

## Unidade 4 - Mutação

### 1. Introdução

Num campo natural ou mesmo numa lavoura encontra-se diversidade de plantas e animais. Esta diversidade é devido às espécies que ali vegetam, além de ser resultante da ação ambiental. Do ponto de vista genético a diversidade num ambiente é devido ao próprio genótipo de cada espécie.

Se for considerada apenas uma espécie, num dado ambiente é possível encontrar-se variações. Se essas variações forem isoladas para um estudo mais aprofundado do que apenas a observação, e se ela fora de caráter herdável é certo que se está diante de uma mutação. Portanto, na conceituação clássica, pode-se dizer que uma mutação é toda variação fenotípica de caráter herdável.

É necessário salientar que nem toda alteração fenotípica é de caráter herdável. Aquela que não passa de uma geração para outra é chama de variação ambiental ou flutuação apenas.

Mutações podem ocorrer em todas as partes do vegetal, porém deve-se ter cuidado em sua análise, pois há células de certos tecidos, como por exemplo, a epiderme ou as células condutoras que possuem modificações que são naturais e não são mutações.

Apesar de terem começado o estudo das mutações pela década de 20, ainda hoje se vê estudos com mutantes em todas as áreas da Biologia, inclusive em plantas agronomicamente exploráveis, buscando-se novas formas alélicas que sejam propícias ao melhoramento vegetal.

O presente capítulo pretende dar uma ideia de mutação sob a ótica clássica e sobre suas aplicações no campo do Melhoramento Vegetal.

### 2. Mutações espontâneas e mutações induzidas

Alterações tanto a nível cromossômico como gênico são eventos raros e que ocorrem de forma espontânea. A frequência das mutações, de forma natural, é da ordem de 1/100.000.000 ou  $10^{-8}$  a 1/10.000.000 ou  $10^{-7}$ . Portanto para se observar um mutante numa população de 100 milhões de plantas é necessário ser bom observador, em primeiro lugar, e que ela tenha acontecido, em segundo lugar, porque não é no plantio de 100 milhões de plantas que sempre se terá uma mutação ocorrida de forma natural. Sua ocorrência está relacionada com os agentes causadores e a instabilidade dos genótipos.

As mutações induzidas ou provocadas são aquelas que deveriam ocorrer naturalmente, mas que agentes mutagênicos aceleram seu aparecimento. A frequência de uma mutação que foi induzida é da ordem de 1/100.000 ou  $10^{-5}$  a 1/10.000 ou  $10^{-4}$ . As mutações induzidas são aquelas em que agentes de ação mutagênicas participam, agindo sobre as células vegetais.

### 3. Agentes mutagênicos

Os agentes mutagênicos são elementos, químicos ou físicos, que provocam alterações em vários níveis nas plantas. Podem afetar desde o DNA até as organelas citoplasmáticas, modificando o fenótipo das plantas.

De uma forma geral pode-se classificar os agentes mutagênicos em físicos e químicos.

#### 3.1. Mutagênicos Físicos

Os mutagênicos físicos são as radiações, como por exemplo, os raios X, raios gama derivados do  $\text{Co}_{60}$  ou do  $\text{Ce}_{137}$ , os raios infravermelhos e os ultravioletas. Normalmente, os mutagênicos físicos causam alterações a nível cromossômico, principalmente quebras cromossômicas, pois seus efeitos são mais drásticos do que os agentes químicos.

Os raios X são altamente potentes. Eles podem quebrar cromossomos, oxidar a desoxirribose, desaminar e dehidroxilar bases e formar peróxidos. Essas alterações levam tanto as aberrações cromossômicas como as mutações gênicas de todos os tipos.

A luz ultravioleta apesar de ser menos energética que os raios X também é um poderoso mutagênico devido a que as bases dos ácidos nucleicos absorvem energia de seus comprimentos de onda. Quando expostos a UV as pirimidinas, comumente, adicionam uma molécula de água entre os carbonos 4 e 5, o que enfraquece as pontes de hidrogênio com sua purina complementar e permite separação da cadeia de DNA naquele local. A UV também induz a formação de dímeros de pirimidina, produzindo dímeros do tipo TT, CC, UU ou mistos como CT, que podem ser formados entre bases adjacentes na mesma cadeia ou entre bases opostas (= entre cadeias).

### 3.2. Mutagênicos químicos

Entre os mutagênicos químicos há aqueles que são consagrados como tal, são chamados agentes alquilantes, são eles: etil metano sulfonato; etil etano sulfato; metil metano sulfonato; dietil sulfato; azida sódica; ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ). Esses químicos adicionam radicais alquila  $-\text{CH}_3$ ;  $-\text{CH}_3-\text{CH}_2$  em posições variadas nas bases nitrogenadas, alterando a cadeia de DNA. Eles são considerados produtos radiomiméticos, pois mimetizam o efeito dos mutagênicos físicos.

### 3.3. Outros mutagênicos

Outros produtos químicos podem ser considerados como mutagênicos, como por exemplo, a hidroxilamina, que reage com o grupamento amino da citosina ( $\text{C}^*$ ) de forma que ocorra pareamento dessa base com a adenina.



A nitrosoguanidina permite a formação de bases análogas instáveis e/ou alterando a DNA polimerase, impedindo a duplicação do DNA de forma normal, além de produzir ligações entre cadeias opostas. O gás mostarda (mostarda nitrogenada) e a mitomicina C formam dímeros de purinas que estão em cadeias diferentes. Pode-se acrescentar nesse grupo os biocidas em geral. O benomyl e o carbendazin, que são princípios ativos de herbicidas, causaram aneuploidias, poliploidias e pontes telofásicas em células mitóticas de pontas de raízes de cebola (Boyle), enquanto que o herbicida Dicamba (ácido 2-methoxy- 3,6-dichlorobenzoico), em diferentes concentrações, causou redução do índice mitótico, células multinucleadas, em células meióticas de trigo (SERENO et al, 1981). Esse assunto será abordado mais especificamente em outro item.

## 4. Mutações a nível molecular

Apenas recordando que o fenótipo é resultante do processo metabólico/fisiológico de proteínas e que essas são constituídas de resíduos de aminoácidos e que, por sua vez, esses são codificados por segmentos de DNA, que fazem parte dos cromossomos, que estão no núcleo das células vegetais, pode-se dizer que qualquer alteração em algum segmento de DNA acarreta uma modificação da proteína, de uma forma geral.

### 4.1. Tipos de mutação

As mutações são classificadas em relação aos tipos de efeitos como:

#### 4.1.1. Mutações de ponto

Esse tipo de mutação ocorre em um ou poucos nucleotídeos, não afeta a estrutura do cromossomo e, devido à propriedade de degenerescência do código genético, ela pode não aparecer. Nesse caso é chamada de mutação silenciosa. O fenótipo mutado não é detectado numa geração, porém pode aparecer em gerações seguintes. As mutações de ponto podem ser classificadas de acordo com o local onde ocorre na molécula de DNA. Elas podem afetar:

##### a. A porção fosfato

Se houver a incorporação do P32 radioativo, ao invés do P31, não radioativo, haverá a liberação de um elétron ao decompor-se em S32 não radioativo, causando um desligamento entre a porção fosfato e a desoxirribose. Isto produz quebra no DNA.

##### b. A porção açúcar

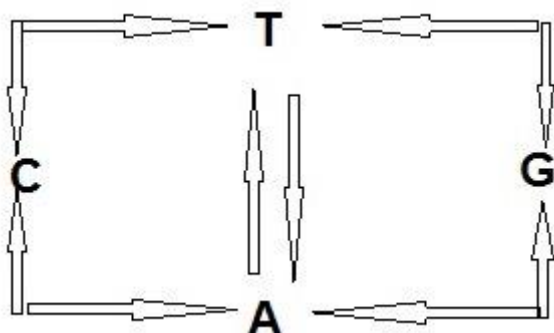
O sal de manganês faz com que durante a replicação do DNA possam ser incorporados nucleotídeos de ribose ou de desoxirribose. Quando a ribose é incorporada pelo DNA polimerase, as enzimas de RNAses reconhecem o erro e o DNA híbrido, naquele ponto, sofre ação de digestão enzimática e quebra.

