ESTUDOS SOBRE RADIOSSENSITIVIDADE EM POPULAÇÕES DE *Centrosema pubescens* BENTH

Maria Isabel de Oliveira Penteado

Orientador: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

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.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro, 1982

À todos aqueles que, conhecendo a real necessidade da luta, nela se empenham e por ela vão até o fim.

-: AGRADECIMENTOS :-

A autora manifesta seus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente contribuiram para a realização deste trabalho e, de forma especial:

- Ao Professor *Dr. Paulo Sodero Martins*, pela orientação, apoio, estímulo e amizade demonstrados não apenas na condução deste trabalho, mas ao longo do tempo de convivência.

- Ao Professor *Dr. Akihiko Ando*, pela grande colaboração e valiosas sugestões na condução da pesquisa, bem como pelas facilidades concedidas junto ao Setor de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

- Ao Professor *Dr. Ernesto Paterniani*, chefe do Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelas facilidades concedidas.

- Ao Professor *Dr. José Branco de Miranda Filho*, do Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Zootecnista *Luiz Otávio Campos da Silva*, do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, EMBRAPA, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

- Ao *Departamento de Física e Meteorologia*, na pessoa do Prof. *Dr. Nilson Villa Nova*, pelo empréstimo do material e valorosa colaboração.

- Aos Engenheiros Agrônomos *Eduardo Mogrovejo J.*, *Rosita Benitez Portillo* e *Vânia Moda Cirino*, pela amizade, apoio e confiança.

- À *todos os companheiros do Setor de Genética Ecológica*, de modo especial às Eng. Agrônomas *Maria Lídia Paterniani* e *Angela Maria Maluf*, pelo auxílio na coleta de dados.

- Aos *colegas do Curso de Pós-Graduação*, pelos bons momentos, juntos desfrutados.

- Aos funcionários *Sr. Alaor de Oliveira e Ronaldo José Rabello*, do Departamento de Genética e *Benedita Inês Possignolo*, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela solicitude nos trabalhos prestados.

- Ao *Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)*, pelo uso da Fonte de Cobalto.

- Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* e à *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, pela concessão de bolsa de estudos.

- À *meus pais*, pelo apoio e estímulo recebidos no transcorrer de toda formação profissional.

ÍNDICE

Página

RESUMO xi

SUMMARY xiii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 5

2.1. Considerações sobre o uso de radiações ionizantes 6

2.1.1. Uso de radiações em sementes 8

2.1.2. Estimativas dos efeitos das radiações . . 14

2.1.3. Efeito estimulante de baixas doses . . . 28

2.1.4. Radiação e melhoramento 30

2.2. Considerações sobre o material: *Centrosema pubescens* 36

3. MATERIAL E MÉTODOS 40

3.1. Teste de germinação 41

3.2. Teste preliminar de radiossensitividade 42

3.3. Teste definitivo de radiossensitividade 46

3.3.1. Caracteres avaliados 48

3.3.1.1. Porcentagem de germinação . . . 48

3.3.1.2. Altura de plântulas 49

3.3.1.3. Número de manchas nas folhas primárias 49

Página

3.3.1.4. Porcentagem de sobrevivência.. 50

3.3.1.5. Altura de plantas. 51

3.3.1.6. Comprimento de raízes. 51

3.3.1.7. Área foliar. 52

3.3.1.8. Razão de área foliar 54

3.3.1.9. Relação parte aérea - raiz. . . 55

3.3.2. Duração e época das repetições. 55

3.3.3. Análise estatística dos dados 57

4. RESULTADOS. 61

4.1. Teste de germinação. 61

4.2. Ensaio preliminar de radiossensitividade . . . 62

4.3. Teste definitivo de radiossensitividade. . . . 63

4.3.1. Porcentagem de germinação 64

4.3.2. Altura de plântulas. 66

4.3.3. Número de manchas nas folhas primárias 67

4.3.4. Porcentagem de sobrevivência. 68

4.3.5. Altura de plantas. 70

4.3.6. Comprimento de raízes 71

4.3.7. Área foliar. 72

4.3.8. Razão de área foliar 73

4.3.9. Relação parte aérea/raiz. 74

4.4. Outras observações. 75

Página

5. DISCUSSÃO. 77

5.1. Porcentagem de germinação. 77

5.2. Altura de plântulas. 79

5.3. Manchas nas folhas primárias 82

5.4. Porcentagem de sobrevivência 85

5.5. Altura de plantas. 87

5.6. Comprimento de raízes. 90

5.7. Área foliar. 92

5.8. Razão de área foliar. 93

5.9. Relação parte aérea/raiz 94

5.10. Outras observações. 95

6. CONCLUSÕES. 98

7. BIBLIOGRAFIA. 101

8. TABELAS 115

9. FIGURAS 130

10. APÊNDICE. 137

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1 -	Identificação das diferentes populações de *C. pubescens* utilizadas nesse ensaio, após multiplicação na Fazenda Areião, Piracicaba. Data de colheita: set./out. de 1979. . .	116
2 -	Porcentagem de germinação de *C. pubescens*, em teste executado em germinador a 25°C, no escuro. Média de 3 repetições.	117
3 -	Análise de variância para os caracteres analisados em *C. pubescens* com 4 doses de radiação (0, 12, 24 e 36 KR), e respectivos coeficientes de variação. Ensaio de radiossensitividade.	118
4 -	Análise de variância para os caracteres analisados em *C. pubescens* com 3 doses (0, 12, e 24 KR) e respectivos coeficientes de variação. Ensaio de radiossensitividade. . .	119
5 -	Comparação de médias do efeito de população de *C. pubescens*, pelo teste de Tuckey, a 1% de probabilidade, para os caracteres germinação (com 4 doses) e altura de plântulas (com 3 doses). Ensaio de radiossensitividade.	120

Tabela | Página

6 - Comparações de médias do efeito de doses, pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade, para os caracteres avaliados em *C. pubescens*, com 4 doses de radiação (1 = 0 KR, 2 = 12 KR; 3 = 24 KR; 4 = 36 KR). Ensaio de radiossensitividade. 121

7 - Comparação de médias do efeito das doses, pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade, para os caracteres avaliados em *C. pubescens*, com 3 doses de radiação (1 = 0 KR; 2 = 12 KR; 3 = 24 KR). Ensaio de radiossensitividade. 122

8 - Comparação de médias do efeito da interação dose X época, pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade, para o caráter altura de plantas, avaliado com 4 doses em *C. pubescens*. Ensaio de radiossensitividade. . . . 123

9 - Comparação de médias do efeito da interação dose X época, pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade, para o caráter comprimento de raízes, avaliado com 4 doses, em *C. pubescens*. Ensaio de radiossensitividade. . . . 124

10 - Comparação de médias do efeito da interação dose X época, pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade, para o caráter área foliar, avaliado com 3 doses, em *C. pubescens*. Ensaio de radiossensitividade. 125

Tabela | Página

11 - Equações de regressão, obtidas segundo o modelo $\hat{y} = b_o + b\ (x - \bar{x})$, para os caracteres analisados em *C. pubescens*, com 4 doses de radiação. Ensaio de radiossensitividade. . 126

12 - Equações de regressão, obtidas segundo o modelo $\hat{y} = b_o + b\ (x - \bar{x})$, para os caracteres analisados em *C. pubescens*, com 3 doses de radiação. Ensaio de radiossensitividade. . 127

13 - Correlações entre os caracteres avaliados em *C. pubescens*, com 3 doses de radiação. Ensaio de radiossensitividade. 128

14 - Dados obtidos da determinação gráfica da GR_{50} ("growth reduction"); LD_{50} ("lethal dose") e LD_{30} para as populações de *C. pubescens*. Unidade: KR. Ensaio de radiossensitividade 129

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	- Determinação gráfica da GR_{50} para 20 populações de *C. pubescens*. Ensaio preliminar de radiossensitividade.	131
2	- Determinação gráfica da LD_{50} para 20 populações de *C. pubescens*. Ensaio preliminar de radiossensitividade.	132
3	- Determinação gráfica da GR_{50} e da LD_{50} nas 20 populações de *C. pubescens*, para a época de inverno. Ensaio de radiossensitividade.	133
4	- Determinação gráfica da GR_{50} e da LD_{50} nas 20 populações de *C. pubescens*, para a época de verão. Ensaio de radiossensitividade...	135

ESTUDOS SOBRE RADIOSENSITIVIDADE EM POPULAÇÕES DE *Centrosema pubescens* BENTH

Maria Isabel de Oliveira Penteado
- Autor -

Paulo Sodero Martins
- Orientador -

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos, estudar a viabilidade da utilização de raios γ como indutores de variabilidade em *Centrosema pubescens* Benth, determinar a radiossensitividade do material e testar a metodologia de avaliação.

Foram estudadas 20 populações de diferentes origens, submetidas a 5 dosagens de raios γ (0, 12, 24, 36 e 48 KR), provenientes de bomba de Cobalto-60. O delineamento estatístico utilizado foi o esquema fatorial, com 5 repetições no tempo, incluindo 2 épocas do ano (verão e inverno).

A determinação da radiossensitividade foi feita com base nos caracteres: germinação, altura de plântulas, sobrevivência, número de manchas em folhas primárias, altura

de plantas, comprimento de raiz, área foliar, razão de área foliar e relação parte aérea-raiz.

A análise de variância dos dados, mostrou comportamento diferencial de populações apenas nos caracteres germinação e sobrevivência.

Os caracteres medidos cerca de 10 dias após a germinação, foram considerados mais apropriados à determinação de radiossensitividade.

Foram estimadas as correlações entre os caracteres avaliados, sendo que a maior delas foi de 77,49% entre área foliar e altura de plantas.

O material *Centrosema pubescens* respondeu muito bem ao tratamento com raios γ, mostrando ser perfeitamente viável a aplicação deste método para indução de mutação.

Foi possível estimar uma constante para a obtenção da dose a ser utilizada em programas de melhoramento e, para o material estudado, a melhor dosagem está entre 20 e 25 KR de raios γ.

Houve um efeito significativo de épocas, sendo recomendado o verão como mais apropriado a essa determinação.

STUDY ON RADIOSENSITIVITY IN POPULATIONS OF *Centrosema pubescens* BENTH

Maria Isabel de Oliveira Penteado
- Author -

Paulo Sodero Martins
- Adviser -

SUMMARY

This work, had the objectives of studying the utilization of radiation γ for induction of variability in *Centrosema pubescens* Benth; determinating the radiosensitivity of the material and to test the methodology of evaluation.

Twenty populations of different origins were studied with 5 doses of γ rays (0, 12, 24, 36 e 48 KR), from a Cobalt-60 bomb. The statistical design was the factorial scheme, with 5 replications in the time, including 2 seasons of the year (summer and winter).

The radiosensitivity determination was made based on the following characters: germination; seedling height; survival, counting of spots on the primary leafs;

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, torna-se cada vez mais clara a necessidade de se aumentar a produção, visando atender à grande demanda de alimentos, dado o aumento populacional.

O Brasil, apesar de possuir um rebanho bovino de cerca de 119 milhões de cabeças (BRASIL,1980), não produz carne e leite suficientes para suprir o consumo. O aumento dessa produção está basicamente relacionado à qualidade e quantidade de forragem oferecida ao animal, seja ela gramínea ou leguminosa.

A grande representatividade em área, da pecuária brasileira, se localiza em regiões de cerrado e as pastagens, alimento de maior viabilidade econômica para bovinos, são constituídas basicamente por gramíneas.

A degradação das pastagens, especialmente em

solos de cerrado, onde a lixiviação de nutrientes é mais intensa, e a estacionalidade de produção de forrageiras,são dois fatores que contribuem muito para a baixa capacidade de suporte.

As alternativas apresentadas por HYMOWITZ(1971), para superar o problema de estacionalidade, são: aplicação de fertilizante nitrogenado no início da estação seca, alimentação suplementar durante o período seco e o emprego de leguminosas na alimentação. Destas três, a única alternativa economicamente viável é a terceira,pois a inclusão da leguminosa, além de oferecer uma alimentação de melhor qualidade proteica, melhora as condições físicas e químicas do solo pela fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico.

O custo crescente dos fertilizantes nitrogenados e a necessidade de melhorar os solos e conservar recursos naturais criaram a necessidade de explorar melhor os mecanismos de fixação biológica de nitrogênio,oferecido pelas leguminosas tropicais. A quantidade de nitrogênio fixado, situa-se em torno de 100 kg/ha-ano, dependendo de fatores como nível de nutrientes no solo, presença de estirpes apropriadas de bactérias fixadoras e capacidade de fotossíntese da leguminosa (SEIFFERT, 1982).

A *Centrosema pubescens*, em regime de cultura

pura, acrescenta até 520 kg de N/ha-ano (Franco, 1978, apud SEIFFERT, 1982), sob pastoreio, em média 150 kg e em consorciação, cerca de 160 kg (SEIFFERT, 1982). É portanto, um material de extremo interesse agronômico e também apresenta excelentes características forrageiras.

Entretanto, a falta de informações básicas,bem como ecotipos bem adaptados às diferentes condições ecológicas, tem sido uma grande limitação ao seu emprego nas pastagens brasileiras.

Por se tratar de uma espécie de tão grande potencial,os trabalhos de avaliação e caracterização de variabilidade, estudos básicos e mesmo programas de melhoramento,são plenamente justificáveis, na tentativa de dinamizar sua utilização.

A ferramenta de trabalho do melhorista é a variabilidade e, a principal fonte desta, são as mutações. Um programa de melhoramento por mutação induzida é perfeitamente viável, quando se deseja criar variação em algumas características, sem grandes alterações do genótipo do material. Além disso, a grande variabilidade produzida, oferece uma boa base para seleção.

Os objetivos deste trabalho foram:

a) estudar a viabilidade da utilização de raios γ na indução de mutação para futuros programas de melhoramento em *Centrosema pubescens;*

b) determinar a radiossensitividade do material e indicar a melhor faixa de dose a ser empregada;

c) testar a metodologia de avaliação de sensitividade para o material estudado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O uso de radiações e o estudo das mutações por elas induzidas, tiveram grande destaque a partir de 1927, quando Müller mostrou, em *Drosophila*, que a aplicação de raios-X causava o aparecimento de mutações muito semelhantes às chamadas espontâneas. Notou também que essas mutações ocorriam em freqüência muito superior às até então observadas (ALLARD, 1971).

Embora, à semelhança das espontâneas, as mutações induzidas sejam, na sua maioria deletérias ou de expressão fenotipíca negativa, o uso de radiações como indutoras de variabilidade não deve ser relegado, uma vez que, desta forma, o melhorista terá em mãos uma ampla gama de mutações para trabalhar, o que lhe poupa o tempo de procurar a mutação na natureza.

2.1. Considerações sobre o uso de radiações ionizantes

Mutações podem ser induzidas tanto pelo emprego de agentes físicos (radiações) como por compostos químicos (substâncias radiomiméticas). Existem 2 tipos básicos de radiações que podem ser utilizadas pelo pesquisador: as ionizantes e as não ionizantes.

A luz ultra-violeta é a principal representante das radiações não ionizantes e, por ter penetrabilidade muito baixa, seu uso em experimentos com vegetais é restrito a tratamentos com esporos ou grãos de pólen (BRIGS e CONSTANTIN, 1977). Entretanto, é amplamente utilizada na indução de variabilidade em microrganismos.

No grupo das radiações ionizantes,encontram-se raios-X e γ, partículas α e β, prótons, neutrons e deuterons. Como no presente utilizou-se o raio γ, proveniente de fonte de ^{60}Co, as considerações vão se ater a este tipo de agente físico.

As duas principais fontes de raios γ utilizadas atualmente são Cobalto-60 e Césio-137. As radiações provenientes de ^{60}Co são compostas de 2 tipos de raios γ, que aparecem pela desintegração do Cobato-60 para Níquel-60. Esse

emissor de raios γ emite ainda partículas β, mas estas, pela encapsulação da fonte e por auto-absorção perdem sua importância biológica (BRIGGS e CONSTANTIN, 1977).

De acordo com AHNSTRÖM (1977), os raios γ são radiações eletromagnéticas cujos fótons são absorvidos pela matéria por um processo, onde parte da energia é transformada em energia cinética com a emissão de 1 elétron. Esse elétron, descarrega sua energia interagindo com átomos e moléculas que emitem elétrons secundários. Assim, as ionizações ocorrem esparsamente, ao longo da trajetória da partícula ionizante e podem ter ação direta ou indireta sobre sistemas biológicos. Diz-se ação direta quando a alteração é resultante do efeito da radiação e indireta quando proveniente das reações secundárias.

Qualquer parte da planta pode ser irradiada, embora o tratamento de sementes seja mais usual. Os procedimentos são diferentes para cada parte. Quando se trata a planta toda, se esta for grande, é mais facilmente irradiada em campos ou salas de raios γ mas, plântulas ou plantas pequenas podem ser irradiados em fontes emissoras. Pode-se também irradiar grãos de pólen, meristemas, células ou tecido em cultura. Para o tratamento de sementes, deve-se levar em conta o estado físico do material, isto é, se estão secas (dormentes) ou embebidas, pois isso tem grande influência no efeito

biológico causado. Sementes dormentes são de mais fácil manuseio, mas requerem maiores doses de tratamento para causar danos genéticos importantes. Entretanto, a decisão a ser feita pelo pesquisador sobre qual parte da planta ou estágios mais apropriados à exposição depende do objetivo do trabalho e requer algum conhecimento do material (BRIGGS e KONZAK,1977).

2.1.1. Uso de radiações em sementes

NILAN *et alii* (1961) mostraram as vantagens do uso de radiações em sementes de cevada, que podem ser extrapoladas a outras culturas: a) podem ser irradiadas em muitos ambientes físicos; b) podem ser desidratadas, umedecidas, aquecidas ou congeladas; c) podem ser mantidas por longos períodos sob condições de vácuo ou altas pressões de oxigênio ou outros gases; d) quando secas, são quase inertes metabolicamente e ambientes desfavoráveis não causam danos biológicos significantes.

Por outro lado, a irradiação de sementes secas apresenta muitos problemas em relação aos danos cromossômicos causados pela formação de radicais livres, altamente reativos, dos quais se sabe que: a) permanecem nas sementes por tempo relativamente longo (CONGER e RANDOLPH, 1959); b) são ina

tivados ou eliminados por hidratação das sementes imediatamente após a irradiação (HABER e RANDOLPH, 1967); c) na sua maioria são encontrados no embrião (EHRENBERG *et alii*, 1969).

Existem diversos fatores que afetam ou modificam o efeito das irradiações nas sementes, isto é, fatores ambientais como teor de oxigênio, porcentagem de umidade, armazenamento, temperatura, fatores químicos, etc., alterando a radiossensitividade do material estudado. CONGER *et alii*(1977) afirmam que esses fatores externos ou internos modificam a efetividade (mutações por unidade de dose) e eficiência (relação mutações por injúria ou outros efeitos como aberrações cromossômicas) dos mutagênicos em células de plantas superiores. Dizem ainda que os 2 fatores mais importantes para irradiação de sementes são: teor de água e oxigênio.

Quanto ao efeito do oxigênio, THODAY e READ (1947) observaram que a irradiação em presença desse elemento com raios-X em *Vicia faba* produzia 3 vezes mais aberrações cromossômicas, em relação ao mesmo tratamento aplicado em atmosfera rica em nitrogênio e, portanto, pobre em O_2.

Outro fator muito importante que afeta a radiossensitividade é o teor de umidade nas sementes. EHRENBERG *et alii* (1969) verificaram que a sensitividade aos raios γ é máxima em níveis extremos de umidade e mínima em teo-

res médios de água.

MOËS (1961) estudando o efeito de diversos comprimentos de onda de raios-X e teor de umidade em sementes de cevada, usou taxa de dose entre 10 e 100 KR e concluiu que em doses elevadas, a radiossensitividade aumenta quando o conteúdo de água é menor. Mostrou também que os raios-X de comprimento de onda (λ) de 30 KeV têm uma ação diferente, pois quando aplicados, dão efeitos contrários, isto é, a resistência a doses elevadas nesse comprimento de onda aumenta quando se reduz o peso.

Com o intuito de verificar se a leguminosa *Vicia faba minor* mostrava o mesmo comportamento de radiossensitividade dependente do teor de umidade que a cevada, espécie usualmente escolhida para esses estudos, KLINGMÜLLER (1961) conduziu um ensaio com esse material. Verificou que *Vicia faba minor* apresenta o mesmo aumento marcante de radiossensitividade,quando as sementes têm teores muito baixos de umidade. Mostrou também decréscimo na porcentagem de germinação, redução no crescimento de parte aérea e raízes em plântulas e independência do tempo de armazenamento, até 8 semanas após a irradiação. Não observou correlação definida entre danos da radiação e quantidade de radicais livres nas sementes irradiadas.

