o fator tempo se revelou em todos os casos altamente significativo; estudando a intensidade dos efeitos fisiológicos para cada intervalo de tempo, conclui-se que os danos se intensificam para intervalos definidos segundo a concentração de SA usada. Assim, toda vez que esta for:

- 1×10^{-3} M: observa-se mais efeito do mutagênico na seguinte ordem: 12, 4, 8 horas,

- 5×10^{-3} M: a ordem acima referida mudou para: 8, 12, 4 sucessivamente (Tabelas 11, 12, 14, 15, 17, 18).

É claro que no primeiro caso, oito horas são excelentes para a penetração desta quantidade da droga nas membranas celulares da semente. No segundo caso, quatro horas já bastam para se obter as plântulas M1 desejadas.

Essa dedução fica válida para cada um dos três efeitos fisiológicos considerados na geração M1: emergência, altura de plântulas e sobrevivência.

6.1.4 Temperatura de tratamento.

A temperatura de tratamento é um dos vários fatores que podem influenciar a eficiência do mutagênico. No caso deste trabalho, ela é frequentemente inefetiva desde que a dose de SA for de 1×10^{-3} M.

Com a maior dose, o efeito da temperatura se torna altamente significativo para a emergência e a altura de plântulas, sendo significativo ao nível de 5% para a sobrevivência. Este baixo teor de significância se explica pelo problema de atraso na germinação das sementes e conseqüente maior número de sobreviventes registrados 30 dias depois da semeadura.

A temperatura age significativamente somente a 24 ou 28°C, nunca a 20°C. A SA é então mais ativa às dosagens e temperaturas elevadas.

6.2 IRRADIAÇÃO.

Os dados da análise estatística se encontram nas Tabelas 13, 16, 19, 22, 30, 31 e 32, e nas Figuras 7, 23, 24 e 25.

Os danos fisiológicos intensificaram-se com o aumento das 7 dosagens de raios gama; porém, a dose de 32 KR teve quantitativamente menos efeito que as de 24 e de 16 KR na emergência e sobrevivência, o que foi atribuído a um fator extrínseco que pode ser devido provavelmente a problema de amostragem. Estatisticamente, a diferença entre elas não é mais significativa: as quatro dosagens, 8, 16, 24 e 32 KR podem ser consideradas todas iguais ao controle. No entanto, em termos de redução de crescimento, a dose de 32 KR teve um efeito significativamente superior às duas primeiras (Tabelas 13, 16, 19).

Quanto à dose de 40 KR, ela teve igual efeito às cinco primeiras na emergência, diferindo delas na altura e da primeira na sobrevivência (Tabelas 13, 16, 19). Porém seu rendimento ao nível letal é insuficiente (30.94%) e ela excedeu o limite de GR_{50} . Em compensação, entre 32 e 40 KR se situa a dose que poderia reduzir 50% da altura das plantas, o que é geralmente desejado pelos melhoristas (Tabela 22).

A dose de 48 KR matou desde a emergência aproximadamente 60% das plântulas e na sobrevivência esse número subiu até 64.03% (Tabelas 10 e 22). Essa dosagem causou severas injúrias às sementes. Então, julga-se que ela não seria aconselhável num trabalho de melhoramento onde o pesquisador precisaria de suficiente material para conduzir a geração M2. Também, do ponto de vista estatística, ela se afasta das demais significativamente em todos os casos. No entanto, ela poderia ajudar no caso de um experimento preliminar visando a escolha da dose letal capaz de impedir exatamente a germinação de 50% das sementes e de induzir na sobrevivência a outra metade de mutantes sobreviventes. Isto se torna possível porque a DL_{50} fica no intervalo 40-48 KR.

Desta discussão, pode-se deduzir que a dose de 40 KR foi muito útil para o experimento: simultaneamente, ela permitiu com a ajuda das duas dosagens que a encerram, (32 e 48 KR, Tabela 22) a escolha da DL_{50} e da GR_{50} . Para irradiar objetivamente sementes de arroz com raios gama, as melhores dosagens deveriam variar dentro do intervalo 32 - 48 KR inclusivamente a fim de obter com mais chance os mutantes procurados. Já esse experimento satisfaz às sugestões de GUIMARÃES (1978) que recomendava usar maiores dosagens do que 32 KR quem pretende atingir os valores de LD_{50} e GR_{50} .

Foi observada uma regressão altamente significativa e negativa entre altura das plântulas e as doses de raios gama. Quanto maiores as dosagens, menor será o crescimento das plântulas (Figura 23).

6.3 DEPENDÊNCIA ENTRE OS FATORES.

O estudo da dependência entre emergência, altura e sobrevivência das plântulas foi baseado na existência ou não de uma certa regressão significativa entre cada uma delas. Esse cálculo foi inteiramente possível para os experimentos onde a dosagem de SA era 5×10^{-3} M e para a irradiação, pois, nesses casos, os fatores foram sempre significativos. No caso dos tratamentos com 1×10^{-3} M de SA, só foi considerada interessante a relação entre emergência e altura de plântulas pelo fato da sobrevivência ser insignificante nos outros casos e então não de interesse agrônomo. Essa análise demonstrou que:

1. Entre a emergência e a altura das plântulas devido ao tratamento com 1×10^{-3} M, existe uma regressão e correlação altamente significativas e positivas. Além disso, de uma

maneira geral, havia uma chance para altura das plântulas de subir de 0.128 cm para cada plântula que emerge (Fig. 19, $y = -6.59 + 0.128X$).

2. Existe uma relação semelhante à precedente entre emergência e altura das plântulas obtidas depois do tratamento das sementes com a dosagem maior de SA. A variação unitária entre os dados experimentais é de 0.131 cm (Fig. 20).

Dessas relações, pode-se deduzir que: quanto maior a porcentagem de germinação mais elevada será a altura de plântulas.

3. Entre emergência e sobrevivência de um lado, altura e sobrevivência do outro lado, também a regressão e a correlação são altamente significativas e positivas (Fig. 21, 22). Então, o número de sobreviventes tanto como sua altura são diretamente correlacionada à performance das plântulas na emergência.

4. Quando as sementes são irradiadas, a natureza da regressão e da correlação observadas entre emergência e altura das plântulas é semelhante àquelas obtidas depois do tratamento químico: significativas ao nível de 1% e positivas (Fig. 24).

5. Quanto à relação entre emergência e sobrevivência de sementes irradiadas por raios gama, a regressão e a correlação são certamente significativas e positivas; porém segundo a Figura 25, pode acontecer num certo momento que a sobrevivência caia a zero se continuasse a aumentar as doses acima de 48 KR. Isso significa que as plântulas que conseguiriam emergir, serão tão fracas que não viverão até 30 dias.

6. A regressão observada entre altura e sobrevivência de plântulas, qualquer que seja a natureza do tratamento, físico ou químico, é maior que todas aqui citadas, mas a

correlação mais alta é observada entre emergência e sobrevivência dessas plântulas quando tratadas por raios gama.

