

# EFEITO DOS MUTAGÊNICOS AZIDA SÓDICA E METANO SULFONATO DE ETILA, NA GERAÇÃO M<sub>1</sub>, EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.).

SILVA, Simone A.<sup>1</sup>; CARVALHO, Fernando I. F. de<sup>1</sup>; COSTA, Fernando L. C. da<sup>2</sup>, COIMBRA, Jefferson L. M.<sup>1</sup> & LORENCETTI, Claudir<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> UFPEL/FAEM Depto. de Fitotecnia, Campus Universitário, Cx. Postal 354 CEP - 96001-970, Pelotas, RS

<sup>2</sup> UFPEL/Inst. de Biologia/ Depto. de Zoologia e Genética, Campus Universitário,

Cx. Postal 354 CEP - 96001-970, Pelotas, RS

(Recebido para publicação em 29/04/98)

## RESUMO

Com o emprego de Azida Sódica (AS - NaN<sub>3</sub>) e Metano Sulfonato de Etila (EMS - CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), como agentes mutagênicos, em doses distintas, foi possível avaliar seus efeitos sobre os aspectos fisiológicos em três genótipos de trigo hexaplóide na geração M<sub>1</sub>. Foram utilizadas as cultivares BR 32, EMB 120 e CEP 24, submetidas às doses 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 20<sup>-3</sup> M de AS e nas doses 0,5, 1,0 e 1,5% de EMS, ambas com o pH ajustado para 3,0. O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Genética Vegetal do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia (DZG-IB/UFPEL) e do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (DF/FAEM/UFPEL). A instalação do experimento foi em delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições, utilizando 3 genótipos submetidos ao efeito de 2 mutagênicos sobre 3 doses distintas, sendo o controle representado por ensaio em branco, com 3 repetições. Cada parcela foi representada por um rolo de papel germinador com 100 sementes de cada genótipo. As análises de germinação (contagem das plântulas pré-germinadas), foram feitas três dias após a semeadura e a determinação das medidas de comprimento de plântulas e de raízes, após o período de 10 dias da emergência. A comparação das médias foi feita utilizando o teste de DMS a 5% (STEEL & TORRIE, 1980). As análises foram avaliadas através do programa estatístico SAS. Os resultados demonstraram que o agente mutagênico AS nas doses analisadas, pode determinar efeitos letais na viabilidade de sementes M<sub>1</sub>. No entanto, as doses do agente mutagênico EMS foram pouco severas no caráter percentagem de germinação, podendo encontrar efeitos marcantes sobre os caracteres comprimento de plântulas e raízes.

Palavras-chave: danos fisiológicos, agentes mutagênicos, variabilidade genética.

## ABSTRACT

EFFECT OF MUTAGENICS SODIUM AZIDE AND ETHYL METHANE SULFONATE IN THE M<sub>1</sub>

GENERATION OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.). The employment of sodium azide (AS- NaN<sub>3</sub>) and Ethyl Methane Sulfonate (EMS - CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), as mutagenic agents, in different dosages, allowed to evaluate their physiological effects in three hexaploid wheat genotypes in the M<sub>1</sub> generation. The cultivars BR 32, EMB 120 and CEP 24, were treated with 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> and 20<sup>-3</sup> M of AS and with 0,5; 1,0 and 1,5% of EMS, all adjusted to pH 3,0. The experimental work was carried on the laboratório de Genética Vegetal, Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (DZG - IB/ UFPEL) and Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (DFT/ FAEM/ UFPEL). The experiment was designed in randomized blocks with 3 repetitions, using 3 genotypes and 3 mutagenic doses. The control was set by a blank essay, with 3 repetitions. Each plot was represented by a germination paper roll with 100 seeds per genotype. Germination analysis (pre-germinated seedlings count), were performed three days after sowing and the measurement of seedling and root lengths was performed 10 days after the emergence. The comparison of means was performed using the DMS test at 5% (STEEL & TORRIE, 1980). The analysis were performed with the statistical analysis system (SAS). The results suggest that the mutagenic agent AS, in the dosis analysed, can cause lethal damages in the M<sub>1</sub> seed viability. However, the EMS doses used were less severe on the germination percentage, but more noticeable on the characters seedling and root length.

Key words: physiological damages, mutagenic agents, genetic variability.