Segundo CASARETT (1968), a radiação tem um efeito mínimo, tanto no crescimento do caule como raiz, quando as sementes expostas apresentam teores de umidade em torno de 10 a 15%. Abaixo ou acima desses níveis, o crescimento é mais severamente afetado pela irradiação. Efeito similar foi observado para sobrevivência e produção de sementes em plantas originadas de sementes irradiadas.

VENDRAMIN e ANDO (1975) colocaram sementes de feijão var. Carioca em dessecadores com diversas concentrações de ácido sulfúrico, o que no final de 45 dias de armazenamento proporcionou sementes com diferentes teores de umidade, entre 2,7% a 28,5%. Em seguida o material foi irradiado com 0, 10, 20, 30 e 40 KR de raios γ, em intensidade aguda de radiação. Concluiram que a radiossensitividade em feijão, tomando-se com base emergência, altura de plântulas e sobrevivência, é tanto mais afetada pela porcentagem de umidade nas sementes, no momento da exposição, quanto maior ou menor for este valor.

Há evidências que as diferenças de respostas com relação ao conteúdo de água são decorrentes das concentrações de radicais livres nas sementes após a irradiação. A formação desses radicais, entretanto, está muito relacionada aos teores de umidade e oxigênio nas sementes.

Ehrenberg (1961, apud CASARETT, 1968), afirma que o número de radicais livres produzidos é independente do teor de água das sementes, mas a sobrevivência deles está relacionada ao nível de umidade. Em níveis médios, onde a sensitividade é mínima os radicais livres aparentemente, reagem formando produtos não injuriosos.

Entretanto, KONZAK *et alii* (1961) ressaltam que o oxigênio pode modificar a injúria provocada pela irradiação, podendo muitas vezes aumentar os danos fisiológicos.

SARIĆ (1961) afirma que muitos fatores agem durante e após a irradiação e, assim, a radiossensitividade do material não depende apenas de suas características genéticas, grau de heterozigose, número de cromossomos, desenvolvimento ontogenético, mas também do método, dose e tipo de radiação, condições ambientais durante a irradiação e das condições em que o material é armazenado.

No que se refere ao desenvolvimento ontogenético, CONGER *et alii* (1973) verificaram o efeito de radiações ionizantes em sementes dormentes e pré-germinadas de cevada com teor de umidade ajustado para 14%. Concluiram que as sementes germinadas são 30 vezes mais sensíveis aos raios γ que as sementes dormentes. O mesmo resultado já havia sido obtido por STADLER (1930) ao verificar que sementes dormentes

são muito mais resistentes que as pré-germinadas, podendo suportar doses 15 a 20 vezes mais intensas.

SARIĆ (1961), afirma que os efeitos da irradiaçao dependem da condição biológica da semente irradiada, isto é, a radiossensitividade varia de acordo com o desenvolvimento ontogenético ou grau de maturidade: semente ontogeneticamente mais jovem é muito mais radiossensível que as mais velhas. Verificou ainda que formas poliplóides artificiais, assim como os híbridos, são mais radiorresistentes que as parentais.

Em um trabalho com várias espécies diplóides que apresentavam ampla faixa de volume nuclear (50 - 100 μ^3) e tamanho de cromossomos, SHAVER e SPARROW (1962), através da obtenção de heterozigotos e irradiação, observaram alta correlação positiva entre volume nuclear ou tamanho de cromossomos e frequência de mutação ou deleção de genes marcadores por unidade de radiação (R). Esse trabalho suporta a hipótese de que a taxa de mutação somática induzida em diplóides pode ser aproximadamente prevista a partir de suas características citológicas.

OSBORNE (1966) estudando a sensitividade a raios γ em embriões dormentes de 14 espécies representando 8 famílias botânicas, através dos parâmetros usuais nesse tipo de pesquisa, verificou que os mais importantes na discrimi

nação de sensitividade, foram: volume de células, núcleo e cromossomos no meristema apical; volume do ápice terminal; número de botões e folhas primordiais; número de células apicais e número de cromossomos.

A maneira como se aplica o tratamento também pode afetar o resultado final. STADLER (1930), considera que a porção da planta que será afetada por mutação ocorrida em uma única célula de uma semente madura, não necessariamente inclui os talos e a espiga; no caso do milho e, em decorrência, as mutações induzidas por tratamento de sementes maduras não segregam na segunda geração. Assim, o método mais satisfatório é aplicar o tratamento ao embrião jovem, no início do desenvolvimento, onde uma mutação pode afetar a planta toda.

Esses fatores afetam a radiossensitividade promovendo as diferentes respostas dos materiais irradiados. Entretanto, essas diferenças podem ser quantificadas, através de medições nos danos fisiológicos que ocorrem na geração M_1.

2.1.2. Estimativas dos efeitos das radiações

Os danos fisiológicos constituem o principal material para estudos de radiossensitividade pois se manifes-

tam na primeira geração, chamada M_1 e podem ser medidos quantitativamente.

Os agentes mutagênicos induzem 3 tipos de efeitos que são de especial interesse para genética e melhoramento de plantas: danos fisiológicos (restritos à geração M_1); mutações de ponto ou gênicas e cromossômicas ou aberrações (transferíveis às gerações subsequentes). A injúria na geração M_1 pode ser medida quantitativamente por vários parâmetros: a) altura de plântulas, determinada em um estágio particular do desenvolvimento; b) comprimento de raiz em determinado estágio do desenvolvimento; c) emergência no campo ou germinação em laboratório; d) sobrevivência; e) número de espigas ou inflorescências por planta; f) número de flores por espiga ou inflorescência; g) número de sementes por espiga ou inflorescência; h) número de sementes por planta (GAUL, 1970).

O mesmo autor ressalta ainda que para um dado tratamento mutagênico, há correlação entre altura de plântulas e sobrevivência de M_1 por um lado e freqüência de mutações M_1 por outro lado em cereais. Portanto, a determinação quantitativa da injúria M_1 deve ser procedimento de rotina em experimentos com indução de mutação.

Esse conceito no entanto, pode ser extrapolado a outras culturas e é sabido que os caracteres normalmente

avaliados em determinações de radiossensitividade, geralmente sofrem um decréscimo com o aumento da dose.

SPARROW (1961) esclarece que os efeitos fisiológicos são de natureza variável e podem representar a reação de todo organismo, mas para efeitos práticos, os mais importantes são a inibição do crescimento e a mortalidade.

Os danos fisiológicos dão um limite prático para o aumento da dose, mostrando um ponto final com 100% de letalidade. Para programas de melhoramento procura-se um tratamento mutagênico com baixo efeito fisiológico e altos danos genéticos (GAUL, 1970).

Tanto a redução na altura de plantas como a sobrevivência fornecem parâmetros importantes que são a GR_{50} (dose que inibe 50% do crescimento da população) e a LD_{50} (dose que causa morte em 50% da população), que permitem comparar a radiossensitividade de diversas espécies, além de servirem como base para determinação da dose a ser utilizada em trabalhos com indução de mutação.

GUSMAN *et alii* (1975) afirmam que o aumento da freqüência de mutações, que é diretamente proporcional ao aumento da dose de radiação, sofre diminuição com dose crítica. Esta dose crítica é estimada através de critérios qualitativos, sendo geralmente usada a LD_{50} como indicadora.

GAUL (1970) indica vários métodos para a determinação da altura de plântulas mas ressalta que, uma comparação entre e dentro de experimentos pode sofrer, para um dado tratamento, um atraso na germinação e que medidas muito precoces podem não possibilitar a distinção entre esse efeito e a redução na altura. Esse risco pode ser evitado, tomando-se dados apenas quando as primeiras folhas já estiverem desenvolvidas. Considera também que a medida do comprimento de raízes é um método rápido para a determinação do efeito do mutagênico sobre a semente.

Quanto à sobrevivência, GAUL (1970) recomenda que a contagem seja feita por ocasião da colheita da geração M_1. Entretanto, considera que quando não se obedece essa regra, deve-se mencionar o estágio de desenvolvimento em que se fez a determinação, uma vez que, as taxas de sobrevivência obtidas em condições de laboratório podem diferir bastante das observadas em condições de campo, devido a adversidades ambientais em fases críticas do desenvolvimento.

A germinação de sementes da maioria das espécies, normalmente não é muito alterada pela irradiação, mesmo quando doses bem altas são aplicadas. Entretanto, a emergência, sob condições de campo torna-se reduzida (GAUL, 1970).

Em experimento com sementes de tomate irradia

das com 6 doses crescentes de raios-X e o controle, semeadas em estufa, MACARTHUR (1934) notou que a porcentagem de germinação foi alta e aproximadamente igual a 95% em todos os tratamentos.

Em estudos feitos com arroz submetido a irradiação de 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 100 KR de raios γ, YESODA RAJ *et alii* (1972) observaram uma germinação razoavelmente boa em todos os tratamentos, sendo de 98% no controle e nos irradiados variando entre 89 e 97%. A porcentagem de sobrevivência decresceu com o aumento da dose, variando de 98% no controle a 14% em 70 KR e 0% nos tratamentos mais fortes. Foi indicado uma LD_{50} ao redor de 20 KR. Obtiveram uma redução no desenvolvimento de plúmula e radícula com o aumento da dose, em medições feitas 4 a 6 dias após a germinação.

RAGHUVANSHI e SINGH (1974), trabalhando com sementes de *Trigonella foenum-graecum*, irradiadas com 10, 20, 30, 40, 50 e 60 KR de raios γ provenientes de ^{60}Co, verificaram que a germinação foi praticamente normal, mas com as doses 50 e 60 KR, após as 2 folhas cotiledonares, o crescimento cessou. O sistema radicular foi afetado e a 50 KR apenas uma planta sobreviveu.

Por outro lado, STEAGALL (1977), irradiando 10 populações de milho com 0, 10, 20, 25, 30 e 40 KR de raios γ,

verificou um decréscimo na porcentagem de emergência. A porcentagem de sobrevivência e altura de plântulas na geração M_1, também mostraram comportamento semelhante. Concluiu que a redução na altura de plântulas foi o parâmetro mais sensível na determinação de radiossensitividade, nas condições do ensaio e que, de maneira geral, a 1ª geração após a irradiação é mais indicada para este tipo de estudo.

Entretanto, GUIMARÃES (1978) irradiou sementes dormentes de arroz, da variedade Dourado Precoce, com 0, 8, 16, 24 e 32 KR de raios γ e não observou grande redução na sobrevivência e altura de plantas M_1, com o aumento das dosagens. Verificou porém, marcante decréscimo na fertilidade de plantas M_1 e elevada frequência de mutação em doses altas.

Esses danos fisiológicos manifestados na geração M_1, provavelmente têm origem cromossômicas e extra-cromossômicas. Quando um tratamento mutagênico causa alta morte e baixa freqüência de mutações, enquanto outro resulta em baixa letalidade e alta taxa de mutações, pode-se eventualmente deduzir que o segundo tratamento causa relativamente menos danos extracromossômicos que o primeiro (GAUL, 1970). YESODA RAJ *et alii* (1972) explicam que a redução do crescimento em altas doses é devido principalmente à destruição das auxinas ou seus precursores e inativação de células meristemáticas.

Em folhas primárias de plantas decorrentes de sementes irradiadas, podem ser observadas estrias (no caso de monocotiledôneas) e manchas (em dicotiledôneas). Esses efeitos também podem ser utilizados como indicador da efetividade de mutagênicos.

Atualmente, há grande interesse na quantificação dessas manchas,pois acredita-se que elas possam fornecer uma estimativa bastante correta do efeito mutagênico, por estarem mais diretamente relacionadas a mutações gênicas que redução do crescimento ou letalidade (BLIXT *et alii*, 1960; ZACHARIAS e EHRENBERG, 1962; BLIXT *et alii*, 1964).

Kaplan, (1954,apud ZACHARIAS e EHRENBERG, 1962) investigando o fenômeno das manchas foliares em *Glycine*,obteve um número como função exponencial da dose e então concluiu que as manchas eram devidas principalmente a mutações cromossômicas de 2 toques como translocações. Buscando confirmar essa hipótese, ZACHARIAS e EHRENBERG (1962) testaram vários agentes nucleotóxicos, capazes de causar aberrações cromossômicas e ou mutações gênicas,como neutrons rápidos,raios-X,oxigênio e mutagênicos químicos, sobre trevo vermelho. Observaram que os raios-X produzem manchas em número proporcional ao quadrado da dose,enquanto os neutrons são muito mais eficientes, dando resposta linear a dose. O óxido de etileno (substância radiomimetica) mostrou comportamento similar ao

raio-X e a presença de oxigênio na atmosfera teve boa eficiência na indução de manchas foliares. Notaram também que o número duplo de cromossomos oferecia forte proteção contra a formação de manchas. Esses dados foram conclusivos na aceitação do fato de que as manchas foliares, surgem por alterações no material genético.

ERIKSSON e LINDGREN (1977) citam trabalhos que são evidências da origem genética das manchas foliares: alguns mutantes de clorofila registrados na M_2 podem ser causados por um mecanismo similar ao que causa o aparecimento de manchas (Moutschen-Dahmen *et alii*, 1959) e, descendência de setores M_1 brancos em *Trifolium pratense* são brancos (Bruns, 1954).

Usando Etilmetanossulfonato(EMS) em ervilhas, BLIXT *et alii* (1964) encontraram forte correlação entre o número de manchas das folhas primárias e das folhas seqüênciais (nas primeiras folhas permanentes), isto é, o aparecimento de manchas tem forte correlação com a ordem sequencial de folhas, decrescendo nas mais jovens, ao mesmo tempo que nessa seqüência, aumenta o tamanho de cada mancha. Isso indica que o número de manchas induzido por um certo tratamento deve ser uma fração constante do número de células presentes nas folhas, na mesma sequência.

Se o número de manchas determinado por um tratamento está relacionado ao número de células presentes, o

mesmo ocorre com as células primordiais das folhas primárias, no momento do tratamento das sementes. Assim, esse caráter deve representar com muito mais segurança as mutações ocorridas no material genético,que as medições de efeito fisiológico. A esse respeito, BLIXT *et alii* (1964) afirmam que o número de manchas tende a aumentar com a concentração do tratamento,mas pode ser muito bem quantificado em baixas concentrações,onde por exemplo, inibição do crescimento não mostra diferença significativa,considerando por isto,o caráter pelo menos cerca de 100 vezes mais sensível.

Muitos autores concordam que as manchas foliares, por eles chamados setores - a,podem se originar tanto de mutações gênicas como mutações cromossômicas. BLIXT e GELIN (1964) no entanto, consideram que a redução no crescimento pode ser causada pelos mesmos fatores, mas advertem que esse efeito pode também ser devido a intoxicação de natureza mais ampla, não relacionada com o mecanismo hereditário. Nesse trabalho, com ervilhas,encontraram que a freqüência de setores - a de diferentes cores a partir de material M_1 tratado com EMS mostrou boa concordância com o espectro de mutação de clorofila em M_2 induzido por esse mutagênico. Verificaram também que o raio γ induziu baixa frequência de setores verdes em sementes xanta homozigotas. Assim,suportaram a origem genética das manchas foliares e portanto,sua estreita ligação com alterações herdáveis.

As manchas foliares foram amplamente estudadas em leguminosas, mas BLIXT (1965) sentiu a necessidade de saber até que ponto os resultados já obtidos poderiam ser generalizados. Então induziu manchas em sementes de 47 espécies, pertencentes a 16 famílias botânicas,usando etilmetanossulfonato (EMS). A manifestação do caráter foi mais eficiente em algumas famílias que em outras, havendo aquelas que não responderam ao tratamento. Entretanto, como fenômeno geral pode notar uma queda na frequência de manchas em altas concentrações e observou que em alguns casos ocorre fusão de diferentes manchas, o que provavelmente explica essa diminuição na freqüência de manchas. De maneira geral o aumento do número de manchas parece estar bem relacionado com o decréscimo na germinação e redução no crescimento.

Quanto à metodologia, BLIXT (1965) ressalta que a morfologia foliar influencia bastante a precisão da contagem das manchas,especialmente em folhas muito estreitas; a grossura das folhas é muito importante na determinação da visibilidade e clareza das manchas. Em espécies de folhas grandes e finas, as manchas são bem distintas, de fácil contagem. Espécies de crescimento muito rápido não se prestam muito à determinação deste caráter, pela dificuldade de se estabelecer o melhor estágio de contagem, isto é, as primeiras folhas apresentam muitas manchas, mas bem pequenas, enquanto as subsequentes já mostram muito poucas manchas e de grande tamanho.

Em todos os caracteres normalmente utilizados na determinação de radiossensitividade, encontra-se diferença de resposta a nível de espécie e até de variedade. Daí, a necessidade de estudos básicos, preliminares, para cada material a ser tratado com os mutagênicos. Diversos autores tentaram explicar essa disparidade de reações, o que deu origem a diversas hipóteses, em diferentes áreas de pesquisa.

Lamprecht (1956 e 1957, apud GELIN *et alii*, 1958) descreveu variedades de ervilha que eram mais sensíveis a raios-X que outras, com base na sobrevivência a campo e observou também que alguns rearranjos cromossômicos, como translocações, no material genético afetaram a radiossensitividade das sementes.

Johnsson (1933, apud GELIN *et alii*, 1958), irradiando plântulas de *Atriplex hortensis* observou maior sensitividade a raios-X nas variedades vermelhas e brancas, que nas verdes. Gregory (1956, apud GELIN *et alii*, 1958) observou variação na sensitividade a raios-X, para indução de mutação em *Arachis hypogea*, mas não teve a mesma resposta quando usava neutrons rápidos, embora utilizasse os mesmos genótipos. Isso abriu um campo de investigação sobre o mecanismo de ação dos mutagênicos.

Buscando uma explicação genética para as dife-

rentes respostas, SMITH (1942) encontrou um fator mendeliano em *Triticum monococcum* que aumentava cerca de 2 vezes a sensitividade a raios-X.

Lamprecht (1957, apud GELIN *et alii*, 1958) concluiu que alta sensitividade em ervilha é combinada com homozigose para um ou ambos os genes r e le. GELIN *et alii*(1958) confirmaram esse resultado e acrescentaram que a constituição genética atua quantitativamente, sobre efeitos letais e aberrações cromossômicas e que a resistência de alguns materiais pode estar relacionada à capacidade de regeneração de tecidos após tratamentos com altas doses.

Afirmando que cada variedade tem sua radiorresistência específica, SARIĆ (1961) relacionou sensitividade ao grau de ploidia e heterozigose do material, ao observar que poliplóides artificiais são mais resistentes que os parentais, mas para poliplóides naturais, o número de cromossomos não é fator decisivo de resistência. Entretanto, de maneira geral, os híbridos são menos sensíveis que seus pais.

Yamaguchi (1956, apud MATSUO e YAMAGUCHI, 1962) observou que as diferenças de suceptibilidade a raios-X entre plantas de arroz ocorria em material de origem diferente e assumiu que a variação na radiossensitividade dentro de uma variedade, provavelmente era consequência de condições fisiológi

cas do material.

STEAGALL (1977) observou diferença marcante de sensitividade em 10 populações de milho submetidas à raios γ com base nos parâmetros germinação, altura de plantas e sobrevivência, em 2 gerações subsequentes. Os tratamentos aplicados foram os mesmos e, portanto, as alterações de respostas devem estar relacionadas à condição genética do material biológico.

BOWEN e THICK (1961) observaram que a LD_{50} para sementes de *Brassica nigra* era 300 vezes maior que a de *Pinus silvestres* e deram explicação química para o fenômeno, uma vez que o extrato aquoso de sementes resistentes, pode conferir certa resistência à sementes sensíveis e vice-versa. Analisando quimicamente os extratos, concluiu que o aumento da sensitividade está relacionado aos peróxidos dos ácidos graxos insaturados produzidos pela irradiação.

BHATT *et alii* (1961), comparando sensitividade de cerca de 50 variedades de diferentes espécies, apresentaram uma lista da LD_{50} desse material, aos mutagênicos: raios γ, raios-X e neutrons. Observaram diferenças sensíveis nos resultados. Para as leguminosas testadas com raios γ obtiveram LD_{50} entre 10 e 50 KR.