##### c. As bases nitrogenadas

Essas são alterações mais bem conhecidas a nível molecular e podem ser divididas em:

##### 1) Substituição de pares de bases

Esse tipo de mutação recebe o nome de Transição, quando a substituição for de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra, não saindo do mesmo grupo químico. A outra substituição de bases pode ser entre grupos químicos, portanto uma purina é substituída por uma pirimidina, e vice-versa. Esse caso recebe o nome de Transversão. Com a transição e transversão são possíveis 12 substituições entre bases nitrogenadas, como mostra a figura abaixo.



**Figura 4.1** – Modo de transição e transversão entre bases nitrogenadas. T – timina, G – guanina; A – adenina e C – citosina.

##### 2) Alteração de leitura

- i. **Inserção:** a ocorrência de inserção de uma base nitrogenada em qualquer ponto do DNA altera a sequência de códons formados.
- ii. **Deleção:** é outra forma de alteração do quadro de leitura pela RNA polimerase, alterando, igualmente, a sequência de códons provenientes dessa leitura.
- iii. **Alterações combinadas:** em algumas situações é possível que em algum ponto do gene ocorra uma inserção e logo adiante uma deleção, resultando, no final uma sequência de códons normais, com alteração ou não da proteína resultante.

A Tabela 4.1 abaixo demonstra esses tipos de alterações partindo de uma sequência aleatória que é normal, com uma possível cadeia proteica do DNA proposto. Após as alterações as cadeias proteicas

formadas. Não foi colocado o RNAm correspondente, mas não quer dizer que ele não exista, entre o DNA e a cadeia de aminoácidos.

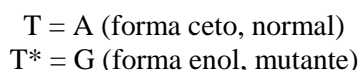
Tabela 4.1 – Sequência aleatória de bases com suas modificações.

Sequências de bases no DNA	Polipeptídeos formados
TACTGGTGGTGGT ...	MET – TRE – TRE – TRE ... (Normal)
TACTTGGTGGTGGT ... (inserção)	MET – ASN – HIS – HIS ... (Mutante)
TACGGTGGTGGT ... (deleção)	MET – PRO – PRO – PRO ... (Mutante)
TACTTGGGGTGGTT ... (combinadas)	MET – ASN – PRO – TRE

#### 4.1.1.1. Tautomerização de bases nitrogenadas

As moléculas não podem ser consideradas como entidades estáticas, pois estão, constantemente, rearranjando seus prótons, elétrons e suas pontes. Algumas vezes, ao assumirem suas formas tautoméricas mais raras, as bases nitrogenadas podem realizar pareamentos errados o que levará a substituição de bases do tipo transversão ou transição.

A timina tem, normalmente, a configuração molecular do tipo ceto, raramente pode ocorrer que ela tome a forma enol, que é a mudança de um próton-hidrogênio do nitrogênio na posição 1 para o oxigênio do grupo ceto no carbono 6, ou se torna ionizada. Em ambos os casos sua propriedade de formação de pontes de hidrogênio estará modificada e ela irá parear mais facilmente com a guanina do que com a adenina.



Em próximas duplicações do filamento de DNA que contém esse pareamento, T\* na forma enol com G, a DNA polimerase irá colocar uma citosina no lugar da T\*, ocasionando a substituição de um par TA por CG.

Tabela 4.2 – Alteração na leitura por tautomerização da base timina

DNA original	DNA duplicado	
AAAAATCCCGGTA	AAAAATCCCGGTA	
TTTTTTAGGGCCAT	TTTTTAGGGCCAT	
	AAAAATCCCGGTA	
	TTTTTAGGGCCAT	
DNA que sofre alterações de base por tautomerização		
AAAAAT*CCCGGTA	AAAAAT*CCCGGTA	AAAAAT*CCCGGTA
TTTTTTAGGGCCAT	TTTTTG GGGCCAT	TTTTTG GGGCCAT
	AAAAATCCCGGTA	AAAA C <sup>1</sup> GGGCCAT
	TTTTTTAGGGCCAT	TTTTT G <sup>1</sup> CCCGGTA
		TTTTTTAGGGCCAT
		AAAAATCCCGGTA
		AAAAATCCCGGTA
		TTTTTTAGGGCCAT

T\* base de timina tautomerizada

C<sup>1</sup> e G<sup>1</sup> pares de bases trocados devido tautomerização da timina

#### 4.1.1.2. Análogos de bases nitrogenadas

Os análogos de bases são moléculas que, apesar de não ocorrerem usualmente na molécula de DNA são aceitas pelas células como substitutas das bases normais. Essas moléculas se assemelham às bases nitrogenadas pela mesma disposição eletrônica dos hidrogênios e podem ser incorporadas no DNA em lugar das bases normais, durante o processo de duplicação. Não são reconhecidas pela DNA polimerase como erros de duplicação. Podem causar mudanças tautoméricas, como a descrita acima, provocando substituições de pares de bases.

Exemplo de análogos de base é o caso da 5-bromouracila (5BU) que, em sua forma ceto pareia com a adenina e em sua forma enol com a guanina. Outros análogos de base são encontrados *in vitro*, uracilo, 5-bromouracilo e 5-fluorouracilo que podem substituir a base timina; 5-metilcitosina, 5-bromocitosina e 5-fluorocitosina são capazes de substituírem a citosina. *In vivo* a 5-bromouracilo, 5-clorouracilo e 5-iodouracilo substituem a timina no DNA de bactérias, fungos e culturas de células humanas.

#### 4.1.1.3. Desaminação oxidativa de bases nitrogenadas

O ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) produz desaminação oxidativa das purinas e das pirimidinas alterando suas propriedades de formação de pontes de hidrogênio. A adenina é transformada em hipoxantina que tende a parear com a citosina, ao invés da timina normalmente. A guanina é transformada em xanteno e apesar de ainda parear com a citosina, o faz por apenas duas pontes de hidrogênio ao invés de três como ocorre normalmente. A citosina é desaminada por uracila e pareará com adenina. O resultado dessas desaminações leva a transições entre bases na molécula de DNA. Como resumo a tabela abaixo explicita todas as transformações citadas:

Tabela 4.3 – Resultado da Desaminação de bases e pareamentos posteriores.

Base normal	Base transformada	Pareamento resultante
Adenina	Hipoxantina	A* : C
Guanina	Xanteno	G* : C (duas pontes de H)
Citosina	Uracila	C* : A

#### 4.1.2. Mutações cromossômicas

As mutações cromossômicas induzidas principalmente por mutagênicos físicos podem ser chamados também de macrolesões devido à extensão do dano mutacional que causa. Seu efeito é a alteração na estrutura ou no número de cromossomos que podem ser chamadas de aberrações ou alterações cromossômicas. Elas causam, na estrutura dos cromossomos:

- Deleção:** quando um segmento de DNA é perdido.
- Duplicação:** ocorre a duplicação de um segmento do DNA. Essa duplicação se for inserida na molécula no mesmo sentido de sua produção, será chamado de “duplicação em tandem”, porém se inserir de forma invertida em relação à sua produção será chamada de “duplicação invertida”.
- Inversão:** um segmento do DNA quebra e se reinsere no mesmo ponto, porém de forma invertida. A inversão será dita paracêntrica quando ocorrer fora da zona do centrômero, e pericêntrica quando envolver o centrômero.
- Transposição:** nesse caso cromossomos não homólogos acham-se envolvidos. Ocorre uma quebra em um segmento de DNA num cromossomo e esse segmento se insere em outro cromossomo, em qualquer ponto. Esse caso a transposição recebe o nome de “simples”. Quando dois cromossomos não homólogos quebram-se e cada segmento resultante insere-se no outro, a transposição recebe o nome de “recíproca”.

Na tabela abaixo será demonstrada, de forma resumida toda a mutação acima descrita.