## INTRODUÇÃO

Os agentes mutagênicos são importantes no melhoramento de plantas, principalmente porque podem causar mudanças na estrutura gênica, resultando em variabilidade genética. A inexistência de ampla base genética de qualquer espécie, dificulta o trabalho dos melhoristas em selecionar genótipos superiores com base em caracteres desejados. Por outro lado, os mutagênicos podem provocar outros efeitos colaterais

na planta como clorose, redução de germinação, além de tornar as plantas débeis, levando a esterilidade total ou parcial ou mesmo a letalidade, diminuindo a chance de conseguir genótipos modificados conforme necessidade do melhorista.

Os agentes mutagênicos químicos, Azida Sódica (AS) e Metano Sulfonato de Etila (EMS), aplicados em diferentes espécies cultivadas, principalmente diplóides, poderão responder também com sucesso quando empregados em trigo hexaplóide.

Segundo KLEINHOFES *et al.* (1972), a azida não é mutagênico eficiente em sementes de poliplóides como o trigo e aveia. Contudo, este agente químico tem mostrado ser poderoso mutagênico quando empregados em cevada (KLEINHOFES *et al.*, 1974; KONKAK *et al.*, 1975; NILAN *et al.*, 1976), feijão (VIG *apud* OWAIS *et al.*, 1981), ervilhas (SANDER *et al.*, 1977) e também em bactérias (CLARK *et al.*, 1950 *apud* OWAIS *et al.*, 1979; KLEINHOFES *et al.*, 1974). Porém, algumas pesquisas informaram que a AS é mutagênico altamente influenciado pelas condições de pH ácido da solução. Entretanto, a eficiência deste mutagênico não só depende do pH, como também da condição de umidade da semente. O tempo de embebedimento da semente em solução com AS, determina declínio gradual de danos no estágio de plântula e redução significativa de esterilidade (SARMA, 1979). Comparando com outros mutagênicos físicos e químicos, AS tem apresentado algumas vantagens, devido a sua ótima solubilidade em água, por ser sólido em forma de pó; conseqüentemente, é mais seguro e mais fácil de manipular soluções de concentrações mais elevadas, além de menor custo, permitindo desenvolver trabalhos de mutações em lugares onde existam condições limitantes de recursos (ANDO *et al.*, 1980).

O produto químico EMS é agente mutagênico de alta eficiência (GAUL, *et al.*, 1972; GREGORY *et al.*, 1966 *apud* CARNEIRO *et al.* 1987) e mais empregado na indução de mutações em plantas cultivadas, tanto ao nível de diplóides quanto de poliplóides (NARAYANAN *et al.*, 1969).

Tendo em vista a necessidade de estudos adicionais sobre o efeito da AS em trigo hexaplóide, avaliou-se os danos produzidos por diferentes concentrações dos agentes mutagênicos azida sódica (AS) em comparação com Metano Sulfonato de Etila (EMS) sobre a fisiologia das plantas de trigo hexaplóide na geração M<sub>1</sub>.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Genética Vegetal do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia (DZG-IB/ UFPel) e do

Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia (DF/ FAEM/ UFPel), no período compreendido entre outubro a dezembro do ano de 1997. A instalação do experimento foi em delineamento em blocos ao acaso, com 3 repetições, utilizando 3 genótipos (BR 32, EMB 120 e CEP 24), submetidos ao efeito de 2 mutagênicos em três doses distintas, sendo o controle representado por ensaio em branco com 3 repetições. Cada parcela foi representada por um rolo de papel germinador com 100 sementes de cada genótipo. Foram empregados os mutagênicos Azida Sódica (NaN<sub>3</sub>), nas concentrações de 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 20<sup>-3</sup> M e, Metano Sulfonato de Etila (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) nas doses de 0,5, 1,0 e 1,5%, ambos com pH 3,0. As sementes foram amarradas numa malha de nylon, sendo submetidas ao pré-embebedimento em 14 horas em água destilada seguida por 2 horas com o tratamento com AS e EMS nas distintas doses supracitadas. Após retiradas dos tratamentos, as sementes foram lavadas com água corrente por uma hora. As 100 sementes de cada tratamento foram arranjadas no papel germinador colocadas posteriormente em câmara de crescimento a 21°C. A contagem da germinação foi feita três dias após semeadura e a avaliação de comprimento de plântulas e de raízes, após o período de 10 dias da emergência. A comparação das médias foram feita utilizando o teste de DMS a 5% (STEEL & TORRIE, 1980). As análises foram avaliadas através do programa estatístico SAS, nos diferentes mutagênicos, doses e genótipos envolvidos no trabalho.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises estatísticas demonstrado na Tabela 1, revela que há diferenças significativas a 5% de probabilidade, para as fontes de variação genótipo, mutagênico e doses sobre os caracteres testados como percentual de germinação, comprimento de plântulas e raízes. A interação tripla mostrou diferenças significativas para os caracteres germinação e comprimento de plântula. A interação simples mutagênico x dose, revelou comportamento diferenciado entre os caracteres germinação, comprimento de plântula e raiz, evidenciando uma maior participação do mutagênico sobre os caracteres estudados.