MATSUO e YAMAGUCHI (1962) apresentam alguns da

dos sobre doses de radiação mais efétiva para diferentes culturas; de trabalhos feitos por diversos autores:

- 15 a 20 KR de raios-X ou γ em cevada (Matsumura e Fujii, 1958; Yamaguchi, 1958).
- 30 KR de raios γ em trigo (Syakudo *et alii*, 1959).
- 10 a 15 KR de raios γ em soja.
- 40 a 60 KR de raios γ em colza.
- 20 a 30 KR de raios-X ou γ em fumo (Matsumura e Fujii, 1955).

Na tentativa de quantificar a sensitividade de diversos materiais à radiação crônica, MOH e ALAN (1974) expuseram plantas de 84 espécies à radiação γ e classificaram, de acordo com as respostas, em famílias sensíveis, resistentes e com ampla faixa de reações, sendo a *Leguminosae* incluida nesta última classe. Explicaram essa diferença pela hipótese de SPARROW *et alii* (1961) que a radiossensitividade é afetada por muitos fatores biológicos como: volume nuclear interfásico, tamanho de cromossomos, número de cromossomos e grau de ploidia.

Uma outra maneira de comparar radiossensitivi-

dade é com base na GR_{50}. ANDO (1968) determinou, para a variedade Dourado Precoce de arroz, uma GR_{50} entre 20 e 30 KR de raios γ.

MIKAELSEN e NAVARATNA (1968) trabalhando com arroz, com base na GR_{50}, notaram que as variedades de sementes menores são mais radiorresistentes, dando impressão de haver afinidade entre tamanho da semente e sensitividade a raios γ, quando medida em altura de plântulas.

2.1.3. Efeito estimulante de baixas doses

Alguns trabalhos mostram, em baixas doses de radiação, respostas até superiores ao controle. Acredita-se que haja um efeito estimulante desses tratamentos, sobre o material tratado, especialmente no que se refere a crescimento da planta.

SUSS (1966) relata vários ensaios realizados sobre esse aspecto, medindo especialmente a velocidade de germinação (crescimento da raiz primária em relação ao tempo e dose); desenvolvimento de plântulas (medido 14 dias após a germinação com base em comprimento, peso seco e peso úmido); efeito sobre a produção (em vasos e a campo, medindo a produção total e produção de grãos e ramos). Os materiais utilizados são sementes de cevada, trigo, milho e tubérculos de batata. Os re-

sultados foram significativos para germinação, estágios iniciais do desenvolvimento e colheita, entretanto, os aumentos na produção foram geralmente baixos e inconsistentes.

SPARROW (1966) relata que em vários ensaios feitos, inicialmente sem intenção de estudar o efeito de baixas doses sobre o crescimento da planta, na verdade, a evidência de um efeito estimulante foi frequentemente observada. As observações (desenvolvimento de plantas e época de florescimento) foram feitas em diversas espécies, de modo que a inferência pode ser generalizada, com boa margem de segurança, devido a alta repetibilidade do efeito.

Com o intuito de verificar o efeito de baixas doses, TAVCAR (1966) irradiou com doses de 500 a 10000 R de raios γ, sementes de 4 genótipos de trigo; 4 de cevada e 3 linhas autofecundadas de milho. Observou nas raízes, o comprimento e aberrações cromossômicas em células do ápice; e altura de plântulas e dimensão das células epidérmicas das primeiras folhas. Encontrou respostas diferentes para cada tipo de germoplasma e pode concluir que as doses mais baixas, que não afetam as aberrações cromossômicas, podem causar um estímulo, no estágio de plântula, de crescimento nas raízes e extensão das folhas, mas esse efeito não é herdável. A causa do estímulo, segundo o autor deve estar relacionada a maior rapidez de divisão celular (aumento no índice mitótico) e mais

ligada a mudanças bioquímicas a nível citoplasmático.

RAGHUVANSHI e SINGH (1974) trabalhando com *Trigonella foenum-graecum* observaram o efeito estimulante de 10 KR onde o florescimento foi antecipado 8 dias, enquanto nas doses mais altas de 40 - 50 KR foi retardado por uma semana em relação ao controle.

STEAGALL (1977) também observou em milho, acréscimo na germinação, altura de plantas e sobrevivência em relação ao controle, nas populações irradiadas com 10-25 KR. Essa característica também pode ser observada na geração M_2.

2.1.4. Radiação e melhoramento

TAVCAR (1966) com base em seus trabalhos, concluiu que doses pequenas de irradiação podem ser aplicadas para: encurtar o período de dormência de sementes; aumentar a porcentagem de germinação de sementes mais velhas, e induzir macho-esterilidade citoplasmática em plantas, onde esta característica pode ser usada para melhoramento.

Essa seria já uma aplicação valiosa da radiação, mas sem sombra de dúvida, sua grande colaboração, a mais

importante, está no aumento da variabilidade existente ou na criação de variabilidade.

As mutações induzidas são a única esperança dos melhoristas de plantas, para livrarem-se da dependência da natureza como principal fonte de variantes genéticos necessários ao melhoramento das plantas (ALLARD, 1971). SIGURBJÖRNSSON (1977) considera que a variabilidade causada por mutações induzidas, não é essencialmente diferente daquela causada por mutações espontâneas durante a evolução.

Os agentes mutagênicos aumentam a variabilidade e, sobre esta, são aplicados os métodos tradicionais de melhoramento. Porém, as mutações induzidas podem ser aproveitadas pelo melhorista, de diversas formas. SIGURBJÖRNSSON(1977) apresenta uma tabela, baseada em 3 tópicos especiais: uso de mutações gênicas, uso de mutações cromossômicas e uso de agentes mutagênicos para problemas especiais de melhoramento (produção de haplóides, aumento ou diminuição da freqüência de quiasmas; produção de sexualidade transitória em apomíticos; redução de incompatibilidade; estudos de processos genéticos, fisiológicos, morfológicos e bioquímicos).

Um tópico de especial interesse é o uso de mutações gênicas ou de ponto onde, para espécies autógamas, é previsto o uso direto de mutantes, ou um programa de cruzamen

to entre eles.

O uso direto de mutações é muito valioso para o melhoramento de plantas, particularmente quando se deseja melhorar poucos caracteres, de herança simples em sistemas genéticos bem adaptados. A principal vantagem é que o genótipo básico é pouco alterado, em relação à causada por hibridação, que pode romper uma combinação superior de genes, além disso, o tempo requerido para o melhoramento pode ser muito menor do que o normalmente necessário em programas clássicos de hibridação (ALLARD, 1971; SIGURBJÖRNSSON, 1977).

Alguns resultados já foram obtidos e existem muitos trabalhos mostrando o aumento da variabilidade, tanto para caracteres qualitativos, como quantitativos. Da mesma forma, muitos resultados positivos de melhoramento já se encontram relatados na literatura.

GENTER e BROWN (1941) irradiaram sementes de feijão com as doses de 2160, 6500, 13000 e 26000 unidades gama de raios-X observaram, além dos efeitos fisiológicos comuns na geração M_1, o aparecimento, em M_2, de mutações no tamanho das plantas, forma e textura das folhas, brotação, fertilidade e maturidade, sendo que 19% dessas mutações eram distinguíveis 5 semanas após o plantio. Ainda em feijão, DOWN e ANDERSEN (1956) relatam a obtenção de variedade tolerante ao

vírus do mosaico do feijoeiro, através do uso de raios-X.

Usando várias doses entre 1 e 10 KR de raios γ, MUJEB e GREIG (1973) irradiaram de forma aguda sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e observaram aumento na variabilidade para altura de plantas, formas das folhas e florescimento, e o aparecimento de mutação para número de vagens, peso de 100 sementes e produção.

RAJPUT (1974) observou considerável aumento na variabilidade de características quantitativas em plantas provenientes de sementes de *Phaseolus aureus* Roxb. irradiadas com 10 a 40 KR de raios γ. Apresentou as correlações obtidas para as características fisiológicas observáveis em M_1 em relação à dose: r = 0,93 para atraso no florescimento; r = -0,76 para altura de plantas; r = -0,75 para número de sementes por vagem e um valor não significante de 0,33 para produção. Obteve aumento no número de vagens por planta (exceto a 15 KR), mas não encontrou variação no comprimento médio de vagens, nem no peso de 100 sementes.

Em amendoim, a partir de sementes irradiadas com 10 a 18,5 KR de raios-X, COOPER e GREGORY (1960) obtiveram variabilidade para resistência à mancha foliar causada por *Cercospora arachidicola* Hori e *C. personata* [(B e C) Ell e Ev] e selecionaram uma variedade resistente à doença, com base na

resistência à defoliação nas gerações X_2 e X_3.

Existe interesse em se obter variedades precoces de ervilhas, e, um grande número de mutantes desse tipo foi avaliado por Blixt e Gottshalk (1975 apud GOTTSCHALK e BANDEL, 1978), que concluiram ser a precocidade devida a baixa posição das primeiras flores, nos ramos. Esses genótipos florescem 10 - 28 dias mais cedo que as linhas originais. GOTTSCHALK e BANDEL (1978) discutem o valor do mutante fasciado para melhoramento, que tem alta produtividade, devido ao aumento do número de flores e vagens na parte apical da planta, mas, em contra-partida, é mais tardio. Optaram pela junção de características de interesse, cruzando 4 mutantes fasciados espontâneos (tardios e de alta produção) com o mutante induzido não fasciado (precoce e com problemas de produção de sementes), e obtiveram recombinantes com a expressão fenotípica esperada: com florescimento precoce e boa produção de sementes.

BANDEL e GOTTSCHALK (1978), cruzando 5 mutantes fasciados induzidos, 1 mutante para florescimento precoce e 1 mutante deficiente em clorofila, em todas as combinações possíveis, puderam através da análise de segregação de F_2, indicar o número de genes que controlam os caracteres mutados. Desses cruzamentos obtiveram alguns recombinantes su-

periores às parentais quanto ao potencial de produção, precocidade e tamanho de semente.

Resultado semelhante foi obtido por MOULI e PATIL (1976) em amendoim, onde, através de estudos em mutante com redução dos ramos, induzido por raios γ, concluiram que esse caráter é governado por um par de genes recessivos bsp bsp. Esse mutante, embora apresentasse os ramos apenas cerca de 20 a 50% dos normais, tinha folhas maiores, padrão de florescimento não alterado, acamamento reduzido e grãos menores.

REDDY *et alii* (1977) irradiaram 6 introduções de amendoim, com 40 KR de raios γ. As introduções eram seis genótipos diferentes, originários de 4 regiões ecológicas específicas. Observaram uma diferença de resposta, em termos de sensitividade, que foi relacionada à origem do material, uma vez que introduções de origens similares, exibiram comportamentos semelhantes.

Num dos raros trabalhos feitos sobre os efeitos das radiações em plantas forrageiras, DAVIES (1972) tratou plantas de *Lolium perene*, *Festuca pratensis* e *Trifolium repens*, com 2, 4 e 8 Krads de raios γ e pode observar, com base na produção total, que a leguminosa é bem mais resistente que as gramíneas.

Poucas pesquisas foram desenvolvidas em espécies forrageiras com irradiação, porém, acredita-se que, pelo mecanismo de reprodução dessas plantas, o uso da técnica de indução de mutação é válido. MATSUO e YAMAGUCHI (1962) citam que a irradiação pode induzir variabilidade genética para precocidade, hábito de crescimento, resistência a acamamento e tolerância a frio, em arroz. Assim, esses caracteres, e outros podem ser conseguidos em qualquer cultura que se trabalhe.

2.2. Considerações sobre o material: *Centrosema pubescens*

O gênero *Centrosema* tem sido apontado como sendo de grande potencial forrageiro, apresentando excelentes vantagens em programas de melhoramento, por sua alta produtividade, boa capacidade associativa, alto valor proteico, razoável palatabilidade, e boa tolerância a seca (SCHOFIELD, 1941; GROF, 1970; RICHARDS, 1970; CLEMENTS, 1974, SERPA, 1976). Adicionalmente melhora consideravelmente a fertilidade do solo pela fixação simbiótica de nitrogênio, caráter aparentemente de herança simples e que apresenta uma variabilidade relativa (BOWEN e KENNEDY, 1961).

Existem cerca de 30 espécies no gênero *Centro-*

sema que ocorrem naturalmente no Brasil. O gênero pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoideae* tribo *Phaseolae* (BENTHAM, 1859; DUCKE, 1949; BARBOSA-FEVEREIRO, 1979).

As descrições das espécies nativas, encontradas na literatura, se limitam às características morfológicas e domínios ecológicos, em alguns casos. Entretanto, não se têm dados a respeito de biologia floral, taxa de fecundação cruzada, número de cromossomos, mecanismos de herança de caracteres agronômicos e outras informações de suma importância para o melhoramento genético.

HUTTON (1960) verificou que a polinização e desenvolvimento do tubo polínico de *C. pubescens* ocorre 4-5 horas antes da antese da flor, concluindo que a espécie se reproduz por autogamia, podendo ser classificada como cleistogâmica.

Alguns caracteres de interesse agronômico, exibem grande variabilidade. Um exemplo é o caráter época de florescimento, que varia de 92 a 150 dias após plantio (BOWEN, 1959; ALCANTARA *et alii*, 1977; MOGROVEJO, JARAMILLO, 1981).

As características: produtividade, fixação de nitrogênio e enraizamento nos nós também apresentam boa variabilidade. SERPA (1972); HUTTON (1976) e DÖBEREINER e CAMPELO (1977) consideram que a obtenção de plantas com alta produção

de matéria verde associada a eficiente fixação de nitrogênio é uma característica importante a ser considerada no melhoramento. Além disso, deve-se prestar atenção à capacidade de fixação e competição da planta (BOWEN, 1959).

Já foram determinados os coeficientes de determinação genotípica e/ou correlações genéticas para os seguintes parâmetros agronômicos: matéria verde e matéria seca (CLEMENTS, 1974; MONTEIRO, 1980); número de dias para florescimento, hábito de crescimento, número de vagens, teor de fibras, porcentagem de proteína bruta (MARTINS e VELLO, 1980); número de ramificações; produção de massa verde; número de vagens e número de sementes por vagem (MONTEIRO, 1980; MOGROVEJO JARAMILLO, 1981).

Esses caracteres mencionados podem sofrer grande avanço genético pelos sistemas clássicos de melhoramento, por exibirem altas variabilidade e herdabilidade. Entretanto, existem os que não estão na mesma privilegiada situação e, que, embora sejam de grande importância agronômica, não podem ser melhorados com o mesmo êxito,ou por apresentarem baixa herdabilidade, como valor nutritivo (SHENK, 1977) ou por não apresentarem variabilidade, como dormência e deiscência de sementes, por exemplo.

Nesses casos é interessante criar variabilida-

de e, o uso de radiações é então bastante recomendado, especialmente em uma espécie autógama onde uma característica desejada, causada por mutação induzida, em poucas gerações estaria fixada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado neste estudo constituiu-se de 20 populações de *Centrosema pubescens* de diferentes procedências, (Tabela 1) cujas sementes foram multiplicadas no município de Piracicaba, Estado de São Paulo em área da Fazenda Areião, pertencente a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", onde o solo apresenta textura argilosa com pH próximo à neutralidade e baixo teor de alumínio.

As sementes foram colhidas manualmente, por planta, em setembro-outubro de 1979 e em seguida armazenadas em câmara seca.

O ensaio dividiu-se em 3 fases subsequentes:

a) Teste de germinação.

b) Teste preliminar de radiossensitividade.

c) Ensaio de radiossensitividade propriamente dito.

3.1. Teste de germinação

Para esta fase separaram-se 120 sementes de cada uma das 20 populações estudadas, sendo que 60 foram escarificadas manualmente com lixa fina e 60 não sofreram pré-tratamento, deixando o tegumento intacto.

A finalidade era avaliar o grau de dormência e a porcentagem de germinação ou viabilidade das sementes e, a presença ou ausência do pré-tratamento (escarificação) fornecia elemento para comparar essas características.

O ensaio, inteiramente casualizado, foi montado com 3 repetições de 20 sementes cada, inicialmente para as escarificadas e posteriormente as não escarificadas.

As sementes foram colocadas em placas de Petri com papel de filtro, umedecidas com água destilada e postas a germinar em germinador de bandeja, a 25°C, no escuro.

O critério utilizado para se determinar a germinação foi a emissão de radícula. O ensaio foi conduzido durante 15 dias, com observações diárias e no mesmo horário. As sementes que emitiam radículas eram diariamente contadas e eliminadas do ensaio.

3.2. Teste preliminar de radiossensitividade

Para esta fase, fez-se uma mistura das 20 populações, montando-se um ensaio inteiramente casualizado, com 4 doses de radiação γ (0, 20, 40 e 60 KR) e 3 repetições, com 10 plantas cada uma.

As sementes foram previamente escarificadas e submetidas à radiação aguda de raios-γ, provenientes da fonte de ^{60}Co pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, de acordo com as doses indicadas acima.

Imediatamente após a irradiação as sementes foram colocadas em placas de Petri, sobre papel de filtro umedecido com água destilada e postas a germinar no escuro, a 25°C.

Fez-se controle diário da germinação e, três dias após a semeadura, as sementes já com radícula foram transplantadas para câmara simuladora de ambientes (Conviron), onde as plantas se desenvolveram a uma temperatura de 25°C, com fotoperíodo controlado para 16 horas de claro e 8 horas de escuro, em solução nutritiva correspondente a solo fértil.

A solução utilizada no ensaio foi a de 1:5 modificada de Steimberg, de acordo com FOY e outros (1967), cuja composição é dada a seguir:

SOLUÇÃO A:

300 grs de $Ca(NO_3)_2.4\ H_2O$

70 grs de $Mg(NO_3)_2.6\ H_2O$

19 grs de NH_4NO_3/litro de água destilada

SOLUÇÃO B:

75 grs de K_2HPO_4

17,6 grs de $(NH_4)_2SO_4$/litro de água destilada

SOLUÇÃO C:

23 grs de K_2SO_4

58 grs de KNO_3/litro de água destilada

SOLUÇÃO D:

2,34 grs de $MnCl_2.4\ H_2O$

2,04 grs de H_3BO_3

0,88 grs de $ZnSO_4.7\ H_2O$

0,20 grs de $CuSO_4.5\ H_2O$

0,126 grs de $Na_2MoO_4.2\ H_2O$/litro de água destilada

Para o preparo da solução em si, utilizaram-se 8 ml da solução A, 1,8 ml da solução B, 5,32 ml da solução C e 1,6 ml da solução D, diluidos em 8 litros de água destilada acrescentando-se 8 ml de solução de FeEDTA, correspondente a 1 ppm de Fe.

Os tanques utilizados no ensaio tinham volume de 32 litros e portanto, as quantidades das soluções estoque utilizadas foram:

32,0 ml da solução A
7,2 ml da solução B
21,3 ml da solução C
6,4 ml da solução D
32,0 ml de solução de FeEDTA

O pH da solução foi mantido a 5, com medições feitas a cada dois dias com fita indicadora. Caso houvesse alteração, o pH seria corrigido.

A aeração da solução foi feita através de um sistema de circulação forçada e intermitente de ar, acionado a cada 30 minutos.

O comportamento usual para testes preliminares é utilizarem-se 2 doses extremas de radiação, mas todos os cuidados foram tomados no sentido de minimizar o erro e inclusive o uso de diversas doses de irradiação teve o objetivo de aumentar os pontos da curva, para que esta se tornasse mais próxima da real, uma vez que não existem referências sobre o uso de radiações nessa leguminosa e que a finalidade básica deste teste era fornecer a faixa de doses a ser utilizada no

ensaio definitivo.

Os dados tomados nessa fase foram: porcentagem de germinação, altura de plântulas, porcentagem de sobrevivência e contagem de manchas nas folhas primárias.

A porcentagem de germinação foi determinada nos 3 dias subsequentes à semeadura, pela contagem de sementes que emitiam radícula.

A altura de plântulas foi medida em cm, a partir da cicatriz cotiledonar até a inserção das folhas permanentes, cerca de 8 dias após o transplante, quando 80% da testemunha já possuia folhas permanentes. Esses dados deram origem à determinação gráfica da GR_{50} que serviu como um dos parâmetros na escolha das doses para o teste definitivo.

A porcentagem de sobrevivência foi calculada 30 dias após o transplante, contando-se o número de plantas vivas com base nos números de sementes germinadas e de plantas sobreviventes, obtiveram-se os dados para calcular graficamente a LD_{50} que foi o outro parâmetro utilizado para a definição das doses a serem testadas.

Durante o tempo em que as plantas permaneceram na câmara de crescimento, coletaram-se aleatoriamente para ca

da dose, 8 folhas primárias para contagem das manchas. Nestas, amostraram-se 2 quadrados de 0,25 cm^2 cada, localizados na base e no ápice da folha e contaram-se as manchas. Posteriormente, determinou-se através do peso, a área foliar e fizeram-se as transformações: número de manchas por folha e número de manchas por cm^2.