6.4 COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS COM AZIDA SÓDICA E RAIOS GAMA.

Segundo a discussão até aqui relatada, exceto no caso dos tratamentos de sementes com 1×10^{-3} M de SA onde, por causa de problemas de retardamento ao nível da germinação, a sobrevivência das plântulas não teve valores significativos, em todos os casos, valia a pena tratar as sementes com esse mutagênico.

O efeito da radiação gama foi globalmente mais acentuado. Sua ação enérgica se percebe ao nível da porcentagem elevada de letalidade e da redução drástica de crescimento registrada: até mais de 60% e 70%, respectivamente. Além disso, esta argumentação baseará principalmente na eficiência biológica do tratamento químico relativo ao físico.

Em um certo nível experimental, a ação da SA se aproxima daquela dos raios gama. Os dados da Tabela 20 indicam que nos Exp.1, Exp.4 e Exp.6, a SA provoca especialmente a pH 3.0, uma redução de 30.21%, 58.99% e 70.12%, respectivamente, no crescimento das plântulas, o que é aproximadamente igual para os raios gama que induzem 30.01%, 55.11% e 73.45% de redução de crescimento respectivamente nas dosagens de 32, 40 e 48 KR (Tabela 22).

Também, ao nível da letalidade das plântulas, o mesmo pode ser observado para o efeito da SA (Tabela 21) nos Exp.3, Exp.5 e Exp.6 onde matou respectivamente

0.63% a pH 3.0, 5.48% e 2.38% a pH 7.0 e pH 11.0, e 5.80% a pH 7.0; esses resultados correspondem aproximadamente ao mesmo efeito dos raios gama nas dosagens 8, 24 e 32 KR onde a porcentagem de letalidade foi respectivamente 0.72%, 5.04% e 2.88% (Tabela 22).

Resumidamente, pode-se dizer que, enquanto a ação da SA é extremamente forte a pH 3.0, geralmente a dos raios gama é semelhante às dosagens elevadas.

6.5 RECOMENDAÇÃO E SUGESTÃO.

1. Esse trabalho deve ser continuado avançando-se até mais gerações de maneira que se possa estudar a viabilidade dos possíveis mutantes obtidos: fertilidade, espectro de mutação, performance em relação ao controle, etc.

2. Depois de conduzir um experimento similar com SA e analisar novamente os dados, seria útil formular um outro ensaio com várias concentrações, talvez maiores de SA. Os resultados poderiam ser comparados com doses de raios gama variando entre 32 e 48 KR.

3. Em um experimento similar que seria feito com dois mutagênicos físicos, talvez raios gama e neutrons rápidos, é aconselhável que o pesquisador estude além dos efeitos aqui relatados, a eficiência biológica de um mutagênico relativo a outro.

7. CONCLUSÃO.

Nesse experimento, a SA mostrou-se mais eficiente para reduzir altura do que para induzir uma grande letalidade na sobrevivência das plântulas M1.

A emergência diminuiu com o aumento das concentrações e do tempo de tratamento com SA. Além disso, o material tratado resultou na emergência em uma porcentagem que se revelou freqüentemente inferior à sobrevivência, principalmente quando as sementes são tratadas a pH 3.0. Isso se explica pela inibição momentânea do metabolismo das células em divisão mitótica devido ao efeito da SA.

As sementes irradiadas com raios gama não manifestaram nenhum atraso na emergência. As doses de 40 e 48 KR produziram uma redução significativa na emergência. Foram registradas a pH 3.0 e à dose de 5×10^{-3} M de SA as maiores porcentagens de letalidade, particularmente no Exp.5 com 8 horas de tratamento. As doses de 8, 24 e 32 KR de raios gama provocaram uma porcentagem de letalidade comparável àquela da SA em certos casos.

A altura das plântulas diminuiu drasticamente com o aumento do tempo de tratamento para as sementes tratadas a pH 3.0 com 5×10^{-3} M de SA. Também, diminuiu com o aumento das dosagens de raios gama. As doses de 32, 40 e 48 KR tiveram efeito similar à concentração de 5×10^{-3} M de SA em solução mutagênica de pH 3.0 quanto à redução de crescimento. Entre as dosagens de 32 a 48 KR se encontram os valores de GR_{50} e de LD_{50} . É aconselhável irradiar as sementes de arroz com as dosagens nesse

intervalo para ter mais chance de obter mutantes viáveis.

A temperatura não influencia significativamente a eficiência da SA sobre as sementes. Os casos onde o efeito da SA foi maior se encontram nos tratamentos realizados a 24 ou 28°C com 5×10^{-3} M de SA, a pH 3.0 ou pH 5.0.

Quanto ao tempo de tratamento, os danos fisiológicos se intensificaram segundo que se usou a dose de 1×10^{-3} M ou 5×10^{-3} M na respectiva ordem: 12, 4, 8 ou 8, 12, 4 horas. A emergência, altura e sobrevivência de plântulas dependem todas estreitamente de uma das outras: sua dependência se revela significativa ao nível de 1%. A relação entre elas ainda é mais estreita quando se considera a regressão e a correlação entre altura e sobrevivência.

Em decorrência dos resultados citados anteriormente, conclui-se que a ação da SA foi mais efetiva a pH 3.0, às concentrações e temperaturas elevadas (25 - 30°C) para tratamentos conduzidos adequadamente durante 4 horas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANDO, A. Efeito biológico da combinação de tratamentos com raios-gama, cisteína e algumas substâncias alquilantes sobre sementes de arroz. Piracicaba, ESALQ/USP, 117p., 1970. *Tese de doutoramento*.

ANDO, A.; TULMANN NETO, A. T.; MENTEN J.O.A. Proceeding of the 2nd Japan-Brazil. Symposium on Science and Technology. Rio de Janeiro, 1980, São Paulo, Brasília.

AWAN, M.A.; KONZAK, C.F.; RUTGER J.N.; NILAN R.A. Mutagênic Effects of Sodium azide in Rice. University of California, Davis. Supported in part by I.A.E.A., Vienna, 1980. *Crop Science* 20 (5): 663-667.

CLARK, A.M. Genetic effects of carbon monoxide, cyanide and azide on *Drosophila*, Nature, 1958, 181 (500).

DOLL, H.; SANDFAER, J. "Mutagenic effect of gamma rays diethyl sulfate, ethyl methane sulfonate and various combinations of gamma rays and the chemicals". Induced Mutations in Plants, I.A.E.A., Vienna 1969, p. 195.

FARACCO, A.L.A. Comparações dos efeitos fisiológicos e genéticos causados por radiação gama e azida sódica em dois genótipos de arroz (*Oryza sativa*, L.),

Piracicaba, 74p., 1990. USP/CENA, *Diss. Mestrado*, p. 35-49.