Na Tabela 2 estão inseridos dados relacionados a valores médios dos caracteres germinação, comprimento de plântula e raiz. Os resultados obtidos com AS revelam que seu efeito, na geração M<sub>1</sub>, foi mais drástico do que o EMS, principalmente sobre o caráter germinação, provocando efeito praticamente letal na maior dose de AS e uma severa redução na percentagem de germinação. Efeitos similares foram obtidos em trabalhos feito por HASEGAWA & INOUE (1983), relatando menor percentagem de germinação de sementes M<sub>1</sub> em tratamentos com AS. Trabalhando com

cevada, PEARSON et al. (1975) também verificou reduzida percentagem de germinação. Segundo este autor, quando a azida é ajustada a pH 3, causa demora na fase mitótica e na síntese de DNA da divisão celular da planta, sendo esta demora por ele interpretado, como deficiência de ATP que, quando liberada, permite as células progredirem normalmente por mitose; assim mesmo com retardamento na fase de germinação, este mutagênico tinha efeito poderosos na indução de mutação em cevada. O efeito do pH na ação do mutagênico AS, tem sido evidenciado também por

NILAN et al. (1976), onde este autor observou aumentou na freqüência de mutação em cevada, e por RINES (1985) apud SILVA et al. (1994) informando que AS com pH neutro ou alcalino tinham pouco efeito sobre a germinação de aveia hexaplóide.

TABELA 1 - Resumo da Análise de variância (ANOVA) para os caracteres germinação (GR), comprimento de plântula (CP) e comprimento de raiz (CR)

FV	GL	GR		CP		CR	
		E(QM)	Pr > F	E(QM)	Pr > F	E(QM)	Pr > F
Genótipo (G)	2	0,96*	0,0036	25,52*	0,0001	48,97*	0,0018
Mutagênico (M)	2	86,27*	0,0001	598,87*	0,0001	376,92*	0,0001
Dose (D)	3	70,03*	0,0001	119,21*	0,0001	155,81*	0,0001
Repetição	2	0,24 (ns)	0,2128	0,38 (ns)	0,7592	1,72 (ns)	0,7778
G X M	4	1,10*	0,0001	19,27*	0,0001	15,19 (ns)	0,0784
G X D	6	0,47*	0,0123	8,65*	0,0001	1,89 (ns)	0,9446
M X D	1	44,96*	0,0001	265,08*	0,0001	239,07*	0,0001
G X M X D	2	1,12*	0,0016	0,00 (ns)	1,0000	4,21*	0,5425
Resíduo	49	0,15		1,38		6,79	
TOTAL	71						
CV (%)			5,47		8,88		22,23
R <sup>2</sup>			0,98		0,97		0,83

FV - fonte de variação

GL - grau de liberdade

E(QM) - estimativa do quadrado médio

CV - coeficiente de variação

R<sup>2</sup> - coeficiente de determinação

TABELA 2 - Média por parcela dos caracteres germinação (GR), comprimento de plântula (CP) e comprimento de raiz (CR), em diferentes concentrações de Azida Sódica (AS) e Etil Metano Sulfonato (EMS)