3.3. Teste definitivo de radiossensitividade

O ensaio foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Genética, em esquema fatorial com 5 repetições feitas no tempo, em 2 épocas do ano (3 no verão e 2 no inverno). Foram testadas 5 doses (0, 12, 24, 36 e 48 KR) determinadas com base nos resultados do teste preliminar e as 20 populações, representadas no ensaio por 10 plantas cada. Utilizaram-se 5 tanques plásticos por repetição, sendo que cada um, com um volume de 32 litros, recebia 200 plântulas.

Cada repetição representava um bloco completo, sendo cada tanque uma dose e nos tanques, as 20 populações. As doses eram sorteadas aleatoriamente e dentro das doses era feita a casualização das populações.

O tempo de duração do ensaio por repetição va-

riou de acordo com a época do ano, mantendo-se o critério de coleta de dados que será explicado adiante.

Para cada repetição foram separadas e escarificadas 15 sementes por população, por dose e mais 15 sementes que eram reservadas, sem pré-tratamento, para a determinação do teor de umidade.

Na determinação do teor de umidade, as sementes eram pesadas e, em seguida colocadas em estufa de circulação forçada de ar quente a 70°C, onde permaneciam por 4 dias, quando se obtinha o peso seco. Para calcular a porcentagem de umidade, empregou-se a seguinte fórmula:

$$\% \ U = \frac{PU - PS}{PU} \times 100$$

onde:

PU = peso úmido.

PS = peso seco.

No mesmo dia em que as sementes eram colocadas na estufa, as escarificadas eram irradiadas, nas doses indicadas, de forma aguda, ou seja, recebendo toda dose de uma só vez, com uma intensidade de irradiação de 465 KR/h (média das 5 repetições).

Em seguida, o material irradiado era semeado em caixas de germinação, sobre papel de filtro umedecido com água destilada e colocado em germinador de bandeja a 25°C, no escuro. A germinação era observada diariamente e, 3 dias após a semeadura, o material era transplantado para os tanques, na casa de vegetação.

A solução nutritiva utilizada foi a mesma do teste preliminar, com igual sistema de aeração e controle de pH. O nível do substrato líquido era mantido constante.

3.3.1. Caracteres avaliados

Durante a condução do ensaio, em cada repetição foram avaliados diversos caracteres, que são descritos a seguir.

3.3.1.1. Porcentagem de germinação

O material escarificado e irradiado era posto a germinar e faziam-se contagens diárias do número de sementes que emitiam radícula. Essa observação era feita por 3 dias, quando então, as 10 melhores plântulas eram transferidas para solução nutritiva.

O objetivo desse controle era medir o quanto o tratamento irradiação afetava a germinação das sementes e, através da testemunha, avaliar sua viabilidade. O período de 3 dias foi considerado suficiente,uma vez que o pico de germinação ocorre no 2º dia após a semeadura,conforme resultados do teste de germinação.

3.3.1.2. Altura de plântulas

Esse caráter era determinado, cerca de 10 dias após o transplante,quando 80% da testemunha já exibia folhas permanentes, medindo-se em cm, a distância entre a cicatriz cotiledonar e o ponto de inserção da primeira folha permanente.

A medida era tomada em todas as plântulas que estivessem dentro do critério de avaliação, em todas as repetições.

3.3.1.3. Número de manchas nas folhas primárias

Na última semana do ensaio, eram tomadas aleatoriamente 2 ou 3 folhas por população dos tratamentos irra

diados para contagem das manchas observadas.

Em cada folha, amostravam-se dois quadrados, de área conhecida,que variavam com o tamanho do limbo foliar, localizados nos dois extremos da área total (base e ápice) e contaram-se as manchas que aí apareciam. Posteriormente,por pesagem de xerografia do material,determinava-se a área e, matematicamente transformaram-se os dados para número de manchas por folha e número de manchas por unidade de área (cm^2).

Esse caráter é considerado uma medida bastante sensível de radiossensitividade e tem grande importância, uma vez que parece estar relacionado à freqüência de mutações na geração subsequente (BLIXT *et alii*, 1964).

3.3.1.4. Porcentagem de sobrevivência

O ensaio era interrompido 10 dias após a determinação da altura de plântulas, quando então eram tomados a porcentagem de sobrevivência e os caracteres que vêm a seguir.

Esse caráter era determinado,contando-se o número de plantas sobreviventes, em relação ao número de plântulas transplantadas.

Considerando-se a sobrevivência da testemunha como 100%, as porcentagens relativas a ela forneceram, graficamente o dado LD_{50} que é uma medida convencional do efeito da dose sobre o material irradiado.

3.3.1.5. Altura de plantas

A altura foi determinada, medindo-se em cm a parte aérea de todas as plantas sobreviventes de cada população. A medida era tomada da cicatriz cotiledonar até a última gema presente no ramo principal.

A porcentagem do decréscimo de altura, relativo à testemunha, forneceu graficamente a GR_{50}, que junto com a LD_{50} serviu de base para indicação da melhor dose a ser utilizada neste material.

3.3.1.6. Comprimento de raízes

Esse dado foi obtido, medindo-se em cm, a partir da cicatriz cotiledonar, a maior raiz do sistema radicular.

Como a sobrevivência e altura de plântulas e

de plantas, esse é um caráter que tende a diminuir com o aumento da dose. Fornece uma estimativa bastante sensível e precisa dos efeitos do tratamento mutagênico.

3.3.1.7. Área foliar

A área foliar total foi determinada utilizando-se a impressão em papel heliográfico de todas as folhas permanentes das plantas sobreviventes por população em cada repetição.

As folhas eram arrumadas em uma placa de vidro, separadas por população, dose e repetição. O papel heliográfico era colocado por cima e, em seguida uma tábua para servir de suporte. A seguir,o conjunto era exposto à luz (solar ou artificial) para a sensibilização do papel que era então colocado em uma câmara de amoníaco para sua revelação.

As folhas impressas, foram recortadas junto com uma área conhecida padronizada e foram pesadas. Por conversão de peso em área, obteve-se o dado em questão. A área utilizada como padrão,eram quadrados cujo tamanho variou de acordo com o tratamento, obedecendo às seguintes medidas:

0 KR	- 4 X 4 cm	-	16 cm^2
12 KR	- 3 X 3 cm	-	9 cm^2
24 KR	- 2 X 2 cm	-	4 cm^2
36 KR	- 1 X 1 cm	-	1 cm^2
48 KR	- 1 X 1 cm	-	1 cm^2

A área foliar total, convertida para dm^2 foi utilizada junto com o peso seco total para o cálculo da razão de área foliar, que forneceu uma estimativa da eficiência fotossintética.

A área foliar média (área foliar total dividida pelo número de plantas) foi utilizada diretamente como parâmetro de produção.

A determinação de área, pelo método descrito é bastante trabalhosa e demorada. Esses dados todos deveriam ser colhidos em um único dia, quando as plantas eram retiradas da solução nutritiva e o ensaio interrompido. Assim, no dia de coleta de dados, por serem 1000 plantas por repetição, tomaram-se apenas os dados de medição e, por restrição de tempo, o material era mantido sob refrigeração, de modo a ter seu desenvolvimento interrompido e então, as plantas iam sendo manuseadas, conforme disponibilidade de tempo.

3.3.1.8. Razão de área foliar

Logo após a determinação da área foliar, o material era separado em parte aérea e sistema radicular, sendo cortado no ponto onde aparecia a cicatriz cotiledonar e então, acondicionado em sacos de papel devidamente identificados. O material assim embalado era mantido sob refrigeração até que toda área foliar já estivesse determinada.

Quando todo material referente a 1 repetição já estava embalado, era colocado em uma estufa com circulação forçada de ar quente, mantida a 70°C durante 3 dias (72 horas),sendo então pesado em balança de precisão.

O peso seco total e a área foliar total foram utilizados na obtenção da razão de área foliar,que foi calculada,para todos os tratamentos, em todas repetições, de acordo com a fórmula (CASTRO *et alii*, 1972):

$$RAF = \frac{\text{Área Foliar Total } (dm^2)}{\text{Peso Seco Total (gr)}}$$

Essa relação dá uma estimativa indireta da eficiência fotossintética do material.

3.3.1.9. Relação parte aérea - raiz

Foi calculada, com base no peso seco em grs, das partes, para todos os tratamentos, nas 5 repetições, segundo a fórmula:

$$R\ PA/R = \frac{\text{Peso seco parte aérea (grs)}}{\text{Peso seco raiz (grs)}}$$

Esse dado permite estimar a eficiência fotossintética, bem como dá uma idéia da produtividade do material.

3.3.2. Duração e época das repetições

Foram feitas, durante todo ensaio, 5 repetições, sendo 3 no verão e 2 no inverno.

A duração de cada repetição variou com a época do ano, sendo mais longas no inverno que no verão, uma vez que, como foi visto, manteve-se um critério biológico para a coleta de dados.

Nas repetições de inverno, para melhorar as condições ambientais, de modo a favorecer o estabelecimento das plantas, foi utilizado, na casa de vegetação, uma luminária, colocada 1 m acima dos tanques, composta por 3 lâmpadas fluores

centes de 40W cada e 6 lâmpadas incandescentes de 100W cada. Essa luminária,que permanecia ligada o tempo suficiente para proporcionar 16 horas de luz, tinha função dupla: além de aumentar o período de horas de claro, deveria também fornecer energia ao conjunto, de modo a elevar a temperatura na camada de ar que circundava as plantas. As luzes,entretanto,não ficaram acesas durante o dia, quando as plantas tinham condições de receber radiação solar.

A instalação de luz artificial não visou corrigir a incidência de radiação,uma vez que a diferença é muito grande entre as épocas de verão e inverno, mas apenas minimizar as adversidades climáticas de modo a perder o menor número possível de plantas.

São apresentadas, a seguir, as datas de instalação e término de cada repetição,mostrando a diferença de número de dias entre elas.

	DATAS	
REPETIÇÃO	INÍCIO	TÉRMINO
1- Verão	16/02/81	14/03/81
2- Inverno	29/04/81	26/05/81
3- Inverno	23/06/81	01/08/81
4- Verão	12/08/81	17/09/81
5- Verão	21/10/81	13/11/81

3.3.3. Análise estatística dos dados

Pela própria natureza do ensaio, ocorrem falhas nos dados, especialmente nos tratamentos (doses) mais fortes. Assim, para ser possível a análise estatística, foram retiradas do conjunto de tratamento, as populações de números 15, 19 e 21 e a dose 48 KR.

Os caracteres: germinação, sobrevivência, manchas nas folhas primárias, altura de plantas, comprimento de raízes e relação parte aérea-raiz foram então analisados para 4 doses de radiação (0, 12, 24 e 36 KR).

Nos caracteres altura de plântulas, área foliar e razão de área foliar, a dose de 36 KR também teve que ser omitida, restando então, apenas 3 níveis para serem analisados, nesses dados.

Para a análise de variância, foi empregado o método dos quadrados mínimos para dados não balanceados, proposto por HARVEY (1960), com a utilização do programa LSMLGPP.

A equação matemática do modelo de análise é o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + D_{jk} + E_{ik} + P_{ij} + DxE_{ij} + DxP_{ik} + \sigma_{ijk}$$

onde:

Y_{ijk} = observação fenotípica de um dado caráter na dose i, época j e população k.

μ = média geral do caráter.

D_{jk} = efeito fixo do tratamento dose na época j, sobre a população k.

E_{ik} = efeito fixo de épocas sobre a dose i e a população k.

P_{ij} = efeito fixo de populações na dose i e época j.

DxE_{ij} = efeito da interação de doses i com épocas j.

DxP_{ik} = efeito da interação de doses i com populações k.

σ_{ijk} = efeito aleatório do erro experimental.

O esquema de análise de variância obtido, com base no modelo matemático é exposto a seguir.

F.V.	G.L.	Q.M.	E (Q.M.)	F
Doses (D)	d-1	Q_1	$\sigma^2 e+nj k\sigma^2 i$	Q_1/Q_6
Épocas (E)	e-1	Q_2	$\sigma^2 e+nik\sigma^2 j$	Q_2/Q_6
Populações (P)	p-1	Q_3	$\sigma^2 e+nij\sigma^2 k$	Q_3/Q_6
D x E	(d-1)(e-1)	Q_4	$\sigma^2 e+nk\sigma^2 ij$	Q_4/Q_6
D x P	(d-1)(p-1)	Q_5	$\sigma^2 e+nj\sigma^2 ik$	Q_5/Q_6
Erro		Q_6	$\sigma^2 e$	
Total	(nxdxexp) - 1			

n = número de observações
i = dose
j = época
k = população

Também são apresentadas as análises de regressão e correlações entre os caracteres.

As observações experimentais para os caracteres, porcentagem de germinação e porcentagem de sobrevivência, foram transformadas em arc sen $\sqrt{\%}$ e, a contagem do número de manchas nas folhas primárias, sofreu a transformação $\sqrt{x + 0,5}$, de acordo com as recomendações de BARTLETT (1947), STEEL e TORRIE (1960); SNEDECOR e COCHRAN (1967) e BORGES-DEMÉTRIO(1978).

Os resultados que apresentaram significância foram submetidos ao teste de Tuckey, para comparação de médias, com a fórmula indicada por PIMENTEL GOMES (1977):

$$\Delta = q \cdot \sqrt{\frac{1}{2} \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right) \cdot QME}$$

onde:

q = amplitude total estudentizada (tabela).

r_1 = número de observações que envolvem a média 1.

r_2 = número de observações que envolvem a média 2.

QME = quadrado médio residual do caráter envolvido.

Todos os resultados, discussão e conclusões, são válidos então para 17 populações e, dosagens de radiação acima indicadas.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de germinação

Os resultados do teste de germinação,são apresentados na Tabela 2. Em ausência de escarificação, pode-se estimar o grau de dormência das sementes, sendo que se obteve germinação média de 34%. No tratamento escarificado tem-se uma uma idéia mais real da viabilidade das sementes, bem como da eficiência da escarificação manual aplicada ao material. Nessa situação obteve-se germinação média de 95%.

As sementes mostraram excelente germinação quando escarificadas (Tabela 2), embora já tivessem 7 - 8 meses de armazenamento em câmara seca.

Tanto no ensaio com escarificação, como em ausência desta, o pico de germinação ocorreu no segundo dia após semeadura, para as condições do ensaio (25°C, no escuro).

As sementes que não germinaram até o sexto dia, via de regra sofriam ataque de fungos e se perdiam.

Os resultados foram mais homogêneos nas sementes escarificadas, variando de 85 a 100%. Quando não se aplicou pré-tratamento, os resultados mostraram uma faixa mais ampla, sendo que as populações 19 com valor de 70% e, 8 e 18 com 58% de germinação foram as que mostraram menor dormência e as populações 10 e 15 com 15%, a maior (Tabela 2).

4.2. Ensaio preliminar de radiossensitividade

Nessa fase do ensaio, estimou-se a viabilidade do método e buscou-se a base para o ensaio definitivo.

Aqui foi possível observar a resposta do material ao emprego de radiações, tanto nas características medidas (altura de plântulas e sobrevivência), como nas alterações morfológicas e fisiológicas manifestadas na geração M_1, observáveis visualmente.

A contagem das manchas nas folhas primárias, foi feita mais com o objetivo de um ajuste de metodologia, do que como uma determinação propriamente dita. Por esse motivo, são omitidos os resultados desse caráter. Entretanto, obser-

vou-se que os setores - a que aparecem em *Centrosema pubescens* são bastante regulares, pontiformes e muito bem delimitados, o que facilita a obtenção dos dados. O método empregado se mostrou bastante satisfatório sendo portanto adotado também no ensaio definitivo.

Os resultados da altura de plântulas e sobrevivência são apresentados na forma de GR_{50} e LD_{50}, em gráficos (Figuras 1 e 2). Para se determinar os pontos das curvas, considera-se a altura e sobrevivência da testemunha (tratamento sem irradiação) como sendo 100% e os decréscimos causados pelos tratamentos são transformados para porcentagens, relativas à testemunha. Com base na GR_{50} de 39 KR e na LD_{50} de 33 KR obtidas graficamente pelas curvas de redução de crescimento e sobrevivência, determinaram-se as doses utilizadas no ensaio definitivo.

A diminuição na altura das plantas, confirmada pelas medições, era facilmente observada no conjunto de plantas.

4.3. Teste definitivo de radiossensitividade

Conforme já explicado no ítem 3.3.3., para ser possível a análise estatística, foi necessário omitir os da-

dos referentes às populações 15, 19 e 21 e para todas as populações a dose de 48 KR que causou um alto índice de mortalidade provocando muitas falhas nas respostas.

Para alguns caracteres, foi preciso eliminar também a dose de 36 KR, pelo mesmo motivo exposto. A fim de tornar possível englobar todos os caracteres as correlações foram então obtidas com base em 3 doses de radiação.

Adotou-se, para maior segurança, o nível de 1% de probabilidade para todos os testes aplicados. Alguns resultados seriam significativos a 5%, mas não foram assim considerados, para diminuir a margem de erro e homogeneizar o critério das conclusões.

4.3.1. Porcentagem de germinação

Esse caráter foi analisado com 4 doses de radiação,para as 17 populações, cujos resultados são apresentados na Tabela 3. De acordo com o critério adotado, obteve-se diferença significativa para doses e populações.

Pela aplicação do teste de Tuckey às médias das populações, nota-se que a resposta é bastante diferente em algumas (Tabela 5). As populações 1, 6 e 13 tiveram uma res-

posta menor, porém similar, à aplicação de radiação. Isto é, não apresentam diferenças entre si, mas diferem do resto. Contrariamente, as populações mais afetadas em sua germinação foram as de números 2 e 17. As outras apresentam respostas intermediárias com comportamento semelhante entre si em algumas.

A comparação de médias das doses, mostra diferença entre 0 KR (dose 1) e 36 KR (dose 4), sendo que as intermediárias 12 e 24 KR (doses 2 e 3) têm efeitos similares sobre a germinação das diferentes populações (Tabela 6).

Não houve efeito diferencial de época sobre a germinação das populações em estudo.

O desdobramento do efeito de doses, mostrou uma regressão linear para o caráter. A equação consta da Tabela 11.

Por esses resultados, pode-se admitir que, ao aumento da dose, ocorre um decréscimo linear na porcentagem de germinação e que essa redução não é igual para todas as populações.

Esse caráter mostrou correlação muito baixa com todos os outros avaliados (Tabela 13).

4.3.2. Altura de plântulas

As medições de altura de plântulas eram feitas, quando 80% da testemunha apresentasse folhas permanentes, e só eram medidas as plantinhas que pelo menos apresentassem os primórdios foliares já bem desenvolvidos. Assim, muitos dados não puderam ser colhidos, pelo desenvolvimento mais lento das plantas irradiadas.

Devido a essas falhas, o caráter só pode ser analisado para 3 doses. Os resultados mostraram efeito significativo para doses e populações (Tabela 4).

Assim como para germinação, pode-se inferir que a redução na altura de plântulas decorrente da aplicação de raios-γ, é diferente para as populações testadas.

A comparação de médias para populações e doses está relacionada nas Tabelas 5 e 7. Embora a análise de variância tenha mostrado um comportamento diferencial de populações, nos contrastes testados, não foi possível detectar diferenças estatísticas. Quanto às doses, todas comparações foram significantes a 1% de probabilidade.

O desdobramento com base em doses, mostrou uma regressão linear para o caráter, cuja equação é mostrada na

Tabela 12.

Esse caráter mostrou baixa correlação com os demais analisados (Tabela 13).

4.3.3. Número de manchas nas folhas primárias

Pelos resultados apresentados na Tabela 3, pode-se observar efeito diferencial de doses e épocas para o caráter citado.

Para a análise estatística, adotou-se o valor zero para os dados referentes à dose 0 KR, onde não aparecem as manchas. Esses dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, a fim de terem sua distribuição aproximada à normal ou de Gauss.

O desdobramento de doses mostrou efeito significativo até para regressão cúbica, mas, admite-se para o caso apenas a regressão quadrática, por se tratarem de apenas 4 pontos e o coeficiente de variação dos dados se mostrar relativamente alto (Tabela 3).

Aplicando-se o teste de Tuckey para as médias das doses, pode-se verificar que todas apresentaram diferenças significativas (Tabela 6).

Comparando-se as médias de épocas, observa-se que o verão se mostra mais adequado a obtenção desse dado.

A equação da curva de regressão é mostrada na Tabela 11.