Tabela 4.4 – Alterações na estrutura dos cromossomos devido macrolesões causadas por mutagênicos físicos, principalmente.

DNA normal	Nome da macrolesão	Demonstração
A B C D E F	Deleção	A B D E F
A B C D E F	Duplicação em tandem	A B C B C D E F
A B C D E F	Duplicação invertida	A B C C B D E F
A B C D E F	Inversão	A B D C E F
A B C D E F	Transposição Simples	A B C D E F 1 2
1 2 3 4 5 6		3 4 5 6
A B C D E F	Transposição Recíproca	1 2 C D E F

As mutações que ocorrem no número de cromossomos levam a produção de poliploide e de aneuploides. A unidade 2 explica cada um desses tipos dando ênfase ao seu uso no melhoramento de plantas.

Pode-se classificar as mutações de acordo com o tecido onde elas ocorrem. Nesse caso tem-se as mutações somáticas e as mutações germinativas. Na primeira somente as células da parte vegetativa são alteradas. Por exemplo, a laranja de umbigo que não possui sementes proveio de laranjais “crioulos” devido mutação num dos ramos da laranjeira crioula. Sua manutenção se dá apenas através de reprodução vegetativa, como enxertos e mudas. A mutação somática pode atingir células do embrião que originará nova planta. Essa planta mostrará a alteração ao longo do seu processo de desenvolvimento vegetativo e pode não passar para a próxima geração. A variegação em folhas e caules é um indício de mutação somática ocorrida no embrião. Ela pode ser aproveitada, se vantajosa, através da reprodução vegetativa ou pela cultura “*in vitro*” de tecidos mutados.

Como a mutação somática é passada de uma geração para outra? Se ela for propagada por via vegetativa será então um clone. Se o pesquisador permitir que os clones se desenvolvam vegetativamente, chegando ao estágio reprodutivo, a mutação, inserida nos cromossomos será parte de umas poucas células gaméticas. Sendo o gameta que leva a mutação o fecundador o novo indivíduo originado daquela semente será o mutante.

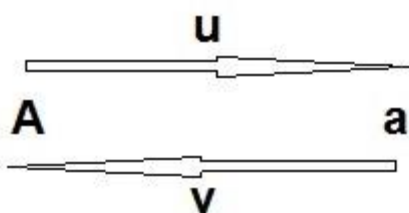
O segundo tipo de mutação, a germinativa, é aquela que ocorre nos gametas propriamente ditos. Se a alteração ocorrer durante o processo de formação de gametas, portanto em alguma fase da meiose, poucos gametas serão atingidos e se esse gameta for, por exemplo, o grão de pólen e fecundar um óvulo normal, então no indivíduo originado aparecerá a mutação. Se a alteração ocorrer nas células primordiais, as chamadas células-mãe do grão de pólen, então todos os gametas terão a mutação. A nível de população  $F_2$  e seguintes, para se detectar a mutação, deve-se analisar possíveis recombinações intergenéticas e segregações, pois ambas possibilitam o aparecimento de novos indivíduos que podem mascarar o efeito das mutações. Uma das formas de se fazer isso é de se trabalhar com material genético uniforme e correlacionando as gerações entre si.

As mutações podem ser dominantes e recessivas. Pode-se dizer que a mutação, de uma forma geral é desvantajosa para o indivíduo que a possui, entretanto alelos recessivos podem se tornar dominantes e vice versa. Então a mutação chama-se-á dominante quando o alelo recessivo mutar para dominante e o produto proteico/fisiológico derivado for de qualidade igual ao dominante normal; o processo de seleção permitirá sua manutenção na população. Quando o alelo dominante mutar para a forma alélica recessiva o seu produto proteico/fisiológico for compatível com o recessivo da população esse alelo se manterá. Se o produto proteico/fisiológico for diferente, porém não afetando deletoriamente o indivíduo, ele também se manterá na população, porém por várias gerações sem ser percebido. Por isso o acompanhamento de frequências alélicas e genotípicas poderá evidenciar o aumento de um ou de outro alelo resultante da mutação.

Pelo aspecto evolutivo as mutações muito contribuirão principalmente no que diz respeito à formação de espécies, pois plantas mutantes, ao longo do tempo, foram acumulando mutações que se fixaram na população e, portanto deram capacidade adaptativa ao vegetal.

As plantas cultivadas também sofreram mutações além da seleção, de forma natural e executada pelo melhorista para chegar ao padrão atual, embora o processo de seleção ainda esteja ocorrendo. Tulmann Neto et al, (1982) produziram segregantes de feijão como fontes de resistência a doenças, principalmente ao mosaico dourado e bacterioses.

As mutações espontâneas ou induzidas podem, portanto alterar as frequências alélicas e genotípicas das populações. Se for considerada a seguinte relação de um gene qualquer com dois alelos:



Sendo  $u$  a taxa de mutação do alelo dominante para o recessivo e  $v$  a do recessivo para o dominante e ainda  $u > v$ , porque a taxa de mutação é maior do que a de retromutação, então a frequência de  $\underline{A}$  e  $\underline{a}$  na população total será alterada. O

cálculo das frequências alélicas devido às mutações serão estudadas na Análise de Frequências Mendelianas ou Genética de Populações (Unidade 5).

À medida que a velocidade de  $\underline{A}$  para  $\underline{a}$  aumenta, ou seja, as quantidades de genes mutados vão se acumulando, as plantas  $\underline{a}$  não poderão mais cruzar-se com as de  $\underline{A}$ , pois se distanciaram muito geneticamente. É o caso da soja cultivada *Glycine max* que não se cruza com mais nenhuma espécie desse gênero, a não ser artificialmente, podendo gerar plantas estéreis.

Em milho (*Zea mays*) alguns genes tiveram suas taxas de mutação espontâneas estipuladas. Strickberger (1990) estipulou que o gene  $\underline{Sh}$  (endosperma normal) para  $\underline{sh}$  (*shrunk* – endosperma contraído) é de 0,12/100.000 gametas; o gene  $\underline{C}$  (endosperma colorido) para  $\underline{c}$  (endosperma incolor) é de 0,23/100.000 gametas e o gene  $\underline{Su}$  (produção de amido maior que a de açúcar) para  $\underline{su}$  (açúcar mais do que amido) é de 0,24/100.000 gametas.

Podem ocorrer mutações em sítios diferentes dentro de um mesmo gene de forma que uma supra o efeito da outra, nesse caso a mutação é chamada intragênica. Ela se chamará intergênica quando atingir genes diferentes, porém a combinação de seus transcritos podem não demonstrar a alteração.

Nos casos citados acima pode-se verificar que o gene possui a propriedade de mutação, entretanto nem todos os genes mutam. Há aqueles que, se mutam, é numa frequência muito baixa de forma espontânea e que não são percebidos na população. Por isso pode-se dizer que há genes imutáveis e genes mutáveis.

Os genes imutáveis são aqueles essenciais à sobrevivência da planta e que não podem sofrer alterações. É o caso da molécula de clorofila. Se houver alguma alteração que impeça sua formação ou que afete sua função captadora de luz, a planta morre e a mutação não se instala. Não se deve entender aqui que alelos recessivos que causam albinismo sejam mutações, pois normalmente são encontrados nas populações de plantas.

Os genes mutáveis são aqueles que seguem a frequência normal de mutação e algumas vezes, ao longo do tempo, mantém-se na população. Os indivíduos que os possuem recebem o nome de mosaicos. Em milho o gene  $\underline{R}$ , por exemplo, sobre alterações muito mais frequentemente que outros, podem mudar de  $\underline{Rr}$  para  $\underline{rr}$  numa frequência de 50/100.000 gametas, provocando alterações fenotípicas no endosperma das sementes de milho. Exemplos de genes mutáveis foram encontrados em animais e plantas, contudo se expressam mais comumente em plantas. Ocorrem em tecidos somáticos e mais raras vezes em células germinativas. Mutações somáticas podem mostrar seus fenótipos na forma de variegação em partes das plantas como endosperma, folhas, pétalas. Muitas plantas comuns como boca de leão, *Lathyrus odoratus* e *Ipomeia* tem matizes que indicam a presença de genes instáveis ou mutáveis.