FAY, P.K. and GORECKI, R.S. Stimulating germination of dormant wild oat (*Avena fatua*) seed with sodium azide, *Weed Sci.*, 26: 323-326, 1978.

FEHR, W.R. Principles of cultivar development, vol. 1, cap. 20 - *Mutation Breeding*, 1987. Iowa State University.

GAUL, H. Mutationen in der Pflanzenzüchtung, Z. Pflanzenzuecht. 50, pp. 194-307, 1963.

GAUL, H. "Determination of the suitable radiation dose in mutation experiments", Proc. 2nd Congr. European Association for Research on Plant Breeding, Cologne, 1959a, pp.65-69.

GICHNER, T.; SUACHULOVÁ, J.; VELEMÍNSKÝ, J. and POKORNÝ, V. Recovery methanesulphonate induced genetical damage in barley, Independence of sodium azide treatment, *Biol. Plant.*, 17:202-206, 1975.

GOMES, P.F. Curso de Estatística Experimental, 13^a Edição (Revista e Ampliada), USP/ESALQ, Piracicaba, pp 20-24, 1990.

GUIMARÃES, E.P. Estudos da sensibilidade de sementes de arroz (*Oryza sativa*, L.) à radiação gama, neutrons, sulfato de dietila (DES) e azida sódica (SA). Piracicaba, 1978, *Dissertação mestrado*, 99p. ESALQ/USP.

GUIMARÃES, E.P. & ANDO, A. Efeitos da aplicação dos mutagênicos azida sódica e

radiação gama em sementes de arroz. *Ciência e Cultura*, 32 (5): 619-622, 1980.

HALL, J.E. Radiobiology for the Radiobiologist, second edition, Columbia University, New York 1978, pp.98, 106-107.

HASEGAWA ,H. and INOUE, M. Mutagenic effect of sodium azide in barley. *Japanese J. Breeding*, 30 (1): 20-26, 1980a.

HASEGAWA, H. and INOUE, M. Effects of sodium azide on seedling injury and chlorophyll mutation in rice. *Japanese J. Breeding*, 30 (4): 301-308, 1980b

HASEGAWA, H.; HUSSAIN, S.; NOOR, M.; FORSBERG, J. and EHRENBORG, K. Mutagenicity of hydrazoic acid emanated from azide solution. *Hereditas* 87: 127-128, 1975.

HEINER, R.E. The action of the chemical mutagen diethyl sulfonate on barley. *Ph.D. Thesis*, Wash. State Univ., 1963 pp.103, typed.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Induced Mutation and Plant Improvement, Vienna 1972. I.A.E.A. p. 380.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Neutron, Irradiation of seed II, Vienna 1968, I.A.E.A., p. 180.

KAMRA, O.P.; BRUNNER, H. "Chemicals mutagens", Manual on mutation Breeding *Technical Reports, Series No.119*, IAEA, Vienna 1970, p. 62-72.

KLEINHOF, A.; OWAIS, W.M. and NILAN R.A. Azide. Pullman, WA 99164 (U.S.A.) *Mutation Research*, 55 (3/4): 165-195, 1978.

- KLEINHOFS, A.; SANDER, C.; NILAN, R.A.; KONZAK, C.F. Azide mutagenicity - Mechanism and nature of mutants produced. In: *Poliploidy and Induced mutations in Plant Breeding*, IAEA, Vienna 1974, p. 195-199.
- KONZAK, C.F.; NILAN, R.A.; WAGNER, J. and FOSTER, R.J. "Efficient Chemical Mutagenesis". In: *The use of induced mutations in plant breeding*. Washington State University, Pullman, U.S.A. 1964, pp.49-70.
- KONZAK, C.F.; NILAN, R.A.; FROESE-GERTZEN; EDITH, E., and FOSTER, R.J.,. Factors affecting the biological action of mutagens. *Symposium on mutations*, Prague, 1964 .
- KONZAK, C.F.; NIKNEJAD, M.; WICKHAM, I. and E. Donaldson. Mutagenic interaction of sodium azide on mutations induced in barley seeds treated with diethyl sulfate or N-metyl-N-nitrosourea. *Mut. Res.* 30: 55-62, 1975.
- KONZAK, C.F.; NILAN, R.A.; WAGNER, J. and FOSTER, J.R. Efficient chemical mutagenesis in: *The use of induced mutations in Plant Breeding (Supplement to Radiation Botany)*, pp. 49-70, 1965.
- KONZAK, C.F.; NILAN, R.A.; LEGAULT, R.R. and HEINER. Modification of induced genetic damage in seeds. In: *Effects of Ionizing Irradiations on Seeds*, I.A.E.A, Vienna, 1972.
- LEVY, A. and ASHRI, A. Differential physiological sensitivity of peanut varieties to seed treatments with the mutagens ethidium bromide, MNNG and sodium azide, *Radiat. Bot.* 13:369-373, 1973.
- MANUAL ON MUTATION BREEDING. *Technical Report Series*, No. 119.

International Atomic Agency, Vienna 1977. Cap.3: Chemical Mutagens.

MULLER, A.J. Increasing the effectiveness of mutagenic treatments by inhibitors of metabolism, *Arabidopsis Information Service* 3 (23) 1966.

MUSTAFA, G. Azide mutagenesis in rice. A report submitted for the degree, M.S. in Agronomy, Washington State Univ., Pullmann pp. 85-94. , 1976.

NATARAJAN, A.T. and SHIVASANKAR, G. Studies on modification of mutation response of barley seeds to ethyl methane sulfonate. *Z. verebung Lehre.*, 96: 13-21, 1965.

NIKNEJAD, M. The effect of duration and conditions of posttreatment storage on the physiological damage and mutation frequency of barley treated with different concentrations of sodium azide, p. 132-145. In: H. Gaul (ed.) *Barley Genetics III, Proc. 3rd Int. Barley Genet. Symp. Verlag Karl Thiemig, Munich 1976.*

NILAN, R.A.; SIDERIS, E.G.; KLEINHOF, A.; SANDERS, C.; KONZAK C.F. Azide - a potent mutagen. *Mutation Research*, 17 (1): 142-144. Washington State University, U.S.A., 1973.

NILAN, R.A.; KLEINHOF, A. and KONZAK, C.F. The role of induced mutations in supplementing natural genetic variability. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 287: 367-384, 1977.

NILAN, R.A. and SANDER, C. Azide mutagenicity. Mechanism and nature of mutations produced. In: *Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding. I.A.E.A., Vienna, 1974.*

NILAN, R.A.; KLEINHOF, A. and SANDER, C. Azide mutagenesis in Barley. In:

GAUL, H., Barley Genetics III, Theming Munich, 1976, pp. 113-122.

NISHIMURA, S. and FUTSUHARA, Y. Studies on the induction of mutations in rice by ethylene imine III. Mutagenic activity of ethylene imine on the pre-soaked seeds. *Japan J. Breeding*, 26: 99-109, 1976.