Esse caráter, número de manchas nas folhas primárias, apresentou correlação negativa com todos os outros analisados (Tabela 13).

4.3.4. Porcentagem de sobrevivência

A Tabela 3, mostra a análise de variância para sobrevivência, avaliada com 4 doses de radiação. De acordo com esses resultados, houve efeito significativo para doses e épocas.

Aplicando-se o teste de comparação de médias para doses,observa-se que as doses 0 e 12 KR têm comportamento similar sobre o caráter e que 24 e 36 KR diferem entre si e também das inferiores (Tabela 6).

Pela análise das médias de épocas,pode-se verificar que o inverno se sobressai ao verão.

O desdobramento para doses, indicou regressão

quadrática para o caráter e o modelo de equação se encontra na Tabela 11.

A maior correlação obtida,foi de 39,99%,com relação parte aérea/raiz (Tabela 13).

Com base na porcentagem de sobrevivência, calculou-se a LD_{50} para cada população, nas duas épocas,cujos valores compõem a Tabela 14. Nesta, estão também os valores de LD_{30}, determinadas graficamente, que segundo ANDO (1982) seriam mais recomendáveis para emprego em programas de melhoramento,por causarem razoável dano genético nos materiais, apresentando um índice menor de esterilidade ou um nível de fertilidade maior ao que seria obtido com a LD_{50}.

Comparando-se visualmente os dados, pode-se observar que, em média, a LD_{30} está cerca de 6 KR abaixo da LD_{50} para todas as populações, embora essas apresentem diferenças entre si (Tabela 14).

As Figuras 3 e 4 mostram os gráficos utilizados para a obtenção da LD_{50} e LD_{30}, para as épocas de inverno e verão,respectivamente, em curvas individuais por população.

4.3.5. Altura de plantas

Analisando-se os dados da Tabela 3, observa-se que houve diferença significativa, tanto para doses e épocas, como para a interação entre esses fatores.

A comparação de médias para doses (Tabela 6), permitiu ressaltar a diferença entre os tratamentos. Quanto à época, pela significância e análise dos dados, verifica-se que o verão é mais recomendado para obtenção dos dados.

Aplicando-se o teste de Tuckey às médias da interação dose X época (Tabela 8),confirmou-se a maior uniformidade dos dados de inverno, onde não se obteve significância nos contrastes que envolviam doses próximas,apresentando diferenças estatísticas apenas as comparações entre as doses 1 e 3 e 1 e 4. Na época de verão,entretanto, todos contrastes foram significativos, com excessão de dose 3 contra dose 4.

O desdobramento com base em doses, revelou regressão cúbica para o caráter, mas tal como para número de manchas, assume-se apenas a regressão quadrática, cuja equação está na Tabela 11.

Esse caráter mostrou correlação de 54,87% com relação parte aérea/raiz e de 77,49% com área foliar,sendo es

te, o mais alto valor obtido entre caracteres (Tabela 13).

Com os dados de altura de plantas, transformados em porcentagem relativa à testemunha, calcularam-se os valores da GR_{50}, que são apresentados na Tabela 14. As curvas utilizadas para a obtenção desses gráficos são mostradas nas Figuras 3 e 4.

O efeito estimulante de baixas doses foi facilmente observado, sendo que em algumas populações, a média de altura de plantas a 12 KR foi superior a da testemunha.

4.3.6. Comprimento de raízes

Os dados analisados com 4 doses de radiação mostraram diferenças significativas para os efeitos de doses e da interação doses X épocas (Tabela 3).

A comparação de médias para doses, apresentou todos os contrastes significativos, pelo teste de Tuckey (Tabela 6).

Não houve influência de época sobre a determinação do caráter. Realmente, durante a condução do ensaio pode-se observar que a característica se mantinha, com pouca variação nas 2 épocas e que também, foi uma das que menos fa-

lhas apresentou.

A Tabela 9 mostra os resultados do teste de Tuckey aplicado às médias da interação dose X época, podendo-se verificar que só não mostrou diferença significativa o contraste entre as doses 1 e 2 na época do inverno.

O desdobramento de doses revelou a regressão linear do caráter e a equação da reta está na Tabela 11.

A mais alta correlação encontrada, foi de 57,75%, com o caráter área foliar (Tabela 13).

4.3.7. Área foliar

A parte aérea das plantas, aparentemente era a mais prejudicada pelo tratamento mutagênico, o que causou muitas falhas nos dados que envolviam essa estrutura. Assim, o caráter área foliar só foi analisado para 3 doses de radiação e mostrou diferenças significativas para doses, épocas e na interação entre esses fatores (Tabela 4).

A comparação de médias das doses, mostrada na Tabela 7, revelou efeito diferencial em todos os contrastes permitidos.

O efeito significativo de épocas, pelos testes, possibilitou indicar o verão como época mais adequada à coleta desse dado.

Na Tabela 10 se encontram os resultados da comparação de médias da interação dose X época, onde pode-se observar que, para a época de inverno, só foi significativo o contraste entre as doses 1 e 3. Para a época de verão, todos mostraram diferenças estatísticas.

O desdobramento de doses, confirmou a regressão linear do caráter cuja equação é mostrada na Tabela 12.

4.3.8. Razão de área foliar

Esses dados, de grande importância, por permitirem estimar a eficiência fotossintética das populações em estudo, só puderam ser analisados para 3 doses de radiação.

A análise estatística desse caráter é mostrada na Tabela 4, onde é possível observar efeito significativo de doses e épocas.

No desdobramento de doses, obteve-se regressão linear do efeito e sua equação é mostrada na Tabela 12.

Da significância do fator épocas e comparação das médias, observa-se que a época de verão é superior a inverno.

Esse caráter apresentou uma correlação média com relação parte aérea/raiz, com valor de 52,47% (Tabela 13).

4.3.9. Relação parte aérea/raiz

A Tabela 3 contém os resultados da análise estatística dos dados referentes a esse caráter. Observa-se diferença significativa para doses e épocas.

A comparação de médias de doses, pelo teste de Tuckey (Tabela 7), mostra comportamento diferencial em todos contrastes possíveis.

Quanto ao efeito de épocas, o verão, também para esse caráter, foi mais adequado à obtenção dos dados que o inverno.

O desdobramento do efeito de doses, dá uma regressão linear para o caráter e sua equação é mostrada na Tabela 11.

Como já foi mencionado no ítem 4.3.5., o caráter teve boa correlação com altura de plantas (Tabela 13).

4.4. Outras observações

Durante a condução do ensaio, observaram-se muitas alterações morfológicas em plantas, nos diferentes tratamentos.

Já no ensaio preliminar, além de alterações no formato e coloração das folhas (presença de áreas mais claras) observaram-se alterações no hábito de crescimento, sendo que algumas plantas emitiram muita brotação lateral, antes de assumirem o hábito indeterminado. Possivelmente esse material tenha sofrido uma inibição temporária da gema apical, por efeito das radiações. Essa alteração foi observada a 20 KR.

No ensaio definitivo, observaram-se muitas alterações no formato dos caules e ramos, bem como, intensa emissão de brotação lateral, caracterizando o tipo fasciado, já descrito para outras leguminosas. Foi possível encontrar essa alteração em todas as dosagens utilizadas (12 a 48 KR).

Algumas populações se sobressairam em exibir o caráter. Foi o caso da 6 que apresentou indivíduos altera-

dos até em 48 KR, da 17 que mostrou aberrações crescentes em 12, 24 e 36 KR e das 8 e 13 que apresentaram muitos indivíduos alterados,especialmente em 12 e 24 KR. Essas alterações, no entanto, não foram testadas, para se afirmar que se tratem de mutantes fasciados, já fixados.

Pode-se observar também que nas repetições onde,durante a fase de estabelecimento, a temperatura era mais baixa, e, se elevava por volta do 10º dia após o transplante, o aparecimento de alterações morfológicas,bem como a sobrevivência eram favorecidos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Porcentagem de germinação

Discordando da maioria dos autores citados na literatura a espécie *Centrosoma pubescens* mostrou redução significativa na germinação com a aplicação de doses crescentes de irradiação (Tabela 3). O mesmo resultado entretanto, foi observado por STEAGALL (1977), trabalhando com 10 populações de milho.

O decréscimo de germinação apresentado, não foi muito grande em termos absolutos, mas foi suficiente para ser estatisticamente significativo (Tabela 3).

Através de comparação de médias, (Tabela 5),

pode-se verificar que as populações que menos sofreram ou, que apresentaram maior radiorresistência, são as de números 1, 6 e 13. Essas populações são variedades procedentes do Perú (1) e Austrália (6 e 13) e que apresentavam teores relativamente baixos de umidade nas sementes (Tabela 1 e Apêndice 3).

Por se tratar de variedades comerciais re-introduzidas no Brasil, e, considerando-se o sistema de reprodução da espécie, espera-se encontrar uma base genética muito estreita entre essas introduções. Teoricamente, devem apresentar menor variabilidade e um maior grau de homozigosidade. Como decorrência, deveriam ser mais sensíveis aos efeitos da radiação.

Também, contrariamente, as populações mais prejudicadas em sua germinação, foram as de números 2 e 17, que são procedentes do Rio de Janeiro,e se constituem de material nativo (Tabela 1).

O mau desempenho da população 17, pode ser explicado pelo teor de umidade relativamente alto nas sementes, que podem ter sofrido um efeito adicional de radicais livres, embora tenham sido semeadas imediatamente após a irradiação, bem como, por um acréscimo de sensitividade devido ao maior teor hídrico.

Não se observou efeito diferencial de épocas (Tabela 3), o que pode facilmente ser explicado pela maneira controlada como era obtido o dado. Isto é, nas duas épocas estudadas, a condição para a germinação era a mesma: 25°C, no escuro. Assim, o ambiente foi sempre uniforme.

Entretanto, é de se esperar que a emergência em condições de campo sofra efeito de época, especialmente por limitação de temperatura, que sabidamente altera a atividade metabólica celular.

O efeito de doses, como era esperado, foi significativo (Tabela 3) embora a comparação de médias tenha mostrado que as doses de 12 e 24 KR têm efeito similar sobre as populações, havendo grande diferença entre 0 e 36 KR (Tabela 6).

O acréscimo de 12 KR de raios γ é um aumento considerável, em termos de radiação ionizante e portanto, espera-se maior reação do material. A semelhança de efeitos de 12 e 24 KR pode ser explicada pela pouca sensibilidade do caráter como indicador de radiossensitividade.

5.2. Altura de plântulas

Esse caráter, juntamente com porcentagem de

germinação foram os dois únicos que apresentaram significância estatística entre populações (Tabelas 3 e 4). Entretanto, nos contrastes de médias testados para esse caráter (Tabela 5), não foi possível reunir as populações por grupos de reação.

A explicação cabível para o fato dos outros caracteres avaliados não mostrarem diferenças significativas e esses, que foram medidos mais precocemente no ensaio apresentarem, pode se relacionar ao fato de que, nessa fase, a plantinha ainda depende muito das reservas da semente. Assim, as diferenças de resposta, seriam mais uma característica da própria planta, que propriamente um efeito dos tratamentos aplicados. Dessa forma, os efeitos não se mantêm em estágios mais avançados do desenvolvimento vegetativo.

GAUL (1970) ressalta que uma comparação entre e dentro de experimentos, pode sofrer, para um dado tratamento, um atraso na germinação e que medidas muito precoces podem não possibilitar a distinção entre esse efeito e a redução na altura. Embora não se tenha observado um atraso relevante na germinação, a redução no crescimento, pode ser sensível na fase de plântula. Então, novamente pode-se afirmar que medições muito precoces não são exatas, confundindo reações da planta com efeito de tratamento.

Uma outra explicação é a de que a irradiação

poderia afetar mais diretamente as características relacionadas à sobrevivência e desenvolvimento vegetativo, de maneira tal, a uniformizar as reações, confundindo diferenças genotípicas, nas características de determinação mais tardia.

Assim, torna-se interessante verificar se realmente existe diferença genotípica, ao nível de populações, através de estudos citológicos e de eletroforese, como também, estabelecer melhor a época de coleta de dados, para não incorrer em erros.

A comparação de médias das doses, mostrou que todas têm efeito significativo sobre o caráter (Tabela 7).

Vários autores já obtiveram esse resultado, sobre a redução da altura de plântulas, sendo portanto bem estudado. O problema é que não se pode generalizar muito as conclusões, uma vez que as épocas de determinação e as dosagens utilizadas variam muito de um ensaio a outro.

De qualquer forma, a redução na altura de plântulas é um dado universalmente utilizado como indicador de radiossensitividade,sendo que, inclusive, STEAGALL (1977) o elegeu como o mais sensível determinador em seu ensaio. Por outro lado, GUIMARÃES (1978) não encontrou redução considerável na altura das plântulas de arroz, por ele estudadas.

Os resultados deste trabalho permitem indicar os caracteres medidos mais tardiamente como sendo mais exatos na determinação dos efeitos das radiações.

5.3. Manchas nas folhas primárias

A aplicabilidade desse caráter como indicador do efeito do mutagênico, está mais na dependência do estudo de freqüência de mutantes, que seria a etapa posterior a esse trabalho.

Entretanto, a quantificação das manchas nas folhas primárias, neste ensaio, permite indicá-la como bom medidor de radiossensitividade.

Observa-se claramente o aumento do número de manchas por folha, sendo concordante com a redução da área foliar em doses crescentes. Os dados obtidos e a confirmação estatística revelou uma regressão quadrática para o caráter (Tabela 3). Isto significa que o número de manchas vai aumentando até um limite, quando então começa a decrescer.

Esse ponto de inflexão da curva pode estar relacionado à letalidade e queda de fertilidade do material irradiado. Uma vez que o número de manchas é praticamente cons

tante, por unidade de área, o aumento é proporcional à diminuição do limbo foliar. Essa redução é crescente com o aumento de doses até o limite da letalidade. Assim, a curva determinada pelo número de manchas em diversas doses, poderia dar uma idéia mais real do efeito deletério das dosagens, que outros caracteres.

Observou-se também efeito significativo de épocas na manifestação do caráter (Tabela 3), sendo que a época de verão mostrou-se mais favorável. Isso é explicado pelo fato de que toda parte aérea fica prejudicada no inverno, com o crescimento mais lento e a produção bem reduzida, o que pode confundir ou alterar o resultado de contagens.

Na época de verão, todo potencial de crescimento da planta é explorado, o que permite que os dados obtidos, bem como as diferenças encontradas, sejam mais exatos.

A regressão cúbica acusada na análise estatística (Tabela 3), deve-se provavelmente à dispersão dos dados. Com apenas quatro pontos na determinação da curva, torna-se um tanto temerário assumir esse resultado. Entretanto, é recomendável mais estudos sobre esse aspecto, para se confirmar o tipo de regressão que realmente obedece a curva.

Uma análise com mais pontos, bem como um estu

do mais profundo do mecanismo que controla o aparecimento de manchas seria de grande interesse, uma vez que o caráter, de acordo com BLIXT *et alii* (1960 e 1964) e ZACHARIAS e EHRENBERG (1962) está muito mais relacionado à mutações gênicas que redução no crescimento ou letalidade. Se os dados tivessem revelado uma diferença entre as populações, seria possível, baseado nessa teoria, agrupá-las por graus de heterozigosidade e até levantar hipóteses sobre a relação filogenética do material. Mas, como as diferenças observadas foram muito pequenas, pode-se afirmar que as populações devem ter um conteúdo genético semelhante, pela mesma teoria.

A comparação de médias de doses, pelo teste de Tuckey (Tabela 6) mostrou o efeito diferencial de todos os tratamentos sobre a manifestação do caráter. Mesmo em doses baixas ele pode ser facilmente quantificado e já mostrou significância estatística. Esse fato é um bom indicador da precisão do caráter, que segundo BLIXT *et alii* (1964) é cerca de 100 vezes mais sensível.

Essas manchas apresentam tendência oposta às outras características medidas, tanto que apresentam correlação negativa com todas elas (Tabela 13). Isto é, enquanto os outros caracteres diminuem com o acréscimo de dosagem, os setores-a aumentam, justamente como, teoricamente, deve ocorrer com as mutações. Assim, esse caráter realmente deve estar

mais relacionado a alterações gênicas, que os chamados efeitos fisiológicos.

5.4. Porcentagem de Sobrevivência

Os dados experimentais obtidos para esse caráter foram concordantes com o que se encontra nas teorias e literatura citadas sobre o assunto.

GAUL (1970) recomenda que a determinação da sobrevivência seja feita por ocasião da colheita da geração M_1 e em muitos trabalhos com cereais esse dado é obtido na fase adulta da planta. Embora neste ensaio, a coleta de dados tenha sido feita por volta dos 30 dias após a germinação das sementes, o caráter já mostrou claramente a tendência esperada de redução em resposta ao aumento da dose (Figs. 3 e 4).

Assim, pode-se dizer que sobrevivência é um caráter bastante sensível para medir os efeitos das radiações e, para o material utilizado pode ser medido mais cedo, o que facilita a obtenção de dados, por ser um caráter de simples e rápida determinação.

É porém, mais sensível a doses mais altas, uma vez que a comparação de médias (Tabela 6), mostrou que 0 e 12

KR tiveram um efeito similar sobre as populações estudadas. Isto é, a dose de 12 KR não foi suficiente para inibir significantemente a sobrevivência.

O efeito significativo de épocas (Tabela 3), indicando o inverno como mais adequado, pode ser explicado pelo pouco desenvolvimento das plantas nesta época, exigindo menos energia para crescimento. Provavelmente, nessas condições, a planta não tinha atingido uma condição de estresse tal que manifestasse a mortalidade real em altas dosès. Assim, o número de sobreviventes nessa época foi maior.

De acordo com esse raciocínio, os dados obtidos na época do verão, seriam então, indicadores mais reais do efeito do tratamento mutagênico.

Com os dados de sobrevivência, estimou-se graficamente o valor da LD_{50} que serve como parâmetro para se comparar radiossensitividade, além de indicar a dose passível de ser utilizada no material para se induzir mutações (Tabela 14 e Figs 3 e 4).

GAUL (1970) afirma que para programas de melhoramento, procura-se um tratamento mutagênico com baixo efeito fisiológico e altos danos genéticos. ANDO (1982) ressalta que para indução de mutação, é melhor se aplicar a LD_{30} pelo

fato que, nessa faixa, os indivíduos apresentam menores problemas de fertilidade, aparecendo menos esterilidade.

A LD_{30} calculada graficamente para as populações de *Centrosoma pubescens*, acompanha as tendências da LD_{50} Mesmo, os valores de LD_{50} diferindo ligeiramente entre si, os de LD_{30} mantiveram essas diferenças, mas com uma característica muito interessante de, em média, todos os valores estarem a 6 KR abaixo dos obtidos para a LD_{50} (Tabela 14 e Figs 3 e 4).

Assim, para se obter a melhor dose a ser empregada na espécie estudada, basta calcular a LD_{50} em uma amostra do material e trabalhar com 6 KR a menos.

Esse comportamento similar de resposta é também um indicativo da homogeneidade do material, em termos genéticos.

5.5. Altura de Plantas

Esse caráter, embora medido precocemente (por volta de 30 dias após germinação), também teve o comportamento esperado, de acordo com o que se encontra em literatura.

Nesse, como em todos os caracteres medidos no final do experimento, não foi possível detectar diferenças entre populações.

É sabido que os vegetais apresentam diferenças de radiossensitividade, a nível de variedades e, embora fosse de se esperar, as populações de *Centrosema pubescens*, mesmo tendo origens bem distintas, não revelaram diferença de reação.

A altura de plantas forneceu os dados de GR_{50} (Tabela 14), que também não diferiram muito entre si, mas, como não foram submetidos a testes estatísticos, não se pode afirmar que sejam semelhantes.

Os dados apresentaram um coeficiente de variação altíssimo (Tabela 3), e isso é explicado pela grande diferença na altura de plantas observadas nas épocas de verão e inverno.

O teste de comparação de médias para épocas, mostrou que o verão é melhor que inverno. Evidentemente, as plantas no verão se desenvolvem muito mais rápido, com produtividade muito alta.

Todos os dados que envolvem parte aérea de

plantas ficaram muito prejudicadas nas repetições de inverno.

Durante a coleta de dados, era possível observar-se que aqueles coletados no inverno variavam muito menos, ou, tinham dispersão menor que os obtidos no verão. Portanto, os resultados de análise, indicando o verão, devem estar mais relacionados ao melhor desempenho das plantas nessa época, proporcionando médias maiores, que à qualidade do dado como medidor de efeito.