Genótipo	AS (M)	GR	CP	CR	EMS (%)	GR	CP	CR
BR 32	0	9,03 (100)* b	16,26 (100) b	14,69 (100) b	0	9,03 (100) b	16,26 (100) a	14,69 (100) a
	10 <sup>-2</sup>	0,00 (00) a	3,64 (23) a	2,69 (02) a	0,5	8,34 (93) a	17,14 (105) ab	17,16 (116) b
	10 <sup>-3</sup>	5,53 (61) ab	10,86 (67) ab	8,67 (59) ab	1,0	8,26 (91) a	17,67 (108) b	15,29 (104) a
	20 <sup>-3</sup>	8,01 (89) b	13,20 (82) b	13,89 (95) b	1,5	8,12 (90) a	16,92 (104) ab	14,72 (100) a
EMB120	0	9,07 (100) b	12,35 (100) c	13,06 (100) b	0	9,07 (100) b	12,35 (100) a	13,06 (100) b
	10 <sup>-2</sup>	0,00 (00) a	0,58 (05) ab	0,92 (07) a	0,5	7,61 (84) a	18,14 (146) b	11,42 (87) a
	10 <sup>-3</sup>	7,71 (85) b	8,08 (65) bc	6,14 (47) ab	1,0	7,85 (87) a	15,14 (123) ab	11,26 (86) a
	20 <sup>-3</sup>	8,32 (92) b	10,94 (89) c	15,19 (117) b	1,5	7,81 (87) a	16,72 (136) b	10,57 (81) a
CEP 24	0	8,88 (100) b	17,27 (100) b	17,26 (100) b	0	8,88 (100) b	17,27 (100) b	17,26 (100) b
	10 <sup>-2</sup>	0,00 (00) a	0,42 (02) a	0,42 (02) a	0,5	7,39 (84) a	17,20 (99) b	16,40 (95) b
	10 <sup>-3</sup>	6,17 (70) b	11,10 (64) b	7,70 (44) ab	1,0	7,70 (86) a	17,03 (98) ab	15,65 (90) ab
	20 <sup>-3</sup>	8,30 (94) b	14,10 (81) b	12,32 (72) b	1,5	7,12 (80) a	15,01 (87) a	14,70 (86) a

\* Valores entre parêntese representam percentagens em relação à testemunha, considerando 100%.

Nas doses intermediárias de AS (10<sup>-3</sup> e 20<sup>-3</sup> M), demonstraram poucas modificações na germinação, no comprimento de plântulas e raízes, na comparação com a concentração 0 (controle), como visto na Tabela 2. Por outro lado, é interessante mencionar que NILAN et al. (1976), encontrou maior freqüência de

mutação em cevada, na geração avançada, com tratamento na dose 10<sup>-3</sup> M de AS com solução a pH 3. Assim como, PRINA & FAURET (1983) encontrou maior freqüência de mutantes em feijão, em doses que revelaram ausência de danos fisiológicos, na geração M<sub>1</sub>.

Os mutagênicos atuaram sobre os três genótipos testados de forma diferenciada, e as doses também demonstraram comportamento distintos sobre os caracteres germinação comprimento de plântulas e raízes. A variação observada, na média, mostrou que os genótipos respondem distintamente para os caracteres analisados, e que para a porcentagem de germinação a diferença foi mais acentuada, principalmente para o mutagênico AS, causando letalidade para a dose mais alta. Para o EMS não causou danos severos na germinação em comparação com o controle. Entretanto, analisando os caracteres comprimento de plântulas e raízes nos genótipos BR 32 e EMB 120, os valores ultrapassaram às médias do controle, indicando efeito estimulador sobre estes caracteres. O genótipo CEP 24 foi o que apresentou comportamento mais diferenciado dos genótipos testados, tanto para a aplicação do agente mutagênico AS, quanto ao EMS, revelando maior sensibilidade aos mutagênicos.

Apesar de ter sido detectada variações entre as médias das doses testadas, para cada mutagênico sobre os caracteres germinação, comprimento de plântulas e raízes (Tabela 2), o nível de significância apresentado pela diferença mínima significativa, só foi observada para a dose mais alta de AS, sendo que as demais doses apresentaram comportamento similares quando aplicado o teste de DMS a 5%.

Para as diferentes doses de EMS (Tabela 2), foi possível verificar que seu efeito demonstrou menor intensidade na geração M<sub>1</sub>, registrando danos menos severos na fase de germinação, comprimento de plantas e raiz. Portanto, doses diferenciadas das testadas, deverão ser analisadas em futuro próximo, para trigo hexaplóide.