Os genes possuem estabilidade tal que a mutação se torna um evento raro. Porém há genes que agem sobre genes favorecendo o aparecimento das mutações. São chamados genes mutadores. No milho foi encontrado o gene  $\underline{Dt}$  que, em heterozigose ou homozigose dominante atua sobre os genes  $\underline{A}$ ,  $\underline{C}$  e  $\underline{R}$  modificando a coloração das folhas. Os genes  $\underline{A}$ -  $\underline{C}$ -  $\underline{R}$ - em presença do gene  $\underline{pp}$  condiciona a cor vermelha nas folhas. É um caso de epistasia. Na ausência de  $\underline{pp}$  o gene  $\underline{P}$ , tanto em homozigose como em heterozigose, determina folhas roxas. Outras combinações como, por exemplo,  $\underline{aa}$   $\underline{C}$ -  $\underline{R}$ -  $\underline{P}$ - as folhas ficam verdes. O gene  $\underline{Dt}$  atua sobre combinações como  $\underline{aa}$   $\underline{C}$ -  $\underline{R}$ - tornando as folhas variegadas. Se  $\underline{P}$  estiver presente a variegação será sobre a cor roxa e se  $\underline{pp}$  será sobre a vermelha. O gene  $\underline{Dt}$  influencia sobre  $\underline{a}$ ,  $\underline{c}$ ,  $\underline{r}$  mutando-os para  $\underline{A}$ ,  $\underline{C}$ ,  $\underline{R}$ . O alelo  $\underline{dt}$  não tem ação mutadora e é chamado antimutador. Como resumo pode-se representar a tabela abaixo.

Tabela 4.5 – Combinações alélicas e fenótipos determinados pelo gene  $\underline{Dt}$  mutador, em milho.

Combinações alélicas	Fenótipos
$\underline{A}$ - $\underline{C}$ - $\underline{R}$ - $\underline{P}$ -	Roxo
$\underline{A}$ - $\underline{C}$ - $\underline{R}$ - $\underline{pp}$	Vermelho
$\underline{aa}$ $\underline{C}$ - $\underline{R}$ - ( $\underline{P}$ - ou $\underline{pp}$ )*	Verde
$\underline{A}$ - $\underline{cc}$ $\underline{R}$ - ( $\underline{P}$ - ou $\underline{pp}$ )	Verde
$\underline{A}$ - $\underline{C}$ - $\underline{rr}$ ( $\underline{P}$ - ou $\underline{pp}$ )	Verde

A- C- R- P- Dt-  
A- C- R- pp Dt-Variegada sobre roxa  
Variegada de vermelho

---

\* Os fenótipos com aa ou cc ou rr com Dt- serão variegados sobre verde.

## 5. Metodologia de análise de mutantes

O primeiro passo para análise de mutantes é o tratamento, geralmente de sementes, com o mutagênico. Um mutagênico, seja físico ou químico, é eficiente quando produz a mutação sem efeito deletério para o organismo.

A análise da curva de absorção já deve estar previamente determinada, caso se trabalhe com uma cultura que não disponha desse dado. A análise da curva de absorção é realizada utilizando-se dez placas pequenas de Petri com papel filtro umedecido tendo, cada, uma semente. Pode ser feito na temperatura ambiente ou na temperatura média que a semente germina. Pesa-se a semente seca, uma a uma, e anota-se. A partir de uma hora após a pesagem seca inicia-se a pesagem das sementes úmidas a cada 5 minutos, e anotam-se os valores, de forma que a cada hora se tenha dez medidas. Faz-se a média da hora. Esse processo deve ser realizado durante 24 horas, com três repetições para se obter a curva de absorção de água. A análise dessa curva mostra um crescente aumento de peso por absorção de água e multiplicação celular, além de evidenciar duas diminuições na velocidade de absorção e que se refere à divisão mitótica intensa. Nesses dois períodos as células estão mais sensíveis à ação dos mutagênicos (BRUTTI e NEVES, 1992).

### 5.1. Análise de efeitos fisiológicos

Após obtenção da curva de absorção, já se sabe quanto tempo é necessário para deixarem-se as sementes em embebição, em água destilada, antes de aplicar a solução mutagênica. Deve ser nos períodos de multiplicação celular.

Colocam-se, no período indicado, as sementes na solução mutagênica, com solução tampão para o pH, por cerca de 2 horas, normalmente. Depois se lavam em água corrente pelo período de uma hora com a finalidade de eliminar todo excesso de solução mutagênica e, por fim, semeia-se em placas grandes de Petri ou germobox forradas com papel de filtro ou algodão umedecido, coloca-se no germinador.

Cerca de dois a três dias pode-se analisar a frequência de germinação e o comprimento da raiz, hipocótilo e epicótilo devem ser feitos cerca de 168 horas após plantio (BRUTTI e NEVES, 1994). Faz-se a comparação com a testemunha e analisa-se a variância pelo teste F e as médias pelo teste de Tukey a 5%. Se houver significância dos resultados pode-se dizer nesse ponto que há alterações fisiológicas devido ao mutagênico.

### 5.2. Análise dos efeitos morfológicos

Faz-se o tratamento com mutagênico conforme o item 5.1, porém as sementes devem ser plantadas em vasos e levadas para casa de vegetação, sendo tratadas e cuidadas até a produção de sementes. Nessas plantas pode-se analisar a cor das folhas, por causa das mutações de clorofila que podem aparecer indo desde *viridis* até *albinas* passando por *xanta* (= amarelada); posição das folhas, dos ramos, das flores, a cor das flores e a produção de sementes. Essas plantas são da geração  $M_1$ .

### 5.3. Análise das características herdadas

As sementes da  $M_1$  são novamente plantadas em vasos em casa de vegetação e analisadas suas plantas. Se na  $M_1$  for detectados algum mutante, então suas sementes devem ser plantadas em vasos marcados para se saber se realmente a característica mutante passou para a próxima geração, a  $M_2$ .

Se a mutação é benéfica deve-se promover seu cruzamento com plantas normais para se estabelecer o tipo de herança da característica estudada. Foi o que Tulmann Neto e Sabino (1994) fizeram com o mutante denominado CAP-1070 derivado da cultivar carioca, de feijão comum, irradiada com raios gama. O mutante teve o hábito de crescimento modificado em relação ao hábito indeterminado da carioca.



## 6. Modificações do genoma por causas ambientais

Alterações cromossômicas numéricas em que apenas parte do genoma é alterado não causa desmerecimento da planta o que tem, porque não afeta todas as plantas numa lavoura. Alteração de um cromossomo pode, inclusive, ser adaptativo e a planta se manter na população. O melhorista, então, tem um elemento causando variabilidade a mais para estudo e possível seleção, além da recombinação cromossômica, que é normal.

Pelo aspecto citogenético a deficiência ou a adição de um ou mais cromossomos abre possibilidades para estudo de relacionamento entre genes e cromossomos, como também de balanceamento de cromossomos isolados, para estudo da estrutura e cada um deles. Estudos citogenéticos de cada um dos cromossomos do milho existem baseados nos aneuploides. Uma das culturas mais estudadas nesse sentido é o trigo, tanto em tecido somático quanto no reprodutivo. Mitozes e meiose foram estudadas em mais de 100 cultivares sob as mais diferentes condições de estresses ambientais que causaram alterações cromossômicas de diversos tipos. Que tipos de alterações cromossômicas são essas, além daquelas cromossômicas? São as quebras, fusões, formações de pontes telofásicas que pode ocorrer de forma natural em baixa frequência. E quais são os agentes ambientais? O excesso ou falta de umidade, grandes variações de temperatura em pouco tempo, alumínio e manganês tóxicos no solo e doenças.