A comparação de médias da interação dose x época (Tabela 8), vem confirmar a uniformidade das medidas de inverno, onde só se obteve diferenças significativas para os contrastes de dose 1 com 3 e 1 com 4. Assim, no inverno, o acréscimo de 12 KR não provoca alterações relevantes, enquanto no verão, isso só não ocorreu entre as doses mais altas, onde a redução de crescimento já era bem mais drástica. Possivelmente esse fato possa ser explicado pela maior taxa metabólica celular, no verão, tornando as plantas mais sensíveis à ação da radiação ionizante.

Isso tudo contribuiu para que as diferenças observadas nas populações e mesmo entre plantas não se tornassem estatisticamente sensíveis.

A comparação de médias para doses mostrou a sensibilidade do caráter, sendo significativos todos os contrastes testados. Nesse ponto, é mais indicado que sobrevivência, pois ressalta diferenças até nos tratamentos mais fracos.

A significância para regressão cúbica obtida na análise de variância (Tabela 3) pode ser explicada pelo alto coeficiente de variação dos dados, motivo que também levou a rejeitar-se essa curva como resposta do caráter.

5.6. Comprimento de Raízes

GAUL (1970) considera que a medida do comprimento das raízes é um método rápido para a determinação do efeito do mutagênico sobre a semente. Entretanto, poucos são os trabalhos que utilizam esse critério como indicador de radiossensitividade.

Neste ensaio, o caráter se mostrou bastante sensível à ação de radiações, com uma vantagem adicional de não sofrer influência de épocas do ano (Tabela 3).

Assim, o pesquisador que não dispõe de uma câ

mara simuladora de ambiente, pode, em qualquer época, determinar a sensitividade a radiações em materiais que pretenda estudar.

É interessante também a observação que à medida que o comprimento das raízes diminui, seus diâmetros aumentam. Seria muito útil estudar as correlações entre esses caracteres, pois o diâmetro, se utilizarmos um dialímetro, é ainda mais rápido de se medir que o comprimento de raízes, caso exista uma correlação que justifique a alteração na metodologia.

Esse caráter respondeu muito bem às radiações com gradiente de crescimento linear, visivelmente observável (Tabela 3). Também, a comparação de médias para doses, mostrou diferença significativa mesmo nos contrastes envolvendo os tratamentos mais fracos, o que revela uma grande sensibilidade (Tabela 6).

O alto coeficiente de variação (Tabela 3) é devido ao fato que no inverno as medidas foram um pouco menores que no verão, embora as diferenças entre elas fossem mantidas. Apesar disso, como foram colocadas juntas na análise, causaram uma elevação no coeficiente de variação.

5.7. Área Foliar

Esse caráter foi incluído, a fim de avaliar o efeito da radiação sobre a capacidade fotossintética do material. Assim, a redução da área foliar daria uma estimativa indireta da alteração na atividade sintetizadora do material.

Os dados variaram muito entre repetições e, inclusive entre populações, embora não tenha sido possível detectar estatisticamente diferenças significativas (Tabela 4).

Essa variação entre populações era esperada, pois, de acordo com MOGROVEJO JARAMILLO (1980), o material exibe alta variabilidade para produção de massa verde. Entretanto, a variação como resposta à irradiação não permitiu que essa observação se repetisse.

A determinação da área foliar não se mostrou, um caráter muito sensível, embora baixas doses já apresentem diferenças significativas, porque os dados sempre terão um coeficiente de variação altíssimo devido às características próprias de cada população. Além disso foi visivelmente o caráter que mais sofreu o efeito de épocas, sendo muito superior no verão.

Da interação dose x época (Tabela 10), pode-se verificar que no inverno, os dados apresentam maior uniformidade e os dados perdem precisão, sendo mais homogêneos e não revelando diferenças que são observadas no verão.

Entretanto, mostrou alta correlação (Tabela 13) com altura de plantas (77,49%) que é um caráter bastante sensível e de fácil obtenção. Por esse motivo a utilização de altura de plantas poderia servir como indicador de eficiência fotossintética.

5.8. Razão de Área Foliar

Esse dado é bastante comum em trabalhos da área de fisiologia, para estimar os danos causados por pragas (CASTRO *et alii*, 1972), mas raramente é citado em ensaios com radiação.

É um indicador de eficiência fotossintética e se mostrou sensível até a baixas doses. O efeito de épocas indicando o verão como mais favorável, está relacionado à melhor produção das plantas nesta estação.

A curva de regressão quadrática obtida (Tabe

la 4), pode ser explicada pela diminuição da planta, no total e aí, a partir de uma certa dose, proporcionalmente, a eficiência fotossintética aumentaria.

Essa mesma resposta, como era de se esperar, não foi obtida para área foliar, que apresenta regressão linear (Tabela 4) e, possivelmente não seria obtida para peso seco, para o qual também é esperado resposta linear.

Esse caráter mostrou apenas uma correlação média de 52,47% (Tabela 13), com relação parte aérea-raiz que é a razão de duas pesagens (de parte aérea e de raiz).

5.9. Relação Parte Aérea-Raiz

Trata-se de um caráter pouco utilizado em trabalhos com radiação. Entretanto, neste ensaio mostrou-se bastante sensível na determinação dos efeitos dos raios γ.

Apresentou diferença significativa para todas as doses empregadas, mesmo entre as mais baixas e teve uma regressão linear com o aumento dessas (Tabela 3).

O efeito diferencial de épocas, favorável ao verão, como já foi explicado, é devido ao grande desenvolvi

mento da parte aérea nessa época do ano.

O caráter apresentou uma correlação relativamente alta (70,96%) com área foliar (Tabela 13). Assim, é possível, a partir de seus dados, inferir sobre a redução da área foliar. Como é obtido pela razão entre duas pesagens, é recomendável, por ser mais simples, que trabalhar com a área foliar, a menos que se utilize um integrador de área que, além de facilitar a determinação, diminui o erro.

Para as condições em que foi feito o ensaio mostrou-se um caráter de bastante valia para o entendimento da radiossensitividade nas populações de *Centrosema pubescens* e, por ser uma característica de interesse agronômico, deveria ser introduzido em outros trabalhos com radiações.

5.10. Outras observações

Seria de grande interesse quantificar as alterações morfológicas observadas no material, através de uma análise topográfica de indivíduos, bem como determinar a área das manchas das folhas permanentes e correlacioná-las com os setores-a que aparecem nas folhas primárias. So assim seria possível testar a "hipótese de Blixt" quanto a essas quimeras.

Também, é recomendável um estudo mais aprofundado das alterações nos caules e ramos, isto é, dos tipos fasciados que aparecem decorrentes da irradiação. Caso se trate realmente de uma mutação, é necessário estudar o mecanismo de ação gênica do caráter, pois, se acontecer de exibir pleiotropia, como no caso da ervilha, a utilização desses mutantes será de grande valia tanto para estudos básicos de genética como em programas de melhoramento, pela utilização de recombinantes, sendo possível com isso aumentar a produtividade e outras características como ocorreu com ervilha em trabalhos realizados por GOTTSCHALK e BANDEL (1978).

Além disso, esses tipos alterados, por exibirem intensa brotação lateral e, uma produção de massa verde visivelmente maior que os tipos normais, podem dar origem a linhagens ou variedades de grande interesse agronômico.

Essas considerações estimulam o uso da indução de variabilidade em programas de melhoramento de *Centrosema pubescens*, pois, de acordo com SIGURBJÖRNSSON (1977), o uso direto de mutações é muito valioso, sobretudo em espécies autógamas, pois o genótipo básico do material é apenas levemente alterado (quando comparado à hibridação) e o tempo requerido é muito menor.

GREGORY (1956) justifica dizendo que qualquer procedimento que aumente a variabilidade ou retarde o processo de latência da variância genética em indivíduos de auto-polinização será de grande valor ao melhorista.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

a) É perfeitamente viável o uso de radiações ionizantes em *Centrosema pubescens* para indução de variabilidade.

b) O material responde muito bem ao efeito de dosagens, sendo muito evidentes as diferenças, inclusive a característica manchas das folhas primárias que são bem delineadas e de fácil observação. Por isso, se mostra também, como excelente material didático.

c) As 17 populações testadas, embora de origens bastante diferentes, apresentaram comportamento similar às doses aplicadas, com

relação a todos caracteres testados, exceto para germinação e altura de plântulas.

d) Os caracteres avaliados pelo menos 10 dias após a germinação são mais sensíveis na determinação de radiossensitividade.

e) As observações são fortemente alteradas no inverno, sendo recomendado que todo ensaio se concentre em época de verão, ou seja feito em câmara simuladora de ambiente.

f) Os valores de LD_{30} obtidos para a época mais favorável, são em média 6 KR inferiores aos encontrados para LD_{50}. Assim, esse dado pode funcionar como uma constante na estimativa da melhor dose para se trabalhar em *Centrosema pubescens*.

g) Para o material estudado, a dose recomendada para causar maiores danos genéticos, sem grandes alterações fisiológicas em um programa de melhoramento está na faixa de 20 a 25 KR.

h) Caracteres de interesse agronômico mais diretos devem ser incluidos em determinações de radiossensitividade, por serem bastante sensíveis e já permitirem uma avaliação do material.

i) São necessários estudos mais aprofundados para se determinar o exato potencial do método de indução de mutações sobre *Centrosema pubescens* e outras espécies do gênero.

7. BIBLIOGRAFIA

AHNSTRÖM, G. 1977. Mutagenic Radiation - Radiobiology. In: *Manual on Mutation Breeding*. 2ª Ed. I.A.E.A. Viena. 21-28.

ALCÂNTARA, P.B.; V. de B.G. ALCÂNTARA; J.M.M. SIGRIST e F.S. PULZ. 1977. Caracterização de cinco introduções de *Centrosema pubescens*. *Boletim da Indústria Animal*. Nova Odessa. 34(1):103-111.

ALLARD, R.W. 1971. *Princípios do Melhoramento Genético das Plantas*. Editora Edgard Blücher Ltda. S.Paulo. 381p.

ANDO, A. 1968. Mutation induction in rice by radiation combined with chemical protectants and mutagens. In: *Rice Breeding with Induced Mutations*. I.A.E.A., Viena. p.10.

ANDO, A. 1982. Comunicação pessoal.

BANDEL, G. e W. GOTTSCHALK. 1978. Recombinants from crosses between fasciated and non - fasciated pea mutants. II - Late flowering recombinants. *Z. Planzenzüchtg*. Berlim. 81:60-76.

BARBOSA-FEVEREIRO, V.P. 1977. Centrosema (A.P. Candolle). Bentham do Brasil - Leguminosae-Faboideae. *Rodriguesia*. Rio de Janeiro. 42:159-219.

BARTLETT, M.S. 1947. The use of transformations. *Biometrics*. Virginia. 3(1):39-52.

BENTHAM, G. 1859. Leguminosae. In: Martius, K.F.P. *De Flora Brasiliensis*. Weiheim-Cramer, V.15, Paris I, p. 124-134. (Ed. Nova, 1976).

BHATT, B.Y.; K.C. BORA; A.R. GOPAL-AYENGAR; S.H. PATIL; N.S. RAO; H.K. SHAMA RAO; K.C. SUBBAIAH e R.G. TAKARE. 1961. Some aspects of irradiation of seeds with ionizing radiations. In: *Effects of Ionizing Radiations on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 591-608.

BLIXT, S. 1965. Studies of induced mutations. XII. Induction of leaf spots by EMS in different plant species. *Agri Hortique Genetica*. Landskrona. 23(3 e 4):187-206.

BLIXT, S.; L. EHRENBERG e O. GELIN. 1960. Quantitative studies of induced mutations in peas. III. Mutagenic effect of ethyleneimine. *Agri Hortique Genetica*. Landskrona. 18(1 e 2): 109:123.

BLIXT, S. e O. GELIN. 1964. The relationship between leaf spotting (A-sectors) and mutation rate in *Pisum*. In: *The Use of Induced Mutations in Plant Breeding*. (Supl. Rad. Bot. Vol. 5, Roma). 251-262.

BLIXT, S.; O. GELIN; R. MOSSBERG; G. AHNSTRÖM; L. EHRENBERG e R.A. LÖFGREN. 1964. Studies of induced mutations in peas. IX. Induction of leaf spots in peas. *Agri Hortique Genetica*. Landskrona. 22(1 e 2):186-194.

BORGES-DEMÉTRIO, C.G. 1978. Transformação de dados. Efeitos sobre a análise de variância. Piracicaba. ESALQ/USP, 113 p. (Dissertação de Mestrado).

BOWEN, F.D. 1959. Field studies on nodulations and growth of *Centrosema pubescens* Benth. *Queesland Journal of Agricultural Science*. Brisbane. 16(4):263-265.

BOWEN, G.D. e M.M. KENNEDY. 1961. Heritable variation in nodulation of *Centrosema pubescens* Benth. *Queensland Journal of Agricultural Science*. Brisbane. 18(2):161-170.

BOWEN, H.J.M. e J. THICK. 1961. Effects of seed extracts on radiosensitivity. In: *Effects of Ionizing Radiation on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 75-82.

BRASIL. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1980. *Produção da Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro. 8(t 5):3.

BRIGGS, R.W. e M.J. CONSTANTIN. 1977. Mutagenic Radiation. Radiations types and radiation sources. In: *Manual on Mutation Breeding*. 2ª Ed. I.A.E.A. Viena. 7-20.

BRIGGS, R.W. e C.F. KONZAK. 1977. Mutagenic Radiation. Objects and methods of treatment. In: *Manual on Mutation Breeding*. 2ª Ed. I.A.E.A. Viena. 33-40.

CASARETT, A.P. 1968. *Radiation Biology*. N. Jersey, Prentice Hall Inc. 368p.

CASTRO, P.R.C.; R.A. PITELLI; R.L. PASSILONGO. 1972. Variações na ocorrência de algumas pragas do amendoinzeiro relacionadas com o desenvolvimento da cultura. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. CEPEC. Itabuna. 1(1):5-16.

CLEMENTS, R.J. 1974. Centrosema species. *Report CSIRO* 1973/1974. Brisbane. 75-76.

CONGER, B.V.; D.D. KILLION e M.J. CONSTANTIN. 1973. Effects of fission neutron, beta and gamma radiation on seedling growth of dormant and germinating seeds of barley. *Radiation Botany*. Grã Bretanha. 13:173-180

CONGER, B.V.; C.F. KONZAK, R.A. NILAN. 1977. Mutagenic Radiation - Radiation sensitivity and modifying factors. In: *Manual on Mutation Breeding*. I.A.E.A. Viena. 40-43.

CONGER, B.V. e M.L. RANDOLPH. 1959. Magnetic centers (free radicals) produced in cereal embryos by ionizing radiation. *Radiation Research*. N. York. 11:54-66.

COOPER, W.E. e W.C. GREGORY. 1960. Radiation-induced leaf spot resistant mutants in the peanut (*Arachis hypogea* L.). *Agronomy Journal*. Madison. 52(1):1-4.

DAVIES, C.R. 1973. Effects of gamma irradiation on growth and yield of agricultural crops. III. Root crops, legumes and grasses. *Radiation Botany*. Grã Bretanha. 13:127-136.

DOBEREINER, J. e A.B. CAMPELO. 1977. Importantance of legumes and their contribution to tropical agriculture. In: HARDY, R.W.F. e A.H. GIBSON (eds.). *A. treatise on denitrogen fixation*. New York. John Wiley Comp. 141-220.

DOWN, E.E. e A.L. ANDERSEN. 1956. Agronomic use of an X-ray induced mutant. *Science*. Washington. 124:223-224.

DUCKE, A. 1949. Notas sobre a flora neotrópica. II. As Leguminosas da Amazônia brasileira. 2ª ed. *Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Norte*. Belém. 18:212-214.

EHRENBERG, A.; L. EHRENBERG e G. STRÖM. 1969. Radiation induced free radicals in embryo and endosperm of barley kernels. *Radiation Botany*. Grã Bretanha. 9:151-158.

ERICKSON, G. e D. LINDGREN. 1977. Mutagen effects in the first generation after seed treatment - chemicals. In: *Manual on Mutation Breeding*. 2ª Ed. I.A.E.A. Viena. 98-103.

FOY, C.D.; A.L. FLEMING; G.R. BURNS e W.H. ARMIGER. 1967. Characterization of differential aluminum among varieties of wheat and barley. *Proc. Soil Science Society of America*. Madison. 31:513-521.

GAUL, H. 1970. Mutagen effects observables in the first generation - Plant injury and lethality. In: *Manual on Mutations Breeding*. I.A.E.A. Viena. 85-90.

GELIN, O.; L. EHRENBERG e S. BLIXT. 1958. Genetically conditioned influences on radiation sensitivity in peas. *Agri Hortique Genetica*. Landskrona. 16(1 e 2):78-102.

GENTER, C.F. e H.M. BROWN. 1941. X-ray study on the field bean. *Journal of Heredity*. Washington. 32:39-44.

GOTTSCHALK, W. e G. BANDEL. 1978. Recombinants from crosses between fasciated and non-fasciated pea mutants. I. Early flowering recombinations. Z. *Planzenzüchtg*. Berlim. 80: 117-128.

GREGORY, W.C. 1956. The comparative effects of radiation and hybridization in plant breeding. *Proceedings of International Conference of Peaceful Uses of Atomic Energy*. (Proc. Conf. Geneva). New York. 12:48-51.

GROF, B. 1970. Interspecific hybridization in *Centrosema* hybrids between C. *brasilianum*, C. *virginianum* e C. *pubescens*. *Queensland Journal of Agriculture and Animal Science*. Brisbane. 27:385-390.

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

GUSMAN, A.B.; A. ANDO e E.S.B. FERRAZ. 1975. *Radiossensitividade em Sementes*. Boletim Didático 017. CENA-USP. Piracicaba. 40p.

HABER, A.H. e M.L. RANDOLPH. 1967. Gamma-ray induced ESR signals in lettuce: evidence for seed hydration resistant and sensitive free radicals. *Radiation Botany*. Grã Bretanha. 7:17-28.

HARVEY, W.R. 1960. *Least square analysis of data with unequal subclasses numbers*. Washington. U.S. Government Printing Office. 157p. (USDA-ARS 20-8).

HUTTON, E.M. 1960. Flowering and pollination in *Indigofera spicata*, *Phaseolus lathyroides*, *Desmodium uncinatum* and some other tropical pasture legumes. *Emp. J. Exp. Agric.* Oxford. 28(111):235-243.

HUTTON, E.M. 1976. Selecting and breeding tropical pasture plants. *Span*. London. 19(1):21-24.

HYMOWITZ, T. 1971. Collection and evaluation of tropical and subtropical Brazilian forage legumes. *Tropical Agriculture*. London. 48(4):309-315.

KLINGMÜLLER, W. 1961. Radiation damage in *Vicia faba* seeds. In: *Effects of Ionizing Radiation on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 67-74.

KONZAK, C.F.; R.A. NILAN; R.R. LEGAULT e R.E. HEINER. 1961. Modification of induced genetic damage in seeds. In: *Effects of Ionizing Radiation on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 155-170.

MAC ARTHUR, J.W. X-ray mutation in the tomato. *Journal of Heredity*. Washington. 25:75-78.

MARTINS, P.S. e N.A. VELLO. 1980. Evaluation of the potencial for breeding of Brazilian native forage legumes. 7p. (Trabalho apresentado ao II Japanese-Brazilian Symposium, Piracicaba, S.Paulo).

MATSUO, T. e H. YAMAGUCHI. 1962. Radiation-induced mutations in Japan. *Euphytica*. Washington. Holanda. 11:245-255.

MIKAELSEN, K. e S.K. NAVARATINA. 1968. Experiments with mutagen treatments of rice. In: *Rice Breeding with Induced Mutations*. I.A.E.A. Viena. 130-132.

MÖES, A. 1961. Water content, wave-lenght and sensitivity to x-rays in barley. In: *Effects of Ionizing Radiation on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 631-650.

MOGROVEJO JARAMILLO, E.A. 1981. Comportamento e Variabilidade de Caracteres Agronômicos em Populações de *Centrosema pubescens* Benth (Leguminosae). Piracicaba.ESALQ/USP 116p. (Diss. Mestrado).

MOH, C.C. e J.J. ALAN. 1974. Radiosensitivity of some tropical plant species. *Turrialba*. Turrialba. 24(2):156-159.

MONTEIRO, W.R. 1980. Estudo da variabilidade e correlação entre caracteres agronômicos em populações de *Centrosema pubescens* Benth. Piracicaba. ESALQ/USP. 71p. (Diss. Mestrado).