OWAIS, W.M.; ZAROWITZ M.A.; GUNOVICH A.L.; HODGDON and NILAN R.A. A mutagenic *in vivo* metabolic of sodium azide. *Mutat. Res.* 53: 355-358, 1978.

SANDER, C. & MUEHLBAUER, F.H. Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in *Pisum*. *Environmental and Experimental Botany*. Oxford, 17 (1): 43-47, 1976.

SANDER, C.; NILAN, R.A.; KLEINHOF, A. and VIG, B.K. Mutagenic and chromosome breaking effect of azide in Barley and human leucocytes, Pullman, Wash. U.S.A. *Mutation Research* 50 (1): 67-75, 1978.

SARIĆ, M.; CURIĆ, R.; CERIĆ, I. and HADZIJEV, D. Effects of gamma irradiation on the morphophysiological characteristics on the seedlings. In: Effects of Ionizing Radiations on Seeds, I.A.E.A., Institute for Agricultural Research, Novi Sad, Yugoslavia, p. 503-517, 1961.

SARMA, N.P.; PATNAIK, A. and JACHUCK, P.J. Azide mutagenesis in rice - effect of concentration and soaking time on induced chlorophyll frequency. *Environmental and Experimental Botany*, 19 (2): 117-121, 1978.

- SIDERIS, E.G. Physiological and cytogenetical aspects of the effect of sodium azide on irradiated and non-irradiated barley seeds, *Ph D. Thesis* Washington State University, Pullman, 88p., 1968.
- SIDERIS, E.G.; NILAN, R.A. and KONZAK, C.F. Relationship of radiation induced damage in barley seeds to the inhibition of certain oxidoreductases by sodium azide in: *Induced mutations in Plants*, I.A.E.A., Vienna 1969, pp.313-322.
- SIDERIS, E.G. and NILAN, R.A. The effect of a metabolic inhibitor on the frequency of radiation induced chromosome aberrations and mutations in *Hordeum vulgare*. *Radiation Research Abstract*, 43: 245-246, 1970.
- SILHANKOVA, L.; SMIOVSKA, V. and VELEMENSKY, J. Sodium azide induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 61: 191-196, 1979.
- SMEL-AISHY; SALEM, A. ABD-ALLA and EL-KEREDYM.S. Effects of growth substances on rice seedlings grown from seeds irradiated with gamma rays. *Environmental and Experimental Botany*, 16 (1):69-76, 1975.
- SMITH, P.A.S. The Chemistry of Open-Chain Nitrogen Compounds, I, II, Benjamin, New York, ch.10, 1965.
- SMITH, P.A.S. The Chemistry of Open-chain Nitrogen Compounds, III, Benjamin, New York, ch.10., 1966.
- SOBELS, F.H. The effect of the pretreatment with cyanide and azide on the rate of X-ray induced mutations in *Drosophila*, *Z. Vererblehre*, 86 (399) 1954-1955.
- SOBELS, F.H. "The influence of catalase inhibitors on the rate of X-ray induced

mutations in *Drosophila melanogaster*", Proc 1st Int. Photobiol. Congr. Amsterdam, 332 p., 1955.

SPENCE, R.K. The influence of sodium azide on the biological effects of ionizing radiation in moist barley seeds. *M.S. Thesis*. Washington State University, Pullman, 59 p., 1965.

VELEMINSKY, J.; SILHANKOVA, L.; SMIOVSKA, V. and GICHNER, J. Mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*, Mutation Res. 61: 191-196, 1979.

VIGERS, G.A. and ZIEGLER, F.D. Azide inhibition of mitochondrial ATPase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 30: 83-85, 1968.

WALTHER, F. The influence of storage on sodium azide treated barley and on the efficiency of the chemomutagen. In H. Gaul (ed.) Barley genetics III, Proc. 3rd Int. Barley Genet. Symp. Verlag Karl Thieme, Munich pp.123- 133, 1976.

YAMASHITA, A.; UKAI, Y. and YAMAGUCHI, H. Comparison of genetic effects of gamma ray irradiation and treatments of chemicals mutagens in six row barley. *Gamma Field Symposium*, 11:73-92, 1972.

YONETANI T. and RAY G.S., 1965. Studies on cytochrome oxidase. *J. biol. Chem.* 240: 3392-3398.

TABELAS

TABELAS

Tabela 4.- Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.1 em relação ao CTRL considerado como 100%.

pH	Temperatura (°C)	Emergência		Sobrevivência		Altura de plântulas	
		No.	%	No.	%	cm	%
3	20	127	(94.77)	126	(98.44)	23.54	(66.42)
	24	126	(94.03)	*128	(100.00)	26.58	(75.00)
	28	127	(94.77)	*131	(102.34)	24.08	(67.95)
5	20	131	(97.76)	127	(99.22)	32.29	(91.11)
	24	136	(101.49)	127	(99.22)	30.58	(86.29)
	28	130	(97.01)	*134	(104.69)	31.29	(88.29)
7	20	134	(100.00)	129	(100.78)	32.81	(92.58)
	24	135	(100.74)	131	(102.34)	33.31	(93.99)
	28	133	(99.25)	125	(97.66)	31.98	(90.24)
9	20	139	(103.73)	132	(103.12)	33.14	(93.51)
	24	141	(105.22)	*143	(111.72)	37.90	(106.94)
	28	140	(104.48)	133	(103.91)	31.17	(87.95)
11	20	137	(102.24)	130	(101.56)	32.15	(90.72)
	24	131	(97.76)	117	(91.41)	30.53	(86.15)
	28	125	(93.28)	121	(94.53)	33.06	(93.28)

Concentração de SA: 1×10^{-3} M

Tempo de tratamento: 4 horas

* Número de plântulas sobreviventes superiores às emergidas.

Tabela 5.- Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp. 2 em relação ao CTRL considerado como 100%.

pH	Temperatura (°C)	Emergência		Sobrevivência		Altura de plântulas	
		No.	%	No.	%	cm	%
3	20	123	(93.18)	*127	(103.25)	19.98	(77.02)
	24	128	(96.97)	127	(103.25)	22.66	(87.35)
	28	75	(56.82)	*117	(95.12)	15.49	(59.71)
5	20	143	(108.33)	126	(102.43)	26.98	(104.01)
	24	130	(98.48)	121	(98.37)	22.52	(86.82)
	28	136	(103.03)	*137	(111.38)	27.07	(104.36)
7	20	138	(104.54)	118	(95.93)	30.00	(115.65)
	24	131	(99.24)	119	(96.75)	28.57	(110.14)
	28	137	(103.79)	125	(101.63)	29.74	(114.65)
9	20	136	(103.03)	118	(95.93)	28.97	(111.68)
	24	136	(103.03)	119	(96.75)	31.45	(121.24)
	28	135	(102.27)	115	(93.50)	31.72	(122.28)
11	20	139	(105.30)	130	(105.69)	31.85	(122.78)
	24	134	(101.51)	118	(95.93)	30.19	(116.38)
	28	130	(98.48)	121	(98.37)	24.81	(95.64)

Concentração de SA: 1×10^{-3} M

Tempo de tratamento: 8 horas

* Número de plântulas sobreviventes superiores às emergidas.