Moraes-Fernandes et al. (1987) estudaram as instabilidades cromossômicas em trigo, demonstrando que pode haver cromossomos dicêntricos (com dois centrômeros), pontes telofásicas, cromossomos em anel, micronúcleos, na cultivar IAS54. Os autores relataram aneuploidias em alta frequência quando plantas de trigo foram infectadas pelo “barley stripe mosaic virus” (vírus do mosaico estriado da cevada) sendo a mesma anomalia sido detectada em células de cevada infectada pelo mesmo vírus. Além disso, essa última cultura apresentou ainda triploidia e fragmentação cromossômica.

O estudo da frequência dessas anomalias não chegam a alterar a produção, isso porque nos tecidos foliares analisados demonstraram ter menor número de acontecimentos cromossômicos do que nas raízes.

### 6.1. A temperatura como fator mutagênico

É sabido que cada cultura tem o seu período ideal de plantio e de colheita. Soja, feijão, milho, arroz devem ser cultivados no período em que o clima é mais quente, são as culturas de verão. Suas produções decaem significativamente com o abaixamento da temperatura, principalmente no final de seu ciclo, assim como a qualidade do grão. Há diminuição da rentabilidade da cultura a nível de comercialização. Enquanto cevada, centeio, trigo, aveia, triticale devem ser cultivados em climas frios. Entretanto o clima frio apresenta variações maiores do que o clima quente e essas variações, que podem chegar a 20°C, podem causar distúrbios na mitose e meiose dos vegetais. Relativo a isso Moraes-Fernandes et al (1987) relatam que plantas de trigo em florescimento no intervalo de 29°C a 32°C apresentam alterações cromossômicas podendo chegar até a degeneração e esterilidade completa, porém ressalta a possibilidade de seleção de genótipos resistentes a temperaturas altas.

Cultivares mais antigos de trigo foram analisados sob duas condições diferentes de temperatura. O primeiro ensaio foi a 18°C constante e o segundo, em condições ambientais, a temperatura variou de 12°C a 28°C. Esse último ensaio foi o que mostrou maior frequência de anomalias cromossômicas e entre elas uma super condensação de cromossomos (ZANETTINI, 1979, apud MORAES-FERNANDES et al., 1984).

### 6.2. Efeitos mutagênicos dos biocidas

A partir da década de 60 a agricultura tornou-se extremamente dependente de biocidas e é sabido que causavam e causam malefícios para a saúde humana, principalmente para aqueles que os aplicavam nas lavouras. Por isso, hoje, há um volume substancial de referências sobre os efeitos mutagênicos dos biocidas, inclusive alguns se referindo a resistência de plantas daninhas a herbicidas, o que vem provar que o biocida é um agente de mudança de genótipos e, como consequência, de fenótipos. Alguns desses trabalhos serão analisados a seguir.

Os piretroides sintéticos possuem baixa taxa de toxicidade para mamíferos e aves, entretanto alta toxicidade para peixes e pequenos organismos aquáticos. Em 1982, Hsu (apud CHAUCHAN et al., 1986) cita que poluentes ambientais como os pesticidas podem causar alterações cromossômicas.

O princípio ativo “deltametrina”, que é um piretróide provocou anormalidades cromossômicas e de fuso em células de raízes de cebola (*Allium cepa* L.). Redução do índice mitótico, quebras nos cromossomos e nas cromátides desses cromossomos além de formações multipolares e distribuições desiguais de cromossomos formam os efeitos encontrados em raízes que cresceram em diferentes soluções do produto. Análises da fração aquosa dos solos onde esse inseticida é comumente usado, deve ser feito, pois pode provocar anomalias em cultivos subsequentes.

Em 1990, Klein analisou o “permetrine ester” (Ambush 25EC), que também é um piretróide sintético, estabelecendo relação entre os danos cromossômicos e a variação da temperatura. Em baixas temperaturas, 5°C a 10°C, foi significativo à variação, para mais, do índice mitótico, sendo a metáfase a fase mais afetada e a prófase a menos afetada.

O índice mitótico serve como dado comparativo de anormalidades de divisão cromossômica e é parâmetro de análise citológica dessas anormalidades citadas. Ao pesquisador da área de mutação induzida é permitida a análise comparativa de biocidas, como os piretróides sintéticos, aplicados na agricultura com mutagênicos consagrados. Foi o que Karnopp et al. (1999) fizeram em *Hordeum vulgare* L. Comparando citologicamente a deltametrina com EMS e MMS. A pesquisadora e seus colaboradores demonstram que houve redução do índice mitótico nas células meristemáticas quando os tratamentos foram realizados por duas horas, porém com uma hora as anormalidades citológicas causadas pelo deltametrina já eram visíveis. A deltametrina induziu aberrações cromossômicas estruturais e numéricas em pontas de raízes de cevada.

Outros piretróides como K-Othrine, Decis e Tifon foram testados quanto aos efeitos fisiológicos induzidos em cevada. Dois cultivares de cevada tiveram comportamentos diferenciados quanto ao inseticida Tifon. Uma cultivar não apresentou decréscimo no índice de germinação, enquanto que outra apresentou forte redução. De forma geral todos os inseticidas afetaram a parte aérea das plântulas, porém o sistema radicular não mostrou nenhuma anormalidade fisiológica, permitindo a recuperação dessas plântulas (KARNOPP et al., 1997).

Resultados semelhantes foram encontrados com o uso de inseticidas organofosforados, como “diclorvós”, “monocrotofós”, “phosalone” e “oxydementornethyl”, sendo esse último um sistêmico. Esses produtos induzem, além dos efeitos citados, quebras e trocas de moléculas de DNA entre as cromátides homólogas e não homólogas, pontes anafásicas, conexões subcromáticas, formação de diplocromossomos heteromórficos na metáfase e cromossomos em anel. Esses produtos se assemelham a ação de agentes alquilantes (Rao et al., 1987). Já inseticidas como “cloropirifós” e “endossulfan” provocam formação de células poliploides em maior número nas menores concentrações e diminuindo para concentrações maiores (Rao et al., 1988).

A nível molecular/bioquímico pode-se perceber que já ocorrem variações de resistência de plantas a herbicidas. Tomando como exemplo a enzima acetil coa carboxilase (ACCase), que participa da entrada do ciclo de Krebs, os herbicidas “butoxidin” e “diclofop”, que deveriam inibir tal enzima impedindo que as plantas daninhas obtivessem energia via ciclo de Krebs, promoveram a mutação dessa enzima, pelo uso continuado, deixando-as resistentes aos herbicidas. *Avena sterilis*, *Brachiaria plantaginea* que são consideradas ervas daninhas, hoje são resistentes aos herbicidas citados pela mutação da enzima ACCase (HEAP, 2000).

Da mesma forma a enzima acetolactato sintetase (ALS) não foi inibida em progênie derivada do retrocruzamento entre *Latuca sativa* e *Latuca serriola*. A análise dessa progênie demonstrou que a resistência ao inibidor de ALS é devido a duas mutações de ponto, uma no códon 197, que era CCC e codificava para prolina e agora é CAC e codifica para histidina, portanto houve uma transversão; a outra mutação de ponto ocorreu no códon 431 que era AGC e codificava para serina e agora é AAC e codifica para aspargina, portanto ocorreu uma transição (EBERLEIN et al., 1999).

## 7. Efeito biológico da radiação a nível celular

Todos os seres vivos se originam de uma única célula. Portanto, uma célula é uma unidade mínima de vida, porém essa unidade é muito complexa. Ela possui todas as substâncias e todos os metabolismos necessários pra manter sua vida. A grande parte do efeito da radiação *in vitro* sobre essas substâncias é desconhecida e, nesse item serão relatados alguns resultados do efeito da radiação sobre o metabolismo do DNA, RNA, proteínas, fosforilação e enzimas.

### 7.1. Radiação e metabolismo do DNA

Nas células irradiadas o metabolismo do DNA é geralmente alterado. Pode ser observada uma redução da incorporação de precursores no DNA, quando os tecidos são irradiados com LD50 – LD100 de raios X. Se esse tecido for altamente sensível, a síntese de DNA é inibida, exemplo disso é o tecido meristemático. A redução de incorporação de precursores no DNA altera a redução RNA/DNA, que fica aumentada.