MOULI, C. e PATIL, S.H. 1976. Gamma-ray-induced mutant with suppressed branches in the peanut. *The Journal of Heredity*. Washington. 67(5):322-324.

MUTEB, K.A. e J.K. GREIG. 1973. Gamma irradiation induced variability in *Phaseolus vulgaris* L. cv. Blue Jake. *Radiation Botany*. Grã Bretanha. 13:121-126.

NILAN, R.A.; C.F. KONZAK, R.R. LEGAVLT e J.R. HARLE. 1961. The oxigen effect in barley seeds. In: *Effects of Ionizing Radiation on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 139-154.

OSBORNE, T. S. 1966. Seed Radiosensitivity. In: *Mutations in Plant Breeding*. I.A.E.A. Viena. 187-189.

PIMENTEL GOMES, F. 1977. *Curso de Estatística Experimental* (7ª ed.). Livraria Nobel S.A. Editora. Piracicaba. 430p.

RAGHUVANSHI, S.S. e A.K. SINGH. 1947. Studies on the effect of gamma rays on *Trigonella foenum-graecum* L. *Cytologia*. Tóquio. 39:473-482.

RAJPUT, M. 1974. Increased variability in the M_2 of gamma-irradiated mung beans (*Phaseolus aureus* Roxb.) *Radiation Botany*. Grã Bretanha. 14:85-89.

REDDY, P.S.; M.V. REDDY; B. THAMMIRAJU; S. MAHAIBOBALI. 1977. Creation of genetic variability by recourse to irradiation in groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Oleagineaux*. 32(2):59-63.

RICHARDS, J.A. 1970. *Production of tropical pastures in the caribean*. In: Proceedings of the XI International Grassland Congress. Queensland. p. 49-56.

SARIC, M. 1961. The effects of irradiation in relation to the biological traits of the seed irradiated. In: *Effects of Ionizing Radiation on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 103-116.

SCHOFIELD, J.L. 1941. Introduced Legumes in North Queensland. *Queensland Agricultural Journal*. Brisbane. 56:378-388.

SEIFFERT, N.F. 1982. Leguminosas para pastagens no Brasil Central. No prelo.

SERPA, A. 1972. Seleção precoce para nitrogênio total em *Centrosema pubescens*. *Pesquisa agropecuária brasileira. Serie Zootecnia*. Rio de Janeiro. 7:29-31.

SERPA, A. 1976. *Alguns fatores que afetam a velocidade inicial de crescimento em Centrosema sp.* In: Anais da XII Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Salvador. p.316-318.

SHAVER, D.L. e A.H. SPARROW. 1962. The relationship between nuclear or chromosome volume and rate of radiation-induced somatic mutation in higher plants. *Genetics*. Austin. 47:982.

SHENK, J.S. 1977. The role of plant breeding in improving the nutritive value of forages. *The Journal of Dairy Cattle*. Champaign. 60(2):300-305.

SIGURBJÖRNSSON, B. 1977. Mutations in plant-breeding programmes. In: *Manual on Mutation Breeding*. 2ª Ed. Viena. 1-6.

SMITH, L. 1942. Hereditary susceptibility to X-ray injury in *Triticum monococcum*. *American Journal of Botany*. New York. 29:189-191.

SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G. 1967. *Statistical Methods*. 6ª ed. Iowa. The Iowa State University Press. 593 p.

SPARROW, A.H. 1961. Types of ionizing radiation and their cytogenetic effects. In: *Mutation and Plant Breeding*. Viena. I.A.E.A. 55-59.

SPARROW, A.H. 1966. Plant growth stimulation by ionizing radiation. In: *Effects of low doses of radiation on crop plants*. Technical reports series nº 64. I.A.E.A. Viena. 12-15.

SPARROW, A.H.; R.L. CUANY; J.P. MIKSCHE e L.A. SCHAIRER. 1961. Some factors affecting the responses of plants to acute and chronic radiation exposures. In: *Effects of Ionizing Radiations on Seeds*. I.A.E.A. Viena. 289-320.

STADLER, L.J. 1930. Some Genetic Effects of x-rays in Plants. *The Journal of Heredity*. Washington. 21:2-19.

STEAGALL, M.L. 1977. *Sensitividade à radiação gama de diferentes populações de milho* (*Zea mays* L.). Piracicaba. ESALQ-USP. 149 p. (Dissertação de Mestrado).

STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE. 1960. *Principles and procedures of statistics*. Mac Graw-Hill Book Company. New York. 481 p.

SÜSS, A. 1966. Effect of low doses of seed irradiation on plant growth. In: *Effects of low doses of radiation on crop plants*. Technical reports series nº 64. I.A.E.A. Viena 1-11.

TAVCAR, A. 1966. Stimulating effects of low doses of radiation. In: *Effects of low doses of radiation on crop plants.* Technical reports series nº 64. I.A.E.A. Viena 16-25.

THODAY, J.M. e J. READ. 1947. Effect of oxigen on the frequency of chromossome observations produced by X-rays. *Nature*. Londres. 160:608-610.

VENDRAMIM, J.D. e A. ANDO. 1976. *Influência do teor de umidade na radiosensitividade em sementes de feijão (Phaseolus vulgaris* L.). Boletim Científico 037. CENA-USP. Piracicaba. 19p.

YESODA RAJ, A.; A. SUDHARSAN RAJ e G. MADHUSUDANA RAO. 1972. Mutagenic studies of gamma rays on *Oryza sativa* L., *Cytologia*. Tóquio. 37:469-477.

ZACHARIAS, M. e L. EHRENBERG. 1962. Induction of leaf spots in leguminous plants by nucleotoxic agents. I. *Hereditas*. Lund. 48:284-306.

8. TABELAS

Tabela 1 - Identificação das diferentes populações de *C. pubescens* utilizadas nesse ensaio, após multiplicação na Fazenda Areião, Piracicaba. Data de colheita: setembro/outubro de 1979.

Nº do tratamento	Registro de referência	Procedência
1	EEI - 129/73	Cv. Pichilingue (Peru)
2	N.O. 777	IPEACS, Rio de Janeiro
3	N.O. 246	IRI, 1346, Matão, São Paulo
4	N.O. 248	IPEACS-7/69, Rio de Janeiro
5	N.O. 237	IRI 0022, Matão, São Paulo
6	EEI - 35/76	Q 33061, CSIRO, Austrália
7	N.O. 724	Coleta IZ, Nova Odessa, São Paulo
8	N.O. 239	IRI 1235, Matão, São Paulo
9	N.O. 247	IRI 1332, Matão, São Paulo
10	N.O. 235	Coleta IZ, Nova Odessa, São Paulo
11	N.O. 243	IPEACS - 5 1/64, Rio de Janeiro
12	N.O. 238	IRI 0234, Matão, São Paulo
13	EEI - 4/75	Var. Ex. Wright Stephenson CSIRO
14	EEI - 26/76	T-30, CSIRO, Austrália
15	N.O. 345	Coleta IZ, Nova Odessa, São Paulo
16		Cv. Deodoro, Est.Exp. Deodoro, RJ.
17	N.O. 242	IPEACS-5-3/64, Rio de Janeiro
18	EEI - 6/76	Diethelm Co (Singapura)
19	N.O. 240	IRI 0019, Matão, São Paulo
21	N.O. 245	IRI 0234, Matão, São Paulo

Tabela 2 - Porcentagem de germinação de *C. pubescens*, obtida em teste executado em germinador a 25°C, no escuro. Média de 3 repetições.

População	Sem escarificação	Com escarificação
1	35	98
2	25	87
3	27	88
4	32	100
5	27	92
6	25	97
7	32	92
8	58	100
9	23	93
10	15	97
11	45	97
12	45	97
13	18	100
14	15	92
15	32	98
16	17	97
17	55	85
18	58	100
19	70	100
21	30	98
$\bar{x}$	34	95

Tabela 3 - Análise de variância para os caracteres analisados em *C. pubescens* com 4 doses de radiação (0, 12, 24 e 36 KR), e respectivos coeficientes de variação. Ensaio de radiossensitividade.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios					
		Germinação	Nº de manchas	Sobrevivência	Altura de plantas	Comprimento de raízes	Relação PA/Raízes
Doses (D)	3	450,8559**	1120,2089**	17337,5859**	2680,6718**	1995,4086**	199,6490**
Linear	1	1335,8576**	2626,1162**	45573,1562**	7636,6132**	5738,6406**	579,1262**
Quadrática	1	1,8343	654,6250**	6437,8476**	275,7861**	100,9399	19,7276
Cúbica	1	14,8798	79,8848**	1,6825	129,6315**	26,6518	0,0908
Épocas (E)		115,1346	10,5694**	9818,6015**	5154,2695**	10,9655	293,5124**
Populações (P)	16	1146,2338**	1,0664	155,6897	23,8892	41,5072	2,1612
D x E	3	40,6450	3,6633	244,2399	1232,1047**	86,5551**	41,6910
D x P	48	94,1372	0,5102	201,0595	12,9817	14,4822	1,1476
Erro	244	116,2462	1,1951	208,9679	23,4820	22,3789	3,4181
C.V. %		14,12	17,77	26,68	59,20	29,27	48,53

Tabela 4 - Análise de variância para os caracteres analisados em *C. pubescens* com 3 doses (0, 12 e 24 KR) e respectivos coeficientes de variação. Ensaio de radiossensitividade.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios		
		Altura de plântulas	Área foliar	Razão de área foliar
Doses (D)	2	48,3470**	15077,6406**	3403,5019**
Linear	1	96,0785**	29133,6835**	6509,0117**
Quadrática	1	0,6155	1021,5551	297,9921**
Épocas (E)	1	0,6493	47281,8632**	10570,0312**
Populações (P)	16	0,6226**	75,4292	18,6165
D x E	2	0,7916	3439,3808**	25,9040
D x P	32	0,2286	146,8957	12,0146
Erro	194	0,2983	284,1877	27,7475
C.V. %		22,61	62,40	25,30

Tabela 5 - Comparação de médias do efeito de população de *C. pubescens*, pelo teste de Tuckey, a 1% de probabilidade, para os caracteres germinação (com 4 doses) e altura de plântulas (com 3 doses). Ensaio de radiossensitividade.

Germinação			Altura de Plântulas		
Pop.	Nº obs.	Média ajustada	Pop.	Nº obs.	Média ajustada
1	18	99,6721 a	11	15	2,7307 a
6	19	99,6509 a	18	15	2,7267 a
13	19	99,6430 a	8	14	2,7263 a
4	18	98,4753 ab	6	14	2,5633 a
9	18	98,1727 ab	7	14	2,5153 a
10	18	96,3226 abc	17	14	2,4351 a
16	19	96,0373 abc	2	15	2,4254 a
5	18	95,7679 abc	4	15	2,3854 a
8	19	95,2573 abc	12	15	2,3821 a
14	20	95,1611 abc	9	15	2,3747 a
7	18	94,8620 abc	10	14	2,2914 a
18	19	92,3830 abc	16	13	2,2660 a
3	19	89,1395 bc	1	15	2,2381 a
11	18	86,0941 cd	5	15	2,1714 a
12	20	84,8470 cd	14	15	2,1607 a
2	17	78,4727 d	3	15	2,1394 a
17	19	76,3195 d	16	15	2,1127 a

Tabela 6 - Comparações de médias do efeito de doses, pelo teste de Tuckey, a 1% de probabilidade, para os caracteres avaliados em *C. pubescens*, com 4 doses de radiação (1 = 0 KR; 2 = 12 KR; 3 = 24 KR; 4 = 36 KR). Ensaio de radiossensitividade.

Doses	Nº obs.	Médias					
		Germinação	Nº de manchas	Sobrevivência	Altura de Plantas	Comprimento de raízes	Relação PA/Raiz
1	85	96,5586 a	0 a	84,9150 a	14,4631 a	21,1574 a	5,1712 a
2	83	94,8012 ab	51 b	81,6762 a	9,0828 b	18,7141 b	4,4000 a
3	85	93,6810 ab	70 c	62,9173 b	2,8300 c	13,8248 c	3,0361 b
4	63	91,6783 b	80 d	26,9741 c	1,4258 d	9,0840 d	1,2314 c

Tabela 7 - Comparação de médias do efeito das doses, pelo teste de Tuckey, a 1% de probabilidade, para os caracteres avaliados em *C. pubescens*, com 3 doses de radiação (1 = 0 KR; 2 = 12 KR; 3 = 24 KR). Ensaio de radiossensitividade.

Doses	Nº obs.	Médias		
		Altura de plântulas	Área foliar	Razão de área foliar
1	85	3,1473 a	36,2037 a	24,9716 a
2	83	2,4631 b	26,7613 b	20,7996 b
3	80	1,5625 c	8,5061 c	11,8678 c

Tabela 8 - Comparação de médias do efeito da interação dose X época, pelo teste de Tuckey, a 1% de probabilidade, para o caráter altura de plantas, avaliado com 4 doses[a/] em *C. pubescens*. Ensaio de Radiossensitividade.

E_2 \ E_1	D \ D	Verão 1	Verão 2	Verão 3	Verão 4
Inverno	1	23,5853 / 5,3409	**	**	**
	2	n.s.	14,9944 / 3,1714	**	**
	3	**	n.s.	4,1165 / 1,5435	n.s.
	4	**	n.s.	n.s.	1,8554 / 0,9963

[a/] D = dose; 1 = 0 KR; 2 = 12 KR; 3 = 24 KR; 4 = 36 KR.

Tabela 9 - Comparação de médias do efeito da interação dose X época, pelo teste de Tuckey, a 1% de probabilidade, para o caráter comprimento de raízes, avaliado com 4 doses[a/], em *C. pubescens*. Ensaio de radiossensitividade.

E_2	E_1 / D	Verão 1	2	3	4
Inverno	1	22,1726 / 20,1422	**	**	**
	2	n.s.	17,3802 / 20,0479	**	**
	3	**	**	14,4067 / 13,2429	**
	4	**	**	**	9,5933 / 8,5746

[a/] D = doses: 1 = 0 KR; 2 = 12 KR; 3 = 24 KR; 4 = 36 KR.

Tabela 10 - Comparação de médias do efeito da interação dose X época, pelo teste de Tuckey, a 1% de probabilidade, para o caráter área foliar, avaliado com 3 doses[a/], em *C. pubescens*. Ensaio de radiossensitividade.

E_2	E_1 / D \ D	Verão 1	Verão 2	Verão 3
Inverno	1	55,6154 / 16,7921	**	**
	2	n.s.	43,4328 / 10,0901	**
	3	**	n.s.	15,1044 / 1,9079

[a/] D = doses: 1 = 0 KR; 2 = 12 KR; 3 = 24 KR.

Tabela 11 - Equações de regressão, obtidas segundo o modelo $\hat{y} = b_o + b\ (x - \bar{x})$, para os caracteres analisados em *C. pubescens*, com 4 doses de radiação. Ensaio de radiossensitividade.

Caráter	Equação de Regressão
Germinação	$\hat{y} = 76{,}20096 - 1{,}95826\ (x-2{,}5)$
Nº de manchas	$\hat{y} = 8{,}17247 + 2{,}57358\ (x-2{,}5) - 1{,}49218\ (x-2{,}5)^2$
Sobrevivência	$\hat{y} = 59{,}74348 - 11{,}97748\ (x-2{,}5) - 4{,}67945\ (x-2{,}5)^2$
Altura de plantas	$\hat{y} = 5{,}73982 - 4{,}57040\ (x-2{,}5) + 0{,}96852\ (x-2{,}5)^2$
Comp. de raiz	$\hat{y} = 15{,}69509 - 4{,}05877\ (x-2{,}5)$
Relação PA/raiz	$\hat{y} = 3{,}45973 - 1{,}28937\ (x-2{,}5)$

Tabela 12 - Equações de regressão, obtidas segundo o modelo $\hat{y} = b_o + b\ (x - \bar{x})$, para os caracteres analisados em *C. pubescens*, com 3 doses de radiação. Ensaio de radiossensitividade.

Caráter	Equação de Regressão
Altura de plântulas	$\hat{y} = 2,39104 - 0,79024\ (x - 2,0)$
Área foliar	$\hat{y} = 23,82378 - 13,76072\ (x - 2,0)$
Razão de área foliar	$\hat{y} = 20,79965 - 6,55186\ (x - 2,0)$

Tabela 13 - Correlações entre os caracteres avaliados em *C. pubescens*, com 3 doses de radiação. Ensaio de radiossensitividade.

	Germinação	Altura de plântulas	Nº de manchas	Sobrevivência	Altura de plantas	Compr. de raízes	Área foliar	Razão área foliar	Relação PA/Raiz
Germinação	1,0000								
Altura de plântulas	0,0623	1,0000							
Nº de manchas	-0,0611	-0,0769	1,0000						
Sobrevivência	0,2542	0,0485	-0,2120	1,0000					
Altura de plantas	0,1301	0,1289	-0,1680	0,1776	1,0000				
Comprimento de raízes	0,0060	0,1359	-0,2136	0,1102	0,3672	1,0000			
Área foliar	0,1462	0,1491	-0,2901	0,2402	0,7749	0,5775	1,0000		
Razão de área foliar	0,1016	0,1736	-0,3711	0,2336	0,1044	0,1260	0,3696	1,0000	
Relação PA/Raiz	0,2424	0,0279	-0,2871	0,3999	0,5487	0,2139	0,7096	0,5247	1,0000

Tabela 14 - Dados obtidos da determinação gráfica da GR_{50} ("Growth reduction"); LD_{50}("lethal dose") e LD_{30} para as populações de *C. pubescens*. Unidade: KR. Ensaio de radiossensitividade.

Pop.	GR_{50}		LD_{50}		LD_{30}	
	Inv.	Verão	Inv.	Verão	Inv.	Verão
1	17	11	35	27	28	22
2	11	10	40	34	35	31
3	15	15	36	29	30	25
4	16	13	35	34	30	31
5	19	16	33	25	29	20
6	14	17	31	32	26	26
7	17	14	30	29	26	14
8	15	14	36	20	30	14
9	16	20	30	26	26	20
10	21	15	35	32	32	27
11	16	15	32	33	28	31
12	17	16	37	32	29	29
13	13	16	36	25	29	20
14	15	14	29	27	23	21
15	15	12	26	27	21	21
16	18	11	26	29	19	8
17	12	19	27	25	21	11
18	12	17	38	28	21	17
19	20	16	26	23	21	19
21	11	16	35	33	23	30
$\bar{x}$	15,5	15	33	28,5	26	22

9. FIGURAS

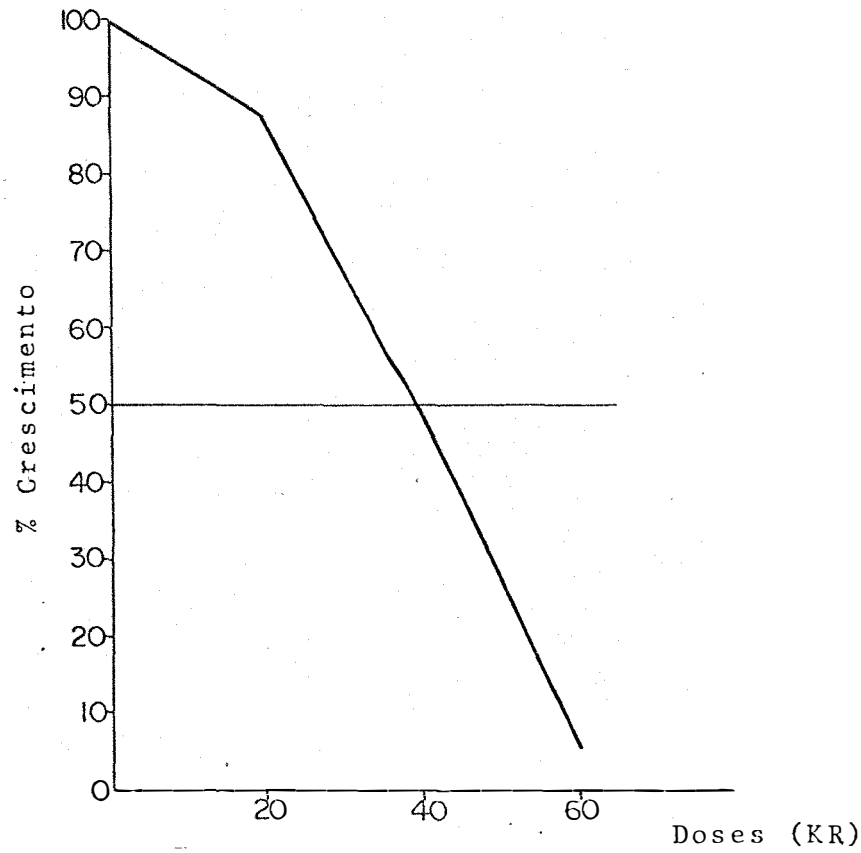

Figura 1 - Determinação gráfica da GR_{50} para 20 populações de *C. pubescens*. Ensaio preliminar de radiossensitividade.