Tabela 6.- Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.3 em relação ao CTRL considerado como 100%.

pH	Temperatura (°C)	Emergência		Sobrevivência		Altura de plântulas	
		No.	%	No.	%	cm	%
3	20	139	(96.53)	130	(95.59)	37.40	(96.02)
	24	141	(97.92)	131	(96.32)	33.64	(86.37)
	28	146	(101.39)	139	(102.21)	40.18	(103.16)
5	20	140	(97.22)	136	(100.00)	39.08	(100.33)
	24	136	(94.44)	133	(97.79)	37.66	(96.69)
	28	137	(95.14)	123	(90.44)	35.50	(91.14)
7	20	147	(102.08)	145	(106.62)	42.63	(109.45)
	24	138	(95.83)	129	(94.85)	38.32	(98.38)
	28	137	(95.14)	127	(93.38)	36.30	(93.20)
9	20	136	(94.44)	132	(97.06)	36.91	(94.76)
	24	143	(99.31)	135	(99.26)	39.46	(101.31)
	28	142	(98.61)	133	(97.06)	35.12	(90.17)
11	20	139	(96.53)	132	(97.06)	40.35	(103.59)
	24	144	(100.00)	139	(102.21)	38.45	(98.72)
	28	143	(99.31)	140	(102.94)	41.69	(107.03)

Concentração de SA: 1×10^{-3} M

Tempo de tratamento: 12 horas.

Tabela 7.- Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.4 em relação ao CTRL considerado como 100%.

pH	Temperatura (°C)	Emergência		Sobrevivência		Altura de plântulas	
		No.	%	No.	%	No.	%
3	20	90	(81.08)	*113	(95.76)	20.29	(45.99)
	24	80	(72.07)	*111	(94.07)	19.39	(43.95)
	28	41	(36.94)	* 77	(65.25)	14.59	(33.07)
5	20	129	(116.22)	126	(106.78)	40.03	(90.73)
	24	132	(118.92)	131	(111.02)	37.41	(84.79)
	28	137	(123.42)	*143	(121.19)	34.52	(78.24)
7	20	100	(90.09)	*119	(100.85)	41.13	(93.22)
	24	124	(111.71)	*128	(108.47)	40.22	(91.16)
	28	125	(112.61)	121	(102.54)	44.16	(100.09)
9	20	122	(109.91)	121	(102.54)	44.14	(100.04)
	24	120	(108.11)	*128	(108.47)	41.65	(94.40)
	28	101	(90.99)	*104	(88.14)	44.87	(101.69)
11	20	110	(99.10)	*111	(94.07)	41.93	(95.04)
	24	115	(103.60)	114	(96.61)	41.21	(93.40)
	28	113	(101.80)	*116	(98.30)	37.47	(84.93)

Concentração de SA: 5×10^{-3} M

Tempo de tratamento: 4 horas

* Número de plântulas sobreviventes superiores às emergidas.

Tabela 8.- Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.5 em relação ao CTRL considerado como 100%.

pH	Temperatura (°C)	Emergência		Sobrevivência		Altura de plântulas	
		No.	%	No.	%	cm	%
3	20	113	(80.71)	*122	(87.14)	27.29	(41.93)
	24	64	(45.71)	*105	(75.00)	19.12	(29.38)
	28	64	(45.71)	* 97	(69.29)	18.35	(28.20)
5	20	130	(92.86)	130	(92.86)	50.36	(77.38)
	24	133	(95.00)	132	(94.29)	50.94	(78.27)
	28	132	(94.29)	128	(91.43)	49.07	(75.40)
7	20	135	(96.43)	133	(95.00)	58.85	(90.43)
	24	135	(96.43)	129	(92.14)	54.97	(84.46)
	28	136	(97.14)	135	(96.43)	56.19	(86.34)
9	20	141	(100.71)	137	(97.86)	61.09	(93.87)
	24	131	(93.57)	129	(92.14)	54.62	(83.93)
	28	137	(97.86)	135	(96.43)	64.39	(98.94)
11	20	138	(98.57)	137	(97.86)	65.95	(101.34)
	24	139	(99.29)	135	(96.43)	59.74	(91.79)
	28	140	(100.00)	138	(98.57)	62.71	(96.36)

Concentração de SA: 5×10^{-3} M

Tempo de tratamento: 8 horas

* Número de plântulas sobreviventes superiores às emergidas.

Tabela 9.- Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.6 em relação ao CTRL considerado como 100%.

pH	Temperatura (°C)	Emergência		Sobrevivência		Altura de plântulas	
		No.	%	No.	%	cm	%
3	20	54	(38.03)	*122	(88.41)	17.05	(34.32)
	24	29	(20.42)	*129	(93.48)	14.87	(29.93)
	28	22	(15.49)	*100	(72.46)	12.62	(25.40)
5	20	126	(87.73)	126	(91.30)	37.58	(75.64)
	24	122	(88.41)	122	(88.41)	36.50	(73.47)
	28	127	(92.03)	127	(92.03)	35.43	(71.32)
7	20	130	(94.20)	130	(94.20)	44.63	(89.83)
	24	127	(92.03)	127	(92.03)	45.43	(91.44)
	28	133	(96.38)	133	(96.38)	42.05	(84.64)
9	20	133	(96.38)	133	(96.38)	42.79	(86.13)
	24	126	(91.30)	126	(91.30)	44.51	(89.59)
	28	130	(94.20)	130	(94.20)	43.05	(86.65)
11	20	136	(98.55)	136	(98.55)	46.08	(92.75)
	24	126	(91.30)	126	(91.30)	42.95	(86.45)
	28	123	(89.13)	123	(89.13)	45.35	(91.28)

Concentração de SA: 5×10^{-3} M

Tempo de tratamento: 12 horas

* Número de plântulas sobreviventes superiores às emergentes.

Tabela 10.-Número total e porcentagem de emergência, sobrevivência e altura de plântulas nas condições do Exp.7 em relação ao CTRL considerado como 100%.