## CONCLUSÕES

As constituições genéticas distintas de cultivares de trigo hexaplóide, responderam aos efeitos mutagênicos de forma diferenciada, principalmente na presença de variações de doses dos produtos químicos. Os mutagênicos com ação mais drástica como AS, podem determinar efeitos letais na viabilidade de sementes M<sub>1</sub>. Além disto, doses também provocam efeitos marcantes sobre os caracteres comprimento de plântulas e raízes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários e estagiários do Laboratório de Genética Vegetal do Instituto de Biologia e do Laboratório de Sementes da Faculdade de Agronomia, pelos auxílios prestados durante o preparo dos tratamentos e ao Dr. Vanderlei da Rosa Caetano, pela doação das sementes das cultivares utilizadas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, A. ; TULMANN NETO, A. ; MENTEN, J. O. M. (1980). **Sodium Azide mutagenicity in rice seeds.** Proceedings of the Second Japan -Brasil. Symposium on Science and Technology. RJ, SP, Brasília. P 192-199.
- CARNEIRO, J.E.de.; BARBOSA,H.M.; VIEIRA,C.; CARDOSO,A.A. (1987). **Alterações nos caracteres de plantas M1 de *phaseolus vulgaris* derivadas de sementes tratadas com etil-metanossulfonato.** Revista Ceres. MG, 34(193):313-320.
- GAUL, H.; FRIMMEL, G.; GICHNER, T.; ULONSKA, E. (1972). **Efficiency of mutagenesis.** In: International Atomic Energy Agency (ed). Induced Mutations and Plant Improvement. Vianna, 121-139p.
- HASEGAWA, H.; INOUE, M. (1983). **Enhancement of sodium azide mutagenicity by ethidium bromide in rice (*Oryza sativa* L.).** Envir. Exp. Bot., 23:53-57.
- KLEINHOF, A.; HODGDON, A.L.; OWAIS, W.M.; NILAN, R.A. (1972). **Effectiveness and safety of sodium Azide mutagenesis.** Mutation Research.
- KLEINHOF, A.; SANDER, C.; NILAN, R.A.; KONZAK, C.F. (1974). **Azide Mutagenicity-Mechanism and nature of mutants produced.** 1217:196-199, in Polyplóidy and Induced Mutations in Plant Breeding. IAEA, Vienna
- KLEINHOF, A.; OWAIS, W.M.; NILAN, R.A. (1978). **Azide. Mutat. Res.,** 55:165-295.
- KONZAK, C.F.; NIKNEJAD, M.; WICKHAM, I.; DONALDSON, E. (1975). **Mutagenic interation of azide on mutation induced in barley seeds treated with diethyl sulfate or N-methyl-N-nitrosourea.** Mutat. Res., 30:55-62.
- NARAYANAN, K.R.; KONZAK, C.F. (1969). **Influence of chemical and post-treatments on the mutagenic efficiency of alkylating agents.** In: International Atomic Energy Agency (ed). Induced Mutations in Plants. Vienna, 281-304p.
- NILAN, R.A.; KLEINHOF, A.; SANDER, C. (1976). **Azide mutagenesis in barley.** Thiemig, Munich, 113-122p.
- OWAIS, W.M.; KLEINHOF, A. ; NILAN, R.A. (1979). **In Vivo conversion of sodium Azide to a stable mutagenic metabolite in *Salmonella typhimurium*.** Mutation Research, 68:15-22.
- OWAIS, W.M.; KLEINHOF, A.; RONALD, R.C.; NILAN, R.A. (1981). **Isolation of na azide mutagenic metabolite in *Salmonella typhimurium*.** Mutation Research, 91:155-161.
- PEARSON, O.W.; SANDER, C.; NILAN, R.A. (1975). **The effect of sodium azide on cell processes in the embryonic barley shoot.** Radiat. Bot., 15:315-322.
- PRINA, A. R. & FAVRET, E. A. (1983) **Parabolic effect in sodium azide mutagenesis in barley.** Hereditas. 98:89-94.
- SANDER, C. & MUEHLBAUER, F.J. (1977). **Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in *Pisum*.** Envir. Exp. Bot., 17:43-47.

- SARMA,N.P.; PATNAIK,A.; JACHUCK,P.J. (1979). **Azide mutagenesis in rice - effect of concentration and soaking time on induced chlorophyll mutation frequency.** *Envi. Exp. Bot.*, 19:117-121.
- SILVA,G.; BARBOSA,H.M.;CRUZ,C.D.; VIEIRA,C. (1994). **Danos biológicos induzidos pela azida sódica em plantas M1 de *phaseolus vulgaris* L.** *Revista Ceres, MG, 41 (236):431-441.*
- STEEL,R.R.D.; TORRIE,J.H. (1980). *Principles and procedures of statistics.* New York, McGraw Hill. 633p.