### 7.2. Radiação e o ciclo celular

Geralmente o ciclo celular consta das fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, Divisão e de um metabolismo próprio. Os resultados da irradiação sobre meristemas animais e vegetais revelaram o que se segue: (1) a radiosensibilidade das células depende da fase de divisão; (2) a irradiação causa inibição ou atraso da divisão; (3) a irradiação inibe a síntese de DNA na fase S e (4) a irradiação influi na transição de uma fase para outra.

Resumindo os resultados dos experimentos com inibidores da síntese do DNA, por exemplo, actinomicina D, e da síntese de proteínas, por exemplo, puromicina e fluorofenilalanina, foi verificado o seguinte: (1) inibição da síntese do RNA e proteínas em G<sub>1</sub>, inibição da síntese do DNA e a consequente inibição da divisão celular; (2) inibição da síntese do RNA e proteínas logo no início da fase S não altera a síntese de DNA; (3) no meio da fase S, quando ocorre ativamente a duplicação do DNA, a síntese do RNAm diminui e (4) inibição da síntese do RNA no período posterior da fase S e na fase G<sub>2</sub> causa inibição da divisão celular.

Há muito tempo tem sido observada inibição da síntese do DNA nas células irradiadas, e têm sido suscitadas várias discussões a respeito da causa desta. Porém, hoje, acredita-se que: (1) nas células irradiadas com baixa dose ( $\pm 1000$  R) ocorre primeiro o bloqueio em G<sub>2</sub>, consequentemente a duplicação do DNA não é alterada; (2) com alta dose ocorre inibição da síntese do DNA, diretamente.

Quando as células são irradiadas podem ocorrer algumas alterações estruturais do DNA. Isto é possível devido ao fato de que a irradiação com UV causa a formação de dímeros de timina, no DNA “*in vitro*”. Entretanto, se têm poucas provas diretas de que, *in vitro*, e especialmente em seres vivos superiores, as radiações ionizantes causam algumas modificações estruturais no DNA. Isto é, principalmente, devido à dificuldade de separar o DNA da nucleoproteína.

### 7.3. Radiação e metabolismo do RNA

Geralmente a síntese do RNA em si não é afetada diretamente pela radiação. No RNA, tem-se o RNAm, RNAr e RNAt. O RNAm e o RNAt são sintetizados no núcleo através do DNA e o RNAr é sintetizado a partir dos precursores através do DNA e acumulado no nucléolo. Portanto se a irradiação causa alguns danos no DNA, o RNA dependente do DNA e, consequentemente, afetado.

A inibição da síntese do RNA pela radiação ocorre nos tecidos altamente radiosensitivos, porém nos tecidos menos radiosensitivos a síntese do RNA não é afetada, e pelo contrário, parece que aumenta, embora a dose utilizada provocasse a inibição da síntese do DNA. As causas são: (1) inibição da síntese do DNA é um reflexo da morte das células, portanto, nos tecidos menos radiosensitivos, não ocorre morte nem a inibição da síntese do RNA; (2) para a duplicação do DNA necessita-se de toda a cadeia, porém para a síntese do RNA necessita-se geralmente apenas uma região determinada da cadeia de DNA. Portanto os danos provocados no DNA podem não causar nenhum efeito na síntese do RNA; (3) a síntese do RNA é feita na quase totalidade das fases, menos nas fases de divisão. Por essa razão, comparando com a síntese de DNA, que ocorre somente na fase S, a inibição da síntese de RNA ocorre dificilmente.

### 7.4. A radiação e o metabolismo de proteínas e a atividade enzimática

A síntese de proteínas em si não é afetada pela radiação. Porém se a radiação afeta o DNA e, mais ainda, o RNAm, então a síntese de proteínas também será afetada indiretamente. Isto porque a síntese de proteínas ocorre em quase todas as fases do ciclo celular. Nos experimentos com animais a incorporação dos precursores nas proteínas não é inibida, quando as sínteses de DNA e RNA são inibidas.

A atividade enzimática é alterada pela radiação, porém uma enzima *in vitro* mostra radiosensitivities diferentes para uma determinada dose de radiação. Isto porque o efeito da radiação sobre a atividade enzimática é um fenômeno secundário da morte celular, da alteração da ultraestrutura da célula e da alteração de população celular.

### 7.5. O ciclo celular e a radiação

Tanto em animal como em planta o tecido mais afetado pela radiação é o meristema, portanto a radiosensibilidade de meristemas é alta. Na divisão celular necessita-se de energia, de onde vem essa energia? Varias pesquisas mostraram que as substâncias inibidoras da respiração e da fosforilação inibem a divisão celular quando as células são tratadas antes da divisão celular. Porém é conhecido que a dependência do oxigênio das células fica mínima durante a divisão celular. Isto significa que a energia não é fornecida via ATP durante a divisão celular e sim por reservatório de energia que é feito antes da divisão.

Radiação, em geral, causa danos na divisão celular. O mecanismo desses danos é muito complicado, porém uma explicação seria a seguinte: a célula possui compostos sulfidrílicos tais como cisteína e cisteamina. Há muito tempo é bem conhecido que os compostos sulfidrílicos têm ação protetora para a irradiação, portanto, esses compostos funcionam como alvo para a radiação, e os danos causados pela radiação é a consequência da inativação ou destruição desses compostos.

Outro fenômeno é o atraso da divisão celular. Pontas de raízes de *Vicia faba* foram irradiadas com 200 rads de raios X e o seguinte foi observado: (1) as células que já estavam em divisão celular completaram a divisão, porém o atraso mitótico ocorreu no ciclo seguinte à divisão; (2) quanto mais cedo à fase de divisão, maior período de atraso mitótico.

Com o avanço da técnica de autorradiografia com 3H-timidina, marcando os cromossomos, foi verificado que o atraso mitótico ocorreu principalmente devido a danos ocorridos na fase G<sub>2</sub>. A fase G<sub>2</sub> é a que apresenta maior radiosensibilidade. Quando a fase G<sub>2</sub> é a que recebe maior radiação, ocorre imediata estagnação na divisão, e isto resulta no atraso mitótico como um todo. A ordem de radiosensibilidade das fases do ciclo de divisão é G<sub>2</sub> > S > G<sub>1</sub>.

### 7.6. A radiação sobre os cromossomos, núcleos, mitocôndrias e fuso de divisão

Desde que foi inventado o aparelho *micro beam* tornou-se possível à observação dos efeitos da radiação sobre pequena região do núcleo. Este aparelho possibilita a irradiação com um feixe de 2 a 8 μ de UV ou prótons.

Quando uma parte do cromossomo for irradiada poderá ser observado um fenômeno chamado *paling*, que é a mudança de cor preta para cinzenta ou transparente, no microscópio com contraste de fase. Esse fenômeno pode ser observado em quase todos os cromossomos das células tanto em divisão como em repouso. O fenômeno começa alguns minutos após a irradiação e aumenta em até três vezes o diâmetro do feixe de *micro beam* aplicado.

Há indícios da perda da histona pela radiação em cromossomos, pois eles não mais se coraram na região irradiada, além do aumento da viscosidade (*stickiness*) devido à despolimerização do cromossomo.

Geralmente pode ser observado 1 a 2 nucléolos numa célula somática em repouso. Nas células metabolicamente ativas podem ser observados maiores nucléolos e acredita-se que o nucléolo tem papel importante no armazenamento de RNA e proteína.