Dosagens (KR)	Emergência		Sobrevivência		Altura de plântulas	
	No.	%	No.	%	No.	%
0	143	(100.00)	139	(100.00)	42.79	(100.00)
8	142	(99.30)	138	(99.28)	44.33	(103.60)
16	132	(92.31)	127	(91.36)	41.18	(96.24)
24	136	(95.10)	132	(94.96)	36.81	(86.02)
32	139	(97.20)	135	(97.12)	29.95	(69.99)
40	109	(76.22)	96	(69.06)	19.21	(44.89)
48	58	(40.56)	50	(35.97)	11.36	(26.55)

Tabela 11.- Análise de variância de emergência de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração 1×10^{-3} M)

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	75.91		
Tratamentos	44	1677.07	38.12	3.14**
Tempo	2	294.71	147.35	12.14**
Temperatura	2	68.13	34.07	2.81 ^{ns}
pH	4	301.96	75.49	6.22**
Tempo x temperatura	4	93.29	23.32	1.92 ^{ns}
Tempo x pH	8	379.51	47.44	3.91**
Temperatura x pH	8	122.31	15.29	1.26 ^{ns}
Tempo x Temperatura x pH	16	417.16	26.07	2.15*
Resíduo	88	1068.75	12.14	
Total	134	2821.73		

* significância ao nível de 5% de probabilidade.

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

ns diferença não significativa.

Teste de Tukey para médias do fator tempo.

Tempo (hora)	Médias	$\alpha = 0.05$
12	46.844	A
4	44.267	B
8	43.356	B

$\Delta = 1.7515$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de temperatura.

Temperatura (°C)	Médias	$\alpha = 0.05$
20	45.511	A
24	45.111	A
28	43.844	A

$$\Delta = 1.7155$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de pH.

pH	Médias	$\alpha = 0.05$
9	46.222	A
7	45.556	A
11	45.259	A
5	45.148	A
3	41.926	B

$$\Delta = 2.6417$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 12.- Análise de variância de emergência de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração 5×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	32.13		
Tratamentos	44	14447.40	328.96	27.90**
Tempo	2	614.71	307.36	26.07**
Temperatura	2	169.73	84.87	7.20**
pH	4	19940.62	2735.16	232.00**
Tempo x temperatura	4	117.29	29.32	2.49*
Tempo x pH	8	1465.07	183.13	15.53**
Temperatura x pH	8	897.38	112.17	9.51**
Tempo x Temperatura x pH	16	269.60	16.85	1.43 ^{ns}
Resíduo	88	1037.20	11.79	
Total	134	15543.73		

* significância ao nível de 5% de probabilidade.

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

ns diferença não significativa.

Teste de Tukey para médias do fator tempo.

Tempo (hora)	Médias	$\alpha = 0.05$
12	41.511	A
4	37.933	B
8	36.422	B

$\Delta = 1.7255$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de temperatura.

Temperatura (°C)	Médias	$\alpha = 0.05$
20	40.067	A
24	38.467	A
28	37.333	B

$$\Delta = 1.7255$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de pH.

pH	Médias	$\alpha = 0.05$
9	43.741	A
7	43.000	A
11	42.963	A
5	42.778	A
3	20.630	B

$$\Delta = 2.6417$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 13.- Análise de variância de emergência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	1173.7619	1173.7619	62.51**
Regressão quadrática	1	491.6825	491.6825	26.18**
Regressão cúbica	1	193.3889	193.3889	10.30**
Regressão de 4º grau	1	4.7164	4.7164	1.52 ^{ns}
Regressão de 5º grau	1	26.6826	26.6826	1.42 ^{ns}
Regressão de 6º grau	1	0.5772	0.5772	0.03 ^{ns}
(Tratamentos)	(6)	(1895.8095)		
Blocos	2	72.6667		
Resíduos	12	225.3333	18.7778	
Total	20	2193.8095		

** significância ao nível de 1% de probabilidade.
^{ns} diferença não significativa.

Teste de Tukey para médias de tratamento.

Tratamento	Médias	$\alpha = 0.05$
0	47.667	A
8	47.333	A
32	46.333	A
24	45.333	A
16	44.000	A
40	36.333	A
48	19.333	B

$\Delta = 12.383$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Regressão linear: $y = 52.1190 - 0.4673x$

$r = 0.7315^{ns}$

Regressão quadrática: $y = 45.1349 + 0.5803x_1 - 0.0218x_2$

Regressão cúbica: $y = 48.4127 - 0.7854x_1 + 0.0505x_2 - 0.0011x_3$

Tabela 14.- Análise de variância de altura de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração: 1×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	87.74		
Tratamentos	44	532.38	12.01	5.92**
Tempo	2	331.52	165.76	81.65**
Temperatura	2	4.11	2.06	1.01 ^{ns}
pH	4	103.40	25.85	12.73**
Tempo x temperatura	4	3.66	0.92	0.45 ^{ns}
Tempo x pH	8	40.38	5.05	2.48*
Temperatura x pH	8	12.67	1.58	0.78 ^{ns}
Tempo x Temperatura x pH	16	36.64	2.29	1.13 ^{ns}
Resíduo	88	179.00	2.03	
Total	134	799.12		

* significância ao nível de 5 % de probabilidade.

** significância ao nível de 1 % de probabilidade.

ns diferença não significativa.

Teste de Tukey para médias do fator tempo.

Tempo (hora)	Médias	$\alpha = 0.05$
12	12.726	A
4	10.320	B
8	8.933	C

$\Delta = 0.7168$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de temperatura.

Temperatura (°C)	Médias	$\alpha = 0.05$
20	10.846	A
24	10.707	A
28	10.427	A

$$\Delta = 0.7168$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de pH.

pH	Médias	$\alpha = 0.05$
9	11.327	A
7	11.247	A
11	11.225	A
5	10.480	A
3	9.020	B

$$\Delta = 1.0811$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 15.- Análise de variância de altura de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (concentração: 5×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	22.21		
Tratamentos	44	2894.96	65.79	53.49**
Tempo	2	634.24	317.12	257.82**
Temperatura	2	18.28	9.14	7.43**
pH	4	2088.09	522.02	424.40**
Tempo x temperatura	4	9.32	2.33	1.89 ^{ns}
Tempo x pH	8	101.39	12.67	10.30**
Temperatura x pH	8	21.86	2.73	2.22*
Tempo x Temperatura x pH	16	21.78	1.36	1.1 ^{ns}
Resíduo	88	108.67	1.23	
Total	134	3025.84		

* significância ao nível de 5 % de probabilidade.

** significância ao nível de 1 % de probabilidade.

ns diferença não significativa.

Teste de Tukey para médias do fator tempo.

Tempo (hora)	Médias	$\alpha = 0.05$
8	16.748	A
12	12.242	B
4	12.062	B

▲ = 0.5585

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de temperatura.

Temperatura (°C)	Médias	$\alpha = 0.05$
20	14.204	A
28	13.412	B
24	13.436	B

$$\Delta = 0.5585$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de pH.

pH	Médias	$\alpha = 0.05$
11	16.422	A
9	16.337	A
7	15.838	A
5	13.764	B
3	6.058	C

$$\Delta = 0.8423$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 16.- Análise de variância de altura de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	288.8235	288.8235	202.91**
Regressão quadrática	1	32.0572	32.0572	22.52**
Regressão cúbica	1	1.3448	1.3448	0.94 ^{ns}
Regressão de 4º grau	1	0.2020	0.2020	0.14 ^{ns}
Regressão de 5º grau	1	0.6604	0.6604	0.46 ^{ns}
Regressão de 6º grau	1	0.0048	0.0048	0.00
(Tratamentos)	(6)	323.0927		
Blocos	2	10.1738		
Resíduos	12	17.0808	1.4234	
Total	20	350.0808		

** significância ao nível de 1% de probabilidade.
^{ns} diferença não significativa.

Regressão linear: $y = 16.3071 - 0.2318x$
 $r = 0.9080^{ns}$

Regressão quadrática: $y = 14.5238 + 0.0357x_1 - 0.0056x_2$
 $r = 0.3025^{ns}$

Teste de Tukey para médias de tratamento.