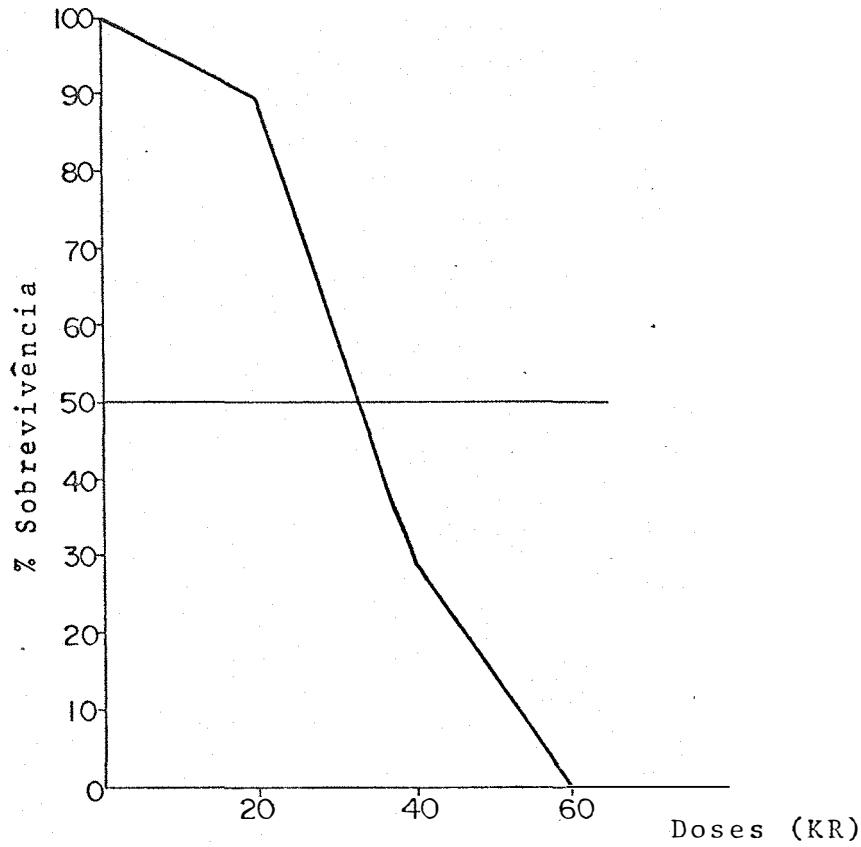

Figura 2 - Determinação gráfica da LD_{50} para 20 populações de *C. pubescens*. Ensaio preliminar de radiossensitividade.

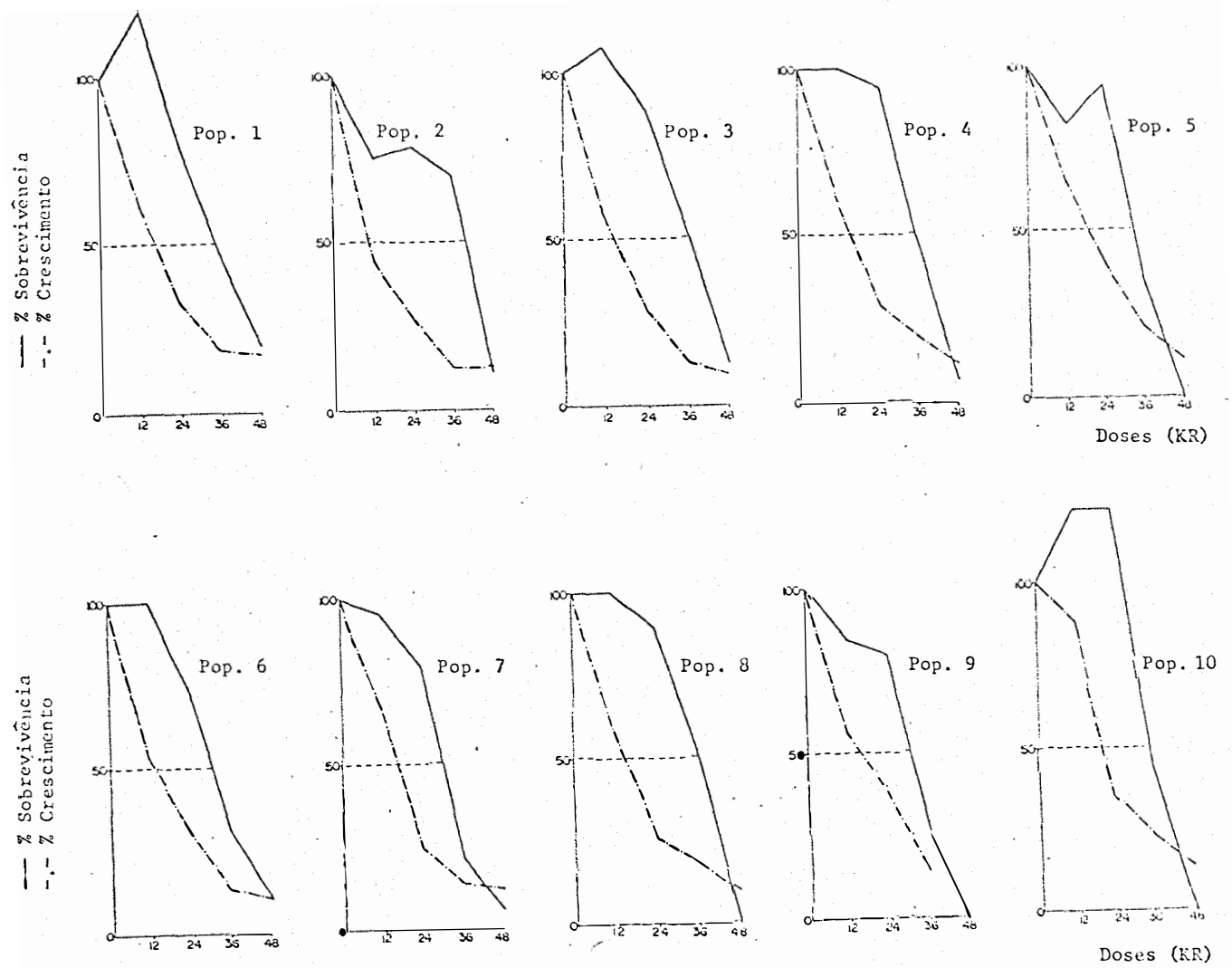

Figura 3 - Determinação gráfica da GR_{50} (.-.-) e da LD_{50} (——) nas 20 populações de *C. pubescens*, para a época de inverno.

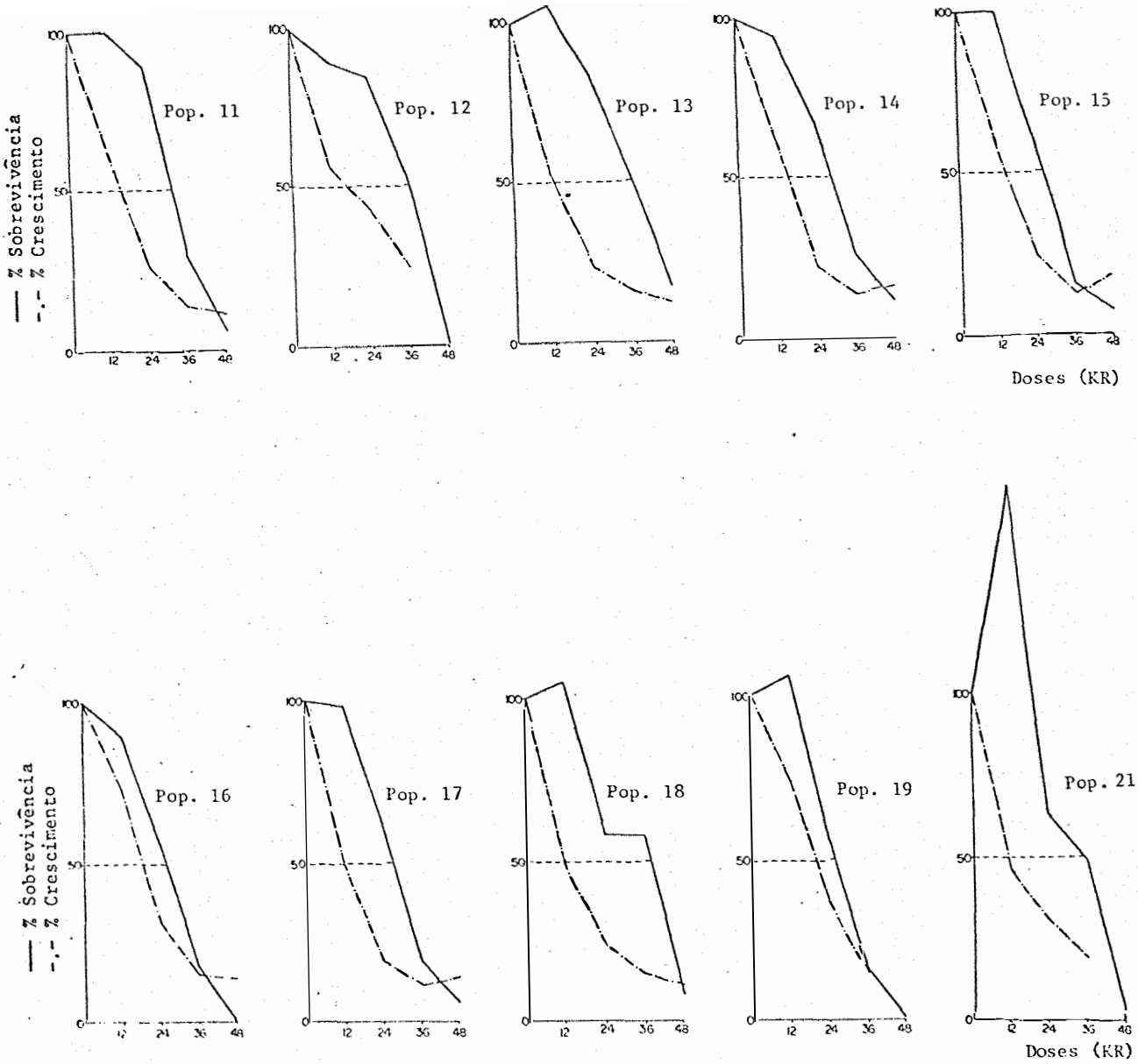

Figura 3 - Continuação.

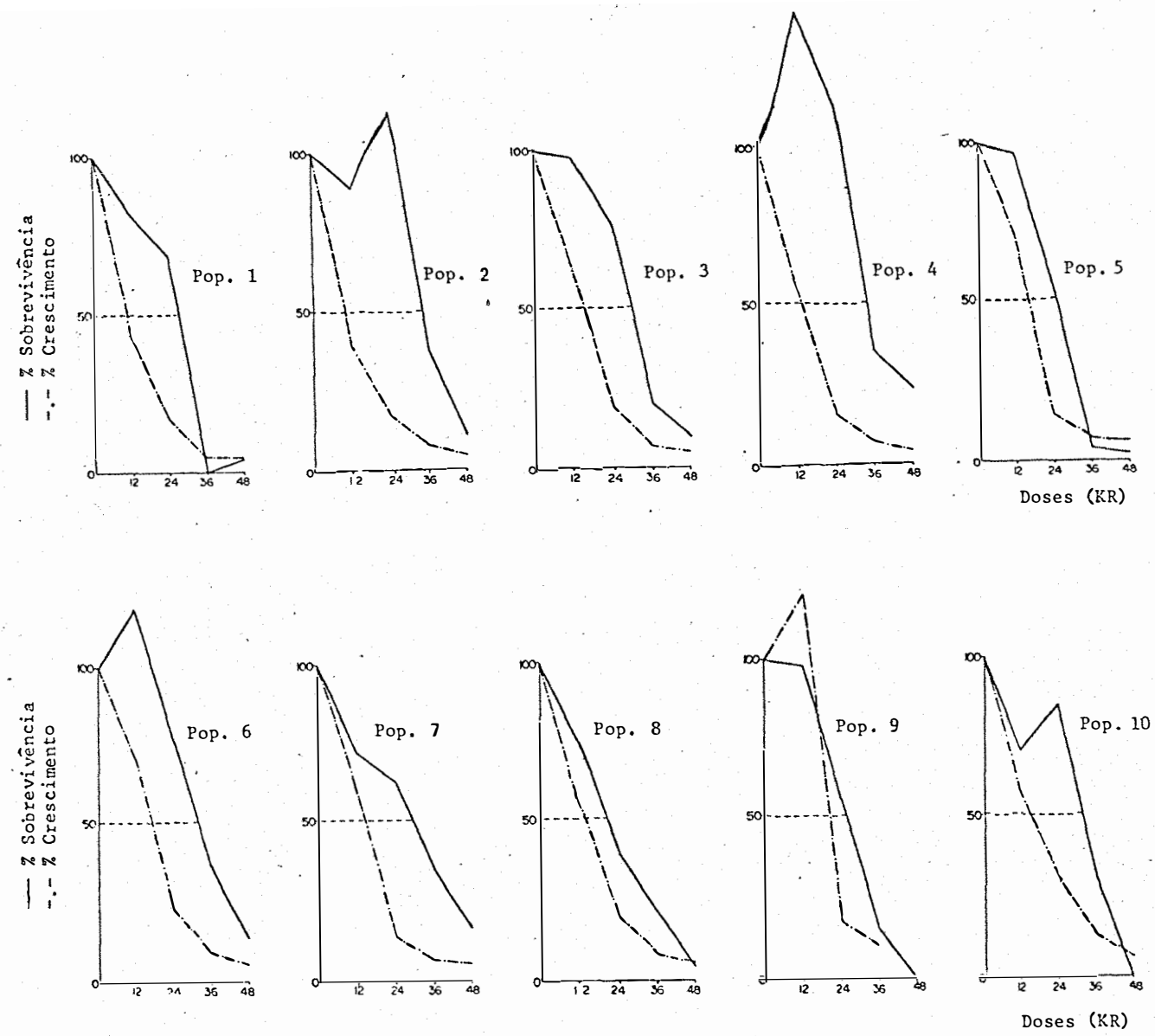

Figura 4 - Determinação gráfica da GR_{50} (-.-) e da LD_{50} (——) nas 20 populações de *C. pubescens*, para a época de verão. Ensaio de radiossensitividade.

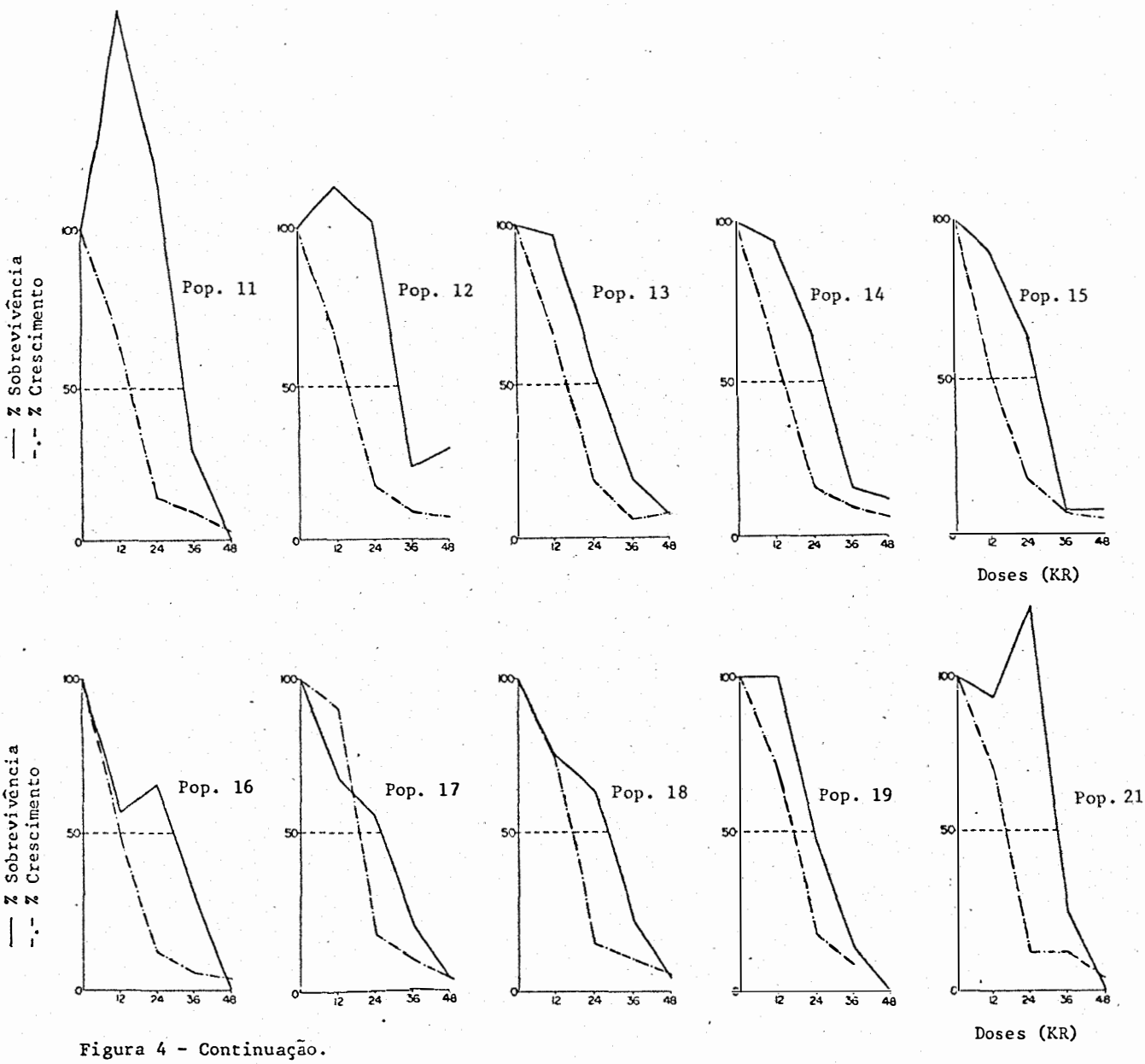

Figura 4 - Continuação.

10. APÊNDICE

Apêndice 1 - Análise química do solo da Fazenda Areião, local onde foram multiplicadas as sementes utilizadas no ensaio[1].

N (%)	CO (%)	pH(H_2O)	Teor trocável em miliequivalentes/100 ml de terra				
			PO_4^{---}	K^+	Ca^{++}	Mg^{++}	Al^{+++}
0,17	1,20	5,7	0,21	0,46	5,60	1,21	0,06

[1]Análise realizada pelo Departamento de Solos e Geologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",USP.

Apêndice 2 - Intensidade de radiação utilizada em cada repetição do ensaio. Unidade: KR/hora.

Repetição	Taxa de dose
1	475,0
2	451,0
3	458,0
4	475,0
5	478,5
$\bar{x}$	465,0

Apêndice 3 - Teor de umidade em porcentagem das sementes de *C. pubescens*, no momento da irradiação, determinado com base na perda de peso por secagem.

Pop.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	$\bar{x}$
1	14,3	11,3	9,2	10,8	9,4	11,0
2	14,7	10,9	9,7	10,1	8,6	10,8
3	14,2	11,3	11,2	10,3	10,0	11,4
4	14,3	11,7	10,8	10,7	9,3	11,4
5	14,8	11,5	10,2	9,0	10,0	11,1
6	16,0	11,0	10,5	9,5	9,3	11,3
7	14,1	11,6	10,6	10,0	9,8	11,2
8	20,9	11,0	10,0	11,0	9,4	12,5
9	14,3	11,9	10,6	11,0	9,7	11,5
10	14,6	5,9	10,1	10,8	9,2	10,1
11	13,1	11,4	9,9	10,6	9,2	10,8
12	13,8	11,0	11,0	10,6	8,9	11,1
13	18,1	11,3	9,8	11,1	9,6	12,0
14	13,7	11,3	10,0	9,3	9,9	10,8
15	14,2	12,4	11,0	10,6	10,0	11,6
16	13,7	11,5	10,9	10,3	9,2	11,1
17	22,6	11,7	11,1	9,9	9,9	13,0
18	14,1	11,1	11,0	11,4	9,6	11,4
19	14,2	12,1	11,4	10,8	9,4	11,6
21	14,2	11,7	11,0	11,1	9,8	11,6