Às vezes pode ser observado aumento do número de nucléolos nas células irradiadas. O crescimento do número de nucléolos é um fenômeno ainda desconhecido. Quanto às mitocôndrias pode-se dizer que são

muito sensíveis a irradiação. Após irradiação foi verificado uma redução rápida no número de mitocôndrias, porém esse número foi recuperado cerca de 6 a 8 horas após. Entretanto a forma dessa organela é que fica alterada e torna-se mais alterada quanto maior for a dose da irradiação. O fuso de divisão celular diminuiu sensivelmente após a irradiação com UV e foi constatado que a irradiação na prometafase e metáfase causou o desaparecimento parcial do fuso. A irradiação com *micro beam* no citoplasma próximo a região do fuso acromático, impediu a sua formação e quando a irradiação ocorreu antes da formação do fuso, esse não se formou. O desaparecimento ou não formação do fuso é devido à ação indireta da radiação, pois ela forma produtos tóxicos para a célula.

Foi observado que a modificação do fuso é acompanhada pela modificação dos cromossomos. Se o fuso de cada lado do plano equatorial sofre danos, os cromossomos também sofrem, porém se a irradiação atingiu apenas um lado do plano, apenas esse lado fica prejudicado, podendo formar-se células sem núcleo.

## 8. A mutação induzida e o melhoramento de plantas

Atualmente, pouco se comenta sobre o uso de mutações induzidas no melhoramento de planta, provavelmente porque é da área da pesquisa básica e que tem pouco aproveitamento na área aplicada. Entretanto muitos pesquisadores dão continuidade aos seus trabalhos de busca de variações genotípicas em plantas com a mutação induzida, seja derivada de radiação, seja com uso de mutagênicos. O pouco uso das mutações induzidas comentado deve-se ao fato da casualidade das mutações além do que as induções afetam mais genes qualitativos do que quantitativos, ou seja, o efeito produzido nas características qualitativas é mais imediato do que nas quantitativas. Características como cor de tegumento, da folha, do caule, da flor são governadas por um ou poucos genes, por isso a alteração de um ou dois genes modifica logo o fenótipo. Porém, as características poligênicas, ditas quantitativas são governadas por vários genes sujeitos ainda a ação ambiental. Por isso a modificação de um gene não afeta o fenótipo total, ou seja, a maior produção esperada de grão, por exemplo.

Para que haja seleção é necessária variabilidade genética, pois genótipos diferentes se manifestando poderão ser selecionados. O triticale, por exemplo, é uma cultura alopoliploide derivada da reunião de cromossomos de *Triticum aestivum* com os de *Secale cereale*, porém é de autoreprodução e tendendo, seus genes, para a homozigose e estreitando sua base genética. Por isso sementes de triticale foram submetidas à radiação com raios gama e plantadas. Já na geração M<sub>1</sub> foram encontrados mutantes quanto ao ciclo vegetativo. O ciclo vegetativo normal do triticale está entre 85 a 100 dias que estão distribuídos em três classes distintas, porém a média dos mutantes ficou entre 88 a 116 dias distribuídos em cinco classes distintas (PANDINI et al., 1997).

Essa variação permite que haja seleção quanto ao tempo, pois o número de classes aumentou e a variabilidade genotípica foi adicionada. Na área de floricultura a mutação induzida, apesar de ter alto custo, pode ser aplicada com vistas a obter maior variabilidade fenotípica. Em crisântemos (*Dendrathera grandifolia* Tzvelev) foram aplicadas várias doses de raios gama a partir da fonte de cobalto 60 sobre mudas enraizadas. A finalidade foi a de obter mutantes de coloração. Podas repetidas foram realizadas como prática cultural e para ampliar os setores mutados. Das plantas analisadas vinte e cinco apresentaram mutações de coloração e quinze mutações de formato de inflorescência. Isso evidenciou um aumento da variabilidade genética e abriu espaço para utilizar a técnica para obter variantes de flores (LATADO e TULMANN Neto, 1998).

A aveia (*Avena sativa* L.) é uma planta autógama que necessita de aumento de variabilidade com vistas à seleção para um ideotipo agrônomico que permite resistência à moléstias e conseqüente incremento de seu cultivo e exploração econômica. Porém, dado sua forma de reprodução, levando cultivares a homozigose com estreita base genética, e que a hibridação artificial é difícil, a indução de mutações é a técnica que permite incrementar variabilidade, para ser usada pelo melhorista, principalmente nas características adaptativas.

Baseado nisso genótipos de aveia foram submetidos a doses crescentes de mutagênico físico, e a partir de 100 Gy, houve reduções nas médias e incremento nas variâncias para a característica estatura de planta, o que revela grande potencial de progresso genético. Esses resultados indicam que, para a característica estudada, o uso de mutagênico é recomendável. Todavia, para ciclo vegetativo, igualmente estudado, não houve resposta similar (NASCIMENTO JÚNIOR et al., 1990).

Para as características germinação de sementes, estatura de plantas e sobrevivência das plantas, não houve resposta positiva de incremento de variância (COIMBRA et al., 1999).

Nesse ponto percebe-se que a estatura de planta foi objeto de estudo de ambas as pesquisas. No primeiro houve resposta positiva pelo incremento da variância, porém no segundo a resposta não foi à mesma. A explicação para esse fato está no uso de genótipos e mutagênicos diferentes, portanto se esperaria respostas diferenciadas. Além disso, a casualidade das mutações sempre está presente. Mesmo que fossem genótipos iguais e mutagênicos diferentes a resposta, para a característica estatura de planta, seria diferente; se fosse genótipos diferentes e mutagênicos iguais, esperar-se-ia o mesmo resultado. Na possibilidade de se ter genótipos e mutagênicos iguais, mesmo assim, a resposta poderia ser diferente, devido às condições ambientais em que ambos os tratamentos foram realizados.

Variabilidade natural também pode ocorrer reforçando a possibilidade da ocorrência de mutações espontâneas nas culturas. Foi o que aconteceu com uma linhagem pura de aveia plantada nos EUA em que plantas da cultura apresentavam suscetibilidade à ferrugem da folha com exceção de duas plantas na linha que se mostraram totalmente resistente a mesma doença. A observação do pesquisador permitiu a seleção das plantas resistentes e que fosse criada a cultivar UFRGS 16, no Brasil. Após ciclos de seleção para adaptação dessas, as condições do Rio Grande do Sul, a cultivar foi explorada economicamente (FEDERIZZI et al., 1999).

## 9. Conclusões

As mutações induzidas servem ao melhoramento de plantas desde 1927 quando Muller mostrou em *Drosophila* que raios X poderiam induzir variações genéticas reconhecíveis das que ocorriam naturalmente (ALLARD, 1971) e servirão, tendo sempre como objetivo o aumento da base genética dos organismos, no caso, as plantas. Material tratado e avaliado será para o melhorista uma fonte de elementos suscetíveis de avaliação e seleção. Para a área básica serve como estudo das características no que diz respeito às modificações propriamente ditas (efeitos fisiológicos e morfológicos), onde poderão ser avaliados os locais, no DNA, que se modificaram pelas técnicas avançadas de eletroforese. Serve, igualmente, ao estudo da herança das modificações cromossômicas e, por fim, para obtenção de plantas mais produtivas e com variações fenotípicas desejáveis.

## 10. Referências Bibliográficas

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo. Edgard Blucher Ltda., 1971. p.356-364.

BOYLE, W.S. Cytogenetic effects of benlate fungicide on *Allium cepa* and *Secale cereale*. **The journal of Heredity**.

BRUTTI, M.R.; NEVES, L.A.S. **Estudo dos efeitos fisiológicos do ácido dimetil sulfóxido e do ácido ciclopentilideno-bis (Tioglicólico) em *Phaseolus vulgaris* L. cv Rico 23 e Cavallo branco**. Monografia de Especialização. Curso de Especialização em Biologia/UFSM/CCNE/DB 1992. p.101.

BRUTTI, M.R.; NEVES, L.A.S. Estudo dos efeitos fisiológicos do ácido ciclopentilideno-bis (Tioglicólico) - ACPTG em *Phaseolus vulgaris* L. cv Rico 23 em três concentrações. **Ciência e Natura**, Santa Maria v.16, p. 57-61, 1994.

CHAUCHAN, L.K.S; DIKSHITH, T.S.S. e SUNDARARHMAN, V. Effect of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. **Mutation Research**. Elsevier, v.171, n.1, p.25-30, 1986.