Tratamento	Médias	$\alpha = 0.05$
8	14.777	A
0	14.263	A
16	13.727	A
24	12.270	A B
32	9.983	B
40	6.403	C
48	3.787	C

$\Delta = 3.4093$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 17.- Análise de variância do número de plântulas sobreviventes originadas de sementes tratadas com SA (concentração: 1×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	56.19		
Tratamentos	44	788.11	17.91	
Tempo	2	308.68	154.34	10.66**
Temperatura	2	5.53	2.76	0.19 ^{ns}
pH	4	7.58	1.89	0.13 ^{ns}
Tempo x temperatura	4	8.43	2.11	0.15 ^{ns}
Tempo x pH	8	164.73	20.59	1.42 ^{ns}
Temperatura x pH	8	55.66	6.96	0.48 ^{ns}
Tempo x Temperatura x pH	16	237.50	14.84	1.02 ^{ns}
Resíduo	88	1274.47	14.48	
Total	134	2118.77		

* significância ao nível de 5% de probabilidade.

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

ns diferença não significativa.

Teste de Tukey para médias do fator tempo.

Tempo (hora)	Médias	$\alpha = 0.05$
12	44.533	A
4	42.978	A
8	40.844	B

$\Delta = 1.9127$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de temperatura.

Temperatura (°C)	Médias	$\alpha = 0.05$
20	43.067	A
28	42.689	B
24	42.600	B

$$\Delta = 1.9127$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de pH.

pH	Médias	$\alpha = 0.05$
5	43.111	A
9	42.963	A
3	42.815	A
7	42.519	A
11	42.519	A

$$\Delta = 2.8847$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 18.- Análise de variância do número de plântulas sobreviventes originadas de sementes tratadas com SA (concentração: 5×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	5.17		
Tratamentos	44	2325.48	52.85	4.95**
Tempo	2	314.33	157.65	14.76**
Temperatura	2	94.24	47.12	4.41*
pH	4	912.81	228.20	21.37**
Tempo x temperatura	4	65.45	16.36	1.53 ^{ns}
Tempo x pH	8	320.78	40.10	3.75**
Temperatura x pH	8	404.43	50.55	4.73**
Tempo x Temperatura x pH	16	213.44	13.34	1.25 ^{ns}
Resíduo	88	939.50	10.68	
Total	134	3270.15		

* significância ao nível de 5% de probabilidade.

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

ns diferença não significativa.

Teste de Tukey para médias do fator tempo.

Tempo (hora)	Médias	$\alpha = 0.05$
8	42.711	A
12	42.000	A
4	39.178	B

$\Delta = 1.6422$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de temperatura.

Temperatura (°C)	Médias	$\alpha = 0.05$
20	42.133	A
24	41.600	A B
28	40.156	B

$$\Delta = 1.9127$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Teste de Tukey para médias de pH.

pH	Médias	$\alpha = 0.05$
5	43.148	A
7	42.778	A
9	42.333	A
11	42.074	A
3	36.148	B

$$\Delta = 2.4768$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 19.- Análise de variância do número de plântulas sobreviventes originadas de sementes irradiadas com raios gama.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	1400.5833	1400.5833	62.20**
Regressão quadrática	1	540.3214	540.3214	24.00**
Regressão cúbica	1	168.0556	168.0556	7.46*
Regressão de 4º grau	1	0.6255	0.6255	0.03 ^{ns}
Regressão de 5º grau	1	56.1945	56.1945	2.50 ^{ns}
Regressão de 6º grau	1	2.0292	2.0292	0.09 ^{ns}
(Tratamentos)	(6)	(2167.8095)		
Blocos	2	73.8095		
Resíduos	12	270.1905	22.5158	
Total	20	2511.8095		

* significância ao nível de 5% de probabilidade.

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

^{ns} diferença não significativa.

Regressão linear: $y = 51.1548 - 0.5104x$

$$r = 0.7467^{ns}$$

Regressão quadrática: $y = 43.8300 + 0.5878x_1 - 0.0229x_2$

$$r = 0.4638^{ns}$$

Regressão cúbica: $y = 46.8889 - 0.6853x_1 + 0.0497x_2 - 0.0009x_3$

$$r = 0.2587^{ns}$$

Teste de Tukey para médias de tratamento.

Tratamento	Médias	$\alpha = 0.05$
0	46.333	A
8	46.000	A
32	45.000	A B
24	44.000	A B
16	42.333	A B
40	32.000	B
48	16.667	C

$$\Delta = 13.56$$

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 20.- Redução média de altura de plântulas no caso dos experimentos com SA em 3 temperaturas. Valores de GR (%).

pH	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6
3	30.21	25.31	4.82	58.99	66.83	70.12
5	11.44	1.60	3.95	15.41	22.98	26.52
7	7.73	-	-	5.18	12.92	11.36
9	3.87	-	-	1.29	7.75	12.54
11	9.95	-	-	8.88	3.50	9.84

Tabela 21.- Dose letal no caso dos experimentos com SA. Valores de LD (%).

pH	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6
3	-	-	0.63	14.97	22.86	15.22
5	-	-	3.92	-	7.14	9.42
7	-	1.90	1.72	-	5.48	5.80
9	-	4.61	1.96	0.28	4.52	6.04
11	4.17	0.00	-	3.67	2.38	7.01

Tabela 22.- Redução de média de altura de plântulas (GR %) e dose letal (LD %) no caso do experimento com raios gama.

Dosagens (KR)	8	16	24	32	40	48
GR (%)	-	3.76	13.98	30.01	55.11	73.45
LD (%)	0.72	8.64	5.04	2.88	30.94	64.03

Tabela 23.- Porcentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes, e altura média das plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 4, 8 e 12 horas em relação ao CTRL considerado como 100% .

Exp.	Dose ($\times 10^{-3}$ M)	Emergência	Sobrevivência	Altura de plântulas
1	1	99.10	100.73	87.36
2	1	98.53	99.62	103.31
3	1	97.59	98.23	98.02
4	5	98.44	99.60	82.04
5	5	88.95	91.52	77.20
6	5	80.14	91.30	73.92

Tabela 24.- Médias³ obtidas para cada dose e efeito em função do tempo de tratamento.