COIMBRA J.L.M.; MARCHIORO, V.; LONRECETTI, C. et al. Comparação dos efeitos de agentes mutagênicos na geração M<sub>1</sub> em genótipos fixos de aveia (*Avena sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.5, n.1, p.12-18, 1999.

EBERLEIN, C.V.; GUTTIERI, M.J.; BERGER, P.H. et al. Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. **Weed Science**, v.47, p. 383-392, 1999.

FEDERIZZI, L.C.; MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. et al. Melhoramento da Aveia. In.: BORÉM, A. (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV. 1999. p. 131-157.

HEAP. Ian *Avena sterilis*. Internation Survey of Herbicide – Resistance Weeds. Disponível em <http://weedsociety.com/> Capturado online em 16.03.2000.

KARNOPP, L.; COSTA, F.L.C.; LOEK, A.E.; AMARAL, C.O. Efeitos fisiológicos de inseticidas piretróides em cevada (*Hordeum vulgare* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.3, n.1, p.5-9, 1997.

KARNOPP, L.; COSTA, F.L.C.; LOEK, A.E.; AMARAL, C.O. Efeitos citológicos de inseticidas piretróides deltametrina em cevada (*Hordeum vulgare* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.5, n.2, p.131-134, 1999.

KLEIN, M. C-mitotic action of the insecticide ambush 25EC in *Allium cepa*. **Genetica Polonica**, v.31, n.2, p.107-113, 1990.

LATADO, R.R.; TULMANN NETO, A. Use of gamma-rays to induce color mutations in chrysanthemum cv White tinsel. **Multiciência**. São Carlos, v.3, p. 139-149, 1998.

MORAES-FERNANDES, M.I.; ZANETTINI, M.H.B.; GUERRA, M.S. et al. Instabilidade cromossômica e adaptação em trigo. In.: AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MARTINS, P.S. e BANDEL, G. (eds.) **Tópicos de citogenética e evolução de plantas**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Genética. 1984. p.69-110.

NASCIMENTO JÚNIOR, A.; CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA NETO, J.F.; FEDERIZZI, L.C. Agentes mutagênicos e a intensidade de variabilidade genética em caracteres adaptativos na cultura da aveia (*Avena sativa* L.) **Agrociência Sulriograndense**. Porto Alegre, v.26, n.2, p.199-216, 1990.

PANDINI, F.; CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA NETO, J.F. Uso de mutações induzidas e cruzamentos recíprocos no incremento da variabilidade genética para o caráter ciclo vegetativo em triticale. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.27, n.2, p.201-206, 1997.

RAO, B.V.; SHARMA, C.B.S.R.; RAO, B.G.S. Cytological effects of organophosphorus insecticides on *Allium cepa* root meristems. **Cytologia**. Tokyo, v.52, p. 365-371, 1987.

RAO, B.V.; RAO, B.G.S. e SHARMA, C.B.S.R. Cytological effects of herbicides in insecticides on *Allium cepa* root meristems. **Cytologia**. Tokyo, v.53, p. 255-261, 1988.

SERENO, M.J.C.M.; MORAES-FERNANDES, MIB.; ZANETTINI, MHB. Effects of pesticides, fungal diseases and pests on the meiotic behavior of wheat. **Revista Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto, v.4, n.4, p. 593-609, 1981.

STRICKBERGER, M.W. **Evolution**. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 1990. p.192-194.

TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M.; ANDO, A. Indução de mutação no melhoramento do feijão. I Reunião Nacional de Pesquisa em Feijão. **Anais**. Piracicaba, São Paulo. p.25-28, 1982.

TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M.; ANDO, A.; SABINO, J.C. Indução e uso de mutante de hábito determinado e precoce em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.4. p.425-430, 1994.

## Exercícios

- Que tipo de mutação é mais prejudicial ao indivíduo que a possui: (Justifique as respostas).
  - Transversão ou Transição?
  - Deleção ou duplicação em tandem?
  - Deleção ou inversão?
- Baseado no exercício 6 da unidade 1, considerando a fita sense, a que inicia por ADENINA na extremidade 5', se ocorrer uma deleção na 5ª base e a adição de uma citosina imediatamente após o 23º desoxirribonucleotídeo, qual será a cadeia polipeptídica a partir desse DNA mutado? (Considere que os introns não sejam alterados). **R:** Tirosina – ponto final – alanina – tirosina – serina – serina.
- Tendo a seguinte sequência de DNA – **TACTAGTAATGACTACGACTGATC**.
  - O seu RNA<sub>m</sub> será constituído de que nucleotídeos? **R:** RNA<sub>m</sub> - AUGAUCAUUACUGAUGCUGACUAG;
  - A proteína será constituída de quais resíduos de aminoácidos? **R:** Resíduos da proteína - Met – Iso – Iso – Treo – Asp – Ala – Asp – P.F.
  - Se houver a inclusão, por ação de mutagênicos do nucleotídeo de Adenina entre o quarto e o quinto nucleotídeo, de quais resíduos será formada da cadeia proteica? **R:** Resíduos da proteína Met – Iso – His – Tir – P.F. – Cis – P.F. – Leu
  - Esta mutação de ponto alterou a estrutura primária de cadeia de proteína? **R:** Sim.
- O filamento de DNA abaixo descrito servirá de informação para a produção de uma proteína específica que determinará o aparecimento da cor verde nas folhas. Entretanto, foram detectadas variações dessa sequência de DNA como a alteração do 6º nucleotídeo que é A ao invés de G e no 18º que é A ao invés de C. Essa proteína alterada também condiciona cor verde nas folhas.

### TACGTGTCCAACCTTGGCCGTAATC

- De quais resíduos de aminoácidos são constituídas ambas as cadeias de proteína. **R:** Cadeia de proteína normal - Met – Arg – Leu – Asp – Arg – His – P.F. | Cadeia de proteína mutante - Met – Arg – Leu – Asp – Arg – His – P.F.
  - Mostre o que está acontecendo e relacione com as propriedades do código genético. **R:** As cadeias não se alteraram devido à propriedade de redundância do código genético.
- Considerando um segmento normal com vários genes no DNA abaixo, construa:

A	B	C	D	E	F	G	H
---	---	---	---	---	---	---	---

    - Uma deleção. **R:** ABDEFGH
    - Uma duplicação em tandem. **R:** ABCDCDEFGH
    - Uma duplicação invertida. **R:** ABCDEFEGH
    - Uma inversão. **R:** ABCDEFHG
    - Uma transposição simples e construindo outro segmento de DNA faça uma transposição recíproca. **R:** ABCDEFG1 (outro cromossomo) – 2345678910 | ABCD123 (outro cromossomo) – 45678910EFGH
    - Construa para cada segmento uma sequência de DNA com nucleotídeos e faça as alterações (A) e (B).
    - Combine (C) e (D) e faça com em (F).
  - Em milho (*Zea mays*) a taxa de mutação de alguns genes foram estabelecidas. Se o gene Sh (endosperma normal muta) para sh (shrunken – endosperma contraído) numa velocidade de 0,0012/100.000 gametas, qual será a quantidade de plantas mutantes que poderão aparecer numa população de 50.000 plantas. (Considere que cada planta produza 1 milhão de gametas). **R:** 6 plantas.
  - Foram analisados 2 milhões de grãos de pólen de plantas de milho onde o gene C para endosperma colorido estava presente. Percebeu-se que vários grãos de pólen apresentavam uma mutação para o alelo c (endosperma incolor). Considerando que a taxa de mutação desse gene é de 0,23/100.000 gametas, quantos grãos de pólen terão a mutação estudada? **R:** aproximadamente 5 plantas.



8. Considerando as informações constantes na tabela 4.5 verifique qual o resultado fenotípico do cruzamento de plantas com os seguintes genótipos:
- AACCRPP x aaccrrpp; **R**: roxo
  - AACCRPP DtDt x aaccrrpp; **R**: variegada de roxo
  - AACCRpp dtdt x aaccrrPP DtDt; **R**: variegada de roxo