Efeito	Dose ($\times 10^{-3}$ M)	Tempo (hora)		
		4	8	12
Emergência	1	44.267 A	43.356 A	46.844 A
	5	36.422 B	41.511 B	37.933 B
Altura	5	12.062 A	16.748 A	12.726 A
	1	10.320 B	8.933 B	12.242 A
Sobrevivência	1	42.978 A	40.844 A	44.533 A
	5	39.178 B	42.711 B	42.000 B

³ Médias seguidas de letras distintas diferem entre si.

Tabela 25.-Valores e nível de significância de t experimental.

Efeito	Tempo (hora)		
	4	8	12
Emergência	t = 9.80**	t = 2.45**	t = 16.85**
Altura	t = 6.99**	t = 26.59**	t = 1.77 ^{ns}
Sobrevivência	t = 6.46**	t = 2.80**	t = 4.28**

$t_{05} = 2.00$ e $t_{01} = 2.66$

* significância ao nível de 5% de probabilidade.

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

ns diferença não significativa.

Tabela 26.- Análise de regressão linear entre emergência (x) e altura de plântulas (y) independentemente do tempo de tratamento (concentração de SA 1×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	7.72	7.72	17.95**
Desvio da regressão	13	5.65	0.43	
Total	14	13.37		

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

Coefficiente de correlação: $r = 0.7598^{**}$

Equação de regressão: $y = -6.59 + 0.128x$

Tabela 27.- Análise de regressão linear entre emergência (x) e altura de plântulas (y) independentemente do tempo de tratamento (concentração de SA: 5×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	205.51	205.51	86.35**
Desvio da regressão	13	30.97	2.38	
Total	14	236.48		

** significância ao nível de 1 % de probabilidade.

Coefficiente de correlação: $r = 0.9322^{**}$

Equação de regressão: $y = -1.48 + 0.131x$

Tabela 28.- Análise de regressão linear entre emergência (x) e o número de plântulas sobreviventes (y) independentemente do tempo de tratamento (concentração de SA: 5×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	1172.86	1172.86	63.88**
Desvio da regressão	13	238.68	18.36	
Total	14	1411.54		

** significância ao nível de 1 % de probabilidade.

Coefficiente de correlação: $r = 0.9115^{**}$

Equação de regressão: $y = 87.67 + 0.313x$

Tabela 29.- Análise de regressão linear entre altura de plântulas (x) e o número de sobreviventes (y) independentemente do tempo de tratamento (concentração de SA: 5×10^{-3} M).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	863.14	863.14	20.46**
Desvio da regressão	13	548.40	42.18	
Total	14	1411.54		

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

Coefficiente de correlação: $r = 0.7820^{**}$

Equação de regressão: $y = 97.75 + 1.910x$

Tabela 30.- Análise de regressão linear entre emergência (x) e altura de plântulas (y) originadas de sementes irradiadas com raios gama.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	763.2909	763.2909	18.528**
Desvio da regressão	5	205.9872	41.1974	
Total	6	969.2781		

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

Coefficiente de correlação: $r = 0.8874^{**}$

Equação de regressão: $y = -12.722 + 0.366x$

Tabela 31.- Análise de regressão linear entre emergência (x) e sobrevivência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	6457.8911	6457.8911	709.075**
Desvio da regressão	5	45.5374	9.1075	
Total	6	6503.4285		

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

Coeficiente de correlação: $r = 0.9964^{**}$

Equação de regressão: $y = -14.048 + 1.066x$

Tabela 32.- Análise de regressão linear entre altura e sobrevivência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	5341.0578	5341.0578	22.975**
Desvio da regressão	5	1162.3707	232.4741	
Total	6	6503.285		

** significância ao nível de 1% de probabilidade.

Coeficiente de correlação: $r = 0.9063^{**}$

Equação de regressão: $y = 41.0505 + 2.3474x$

FIGURAS

Figura 01: Modelo de curva ilustrando o efeito de dose crescente sobre danos fisiológicos (Fontes: Manual on Mutation Breeding, 1977. Technical Report Series, Nº 119. International Atomic Energy Agency, Vienna. Cap. 5: Mutagen effects observable in the first generation).

Concentração de SA: 1×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 4 horas

Figura 02: Emergência das sementes nas condições do experimento 1, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: $1 \times 10^{-3} \text{ M}$
Tempo de Tratamento: 8 horas

Figura 03: Emergência das sementes nas condições do experimento 2, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 4 horas

Figura 04: Emergência das sementes nas condições do experimento 4, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 8 horas

Figura 05: Emergência das sementes nas condições do experimento 5, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: $5 \times 10^{-3} \text{ M}$
Tempo de Tratamento: 12 horas

Figura 06: Emergência das sementes nas condições do experimento 6, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Figura 07: Emergência, sobrevivência e altura de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama, em relação ao controle considerado como 100,00%

Concentração de SA: 1×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 4 horas

Figura 08: Altura de plântulas nas condições do experimento 1, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 1×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 8 horas

Figura 09: Altura de plântulas nas condições do experimento 2, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 4 horas

Figura 10: Altura de plântulas nas condições do experimento 4, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 8 horas

Figura 11: Altura de plântulas nas condições do experimento 5, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 12 horas

Figura 12: Altura de plântulas nas condições do experimento 6, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 4 horas

Figura 13: Sobrevivência das plântulas nas condições do experimento 4, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 8 horas

Figura 14: Sobrevivência das plântulas nas condições do experimento 5, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Concentração de SA: 5×10^{-3} M
Tempo de Tratamento: 12 horas

Figura 15: Sobrevivência das plântulas nas condições do experimento 6, em relação ao controle considerado como 100,00%.

Figura 16: Percentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes, e altura média de plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 4 horas (em relação ao controle considerado como 100,00%).

Figura 17: Percentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes, e altura média de plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 8 horas (em relação ao controle considerado como 100,00%).

Figura 18: Percentagem média de plântulas emergidas e sobreviventes, e altura média de plântulas originadas de sementes tratadas com SA durante 12 horas (em relação ao controle considerado como 100,00%).

Figura 19: Regressão e correlação entre emergência e altura de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (Dose $1 \times 10^{-3} M$)

Figura 20: Regressão e correlação entre emergência e altura de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (Dose $5 \times 10^{-3} M$)

Figura 21: Regressão e correlação entre emergência e sobrevivência de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (Dose $5 \times 10^{-3}M$)

Figura 22: Regressão e correlação entre altura e sobrevivência de plântulas originadas de sementes tratadas com SA (Dose $5 \times 10^{-3} M$)

Figura 23: Regressão e correlação entre doses de raios gama (KR) e altura de plântulas após a irradiação das sementes

Figura 24: Regressão e correlação entre emergência e altura de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama

Figura 25: Regressão e correlação entre emergência e sobrevivência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama

Figura 26: Regressão e correlação entre altura e sobrevivência de plântulas originadas de sementes irradiadas com raios gama