

ALTERAÇÕES CLOROFILIANAS, MORFOLÓGICAS E DA COR DO TEGUMENTO DAS SEMENTES INDUZIDAS POR ETIL- METANOSSULFONATO EM *Phaseolus* *vulgaris* L.CV. OURO¹

Pedro Crescêncio S. Carneiro²
Hélio Morais Barbosa²
Clibas Vieira³

1. INTRODUÇÃO

Em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), os mutantes resistentes a doenças (5, 11, 17) e os com tegumento de cores variadas (1, 2, 10, 15, 18), em sua maioria obtidos de variedades de sementes pretas, são, atualmente, os principais resultados da mutagênese como técnica de melhoramento.

A variedade 'Ouro' apresenta boas características agronômicas, mas a cor creme de suas sementes é comercialmente pouco desejada na maioria das regiões brasileiras. Essa característica pode ser consequência de mutação em um ou mais locos que atuam na biossíntese de pigmentos mais escuros. Em geral, quanto maior for o número de dominantes mais escuro será o tegumento da semente. Como, em sua maioria, as mutações são recessivas, espera-se que a probabilidade de se induzir mutantes da cor do grão na variedade 'Ouro' seja menor que naquelas com sementes pretas.

¹Parte da tese de mestrado em Genética e Melhoramento apresentada à Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo primeiro autor.

Aceito para publicação em 02.12.1994.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa.

As mutações espontâneas, ou induzidas, podem ser consequência de: (a) adição, deleção ou substituição de nucleotídeos; (b) aberrações cromossômicas, como deficiências; e (c) inserção de transposons em alelos normais. Se elementos transponíveis estiverem envolvidos na determinação da cor creme do tegumento da variedade 'Ouro' e se etilmetanossulfonato (EMS) pode induzir a ativação destes elementos no tegumento, como proposto por BARBOSA e GUIMARÃES (4), seria conveniente tentar induzir mutantes do tipo carioca nessa variedade. Caso estes tipos mutantes sejam induzidos, eles teriam interesse prático, dada sua maior aceitação comercial, e forneceria evidência indireta a favor da ativação de transposons pelos mutagênicos em feijão.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a mutagenicidade do etilmetanossulfonato (EMS) na variedade 'Ouro'.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As concentrações de 0 (controle), 0,125; 0,250; 0,375; e 0,500% EMS (v/v) foram aplicadas em cinco grupos de 300 sementes, da variedade 'Ouro', previamente colocadas para germinar em rolo de papel, à temperatura de 28°C, por 24 horas. Todas as sementes utilizadas originaram-se da multiplicação das sementes de uma única planta. As soluções de EMS foram preparadas em tampão fosfato, 0,02 M, pH 7,0. O grupo de sementes-controle foi submetido apenas à solução-tampão. Cada grupo de sementes foi colocado em frasco Erlenmeyer (500 ml) juntamente com 200 ml da respectiva solução. Os frascos foram vedados com papel laminado e submetidos à agitação em agitador "Burrel Wrist-Action" por 6 horas à temperatura ambiente (aproximadamente 24°C). Após tratadas, as sementes foram lavadas em água corrente durante 30 minutos, secadas sobre papel-toalha e plantadas em solo úmido, no campo experimental do Setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com seis repetições, tendo cada parcela sido constituída de duas fileiras de 5 m, com intervalo de 50 cm entre elas. O espaçamento entre as sementes na fileira foi de 20 cm.

A geração de plantas de propagação sexuada, proveniente diretamente de sementes tratadas, é denominada M₁ e produz sementes M₂. As plantas provenientes das sementes M₂ são da geração M₂ e produzem sementes M₃, e assim por diante.

A geração de plantas M₂ foi obtida plantando-se, em cada fileira, no mínimo 10 e no máximo 70 sementes de cada planta M₁, dependendo da disponibilidade de sementes. Para efeito de comparação, 52 fileiras (com 70 sementes cada), provenientes de plantas originadas do grupo-controle, foram igualmente distribuídas na área. O espaçamento foi o mesmo utiliza-

do na primeira geração. Após a germinação, determinou-se a ocorrência de mutantes clorofilianos e da cor do hipocótilo. Durante o desenvolvimento das plantas M_2 , foram anotados e descritos os variantes morfológicos e os mutantes da cor das flores. Cada fileira foi colhida separadamente e as plantas foram trilhadas manualmente, abrindo-se de cinco a seis vagens, por planta, para serem anotados e descritos os prováveis mutantes da cor e do brilho dos grãos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Mutantes Clorofilianos*

Os mutantes clorofilianos limitaram-se aos fenótipos "albina" (plântula branca) e "xantha" (plântula amarela) (Quadro 1). Foi evidente a predominância de "xantha". Isso indica haver mais locos capazes de mutar originando o fenótipo "xantha". Neste trabalho, não foi detectado o fenótipo "viridis" (planta verde-clara), de ocorrência comum em outros cultivares, após o tratamento com EMS (3) ou radiação gama (1, 16, 18). A cor verde mais clara das folhas da variedade 'Ouro' pode ter dificultado a detecção de "viridis". Verifica-se, pelo Quadro 1, que apenas as concentrações 0,125 e 0,250% EMS induziram mutantes clorofilianos e que a frequência deles, calculada com base no número de sementes tratadas, ou no número de plantas M_1 sobreviventes, foi sensivelmente reduzida, quando foi usada a concentração 0,250%. As frequências de progênies M_2 segregantes, derivadas de plantas M_1 oriundas de sementes tratadas com 0,125% (7,67% das sementes tratadas e 11,79% das plantas M_1 sobreviventes) são comparáveis, respectivamente, às frequências 8,33% e 11,21%, obtidas quando BARBOSA *et alii* (3) trataram a variedade 'Milionário 1732' com 0,250% EMS, indicando maior sensibilidade relativa da variedade 'Ouro' ao EMS. Deste modo, os resultados aqui obtidos indicam que as concentrações foram relativamente altas para a variedade 'Ouro', em acordo com os resultados relatados por CARNEIRO (6) para a geração M_1 .

3.2. *Variantes Morfológicas*

Variações morfológicas de diversos tipos foram encontradas na geração M_2 , as quais incluem: ausência de flores, ou flores com estruturas deformadas, que resultaram em esterilidade; vagens anormais; planta anã, resultante do encurtamento dos entrenós; ausência de ramificação; ramificação exagerada, associada com entrenós curtos, causando o envassouramento; e anormalidades foliares (três folhas cotiledonares, folhas compostas de um, dois, quatro e cinco folíolos e várias modificações na morfologia

QUADRO 1 - Frequência de progênies M₂ que segregaram mutantes clorofilianos

Concentração de EMS (% v/v)	Número de plantas M ₁ sobreviventes	Nº	Progênies M ₂ segregantes		Tipo mutante					
			% em relação ao número de sementes tratadas	plantas M ₁	Nº	% em relação ao total	Albina	Nº	% em relação ao total	Xantha
0	52 ¹	0	---	0	0	0	0	0	0	0
0,125	195	23 ³	7,67	11,79	5	21,74	21	91,30		
0,250	66	3	1,00	4,50	0	0	3	100,00		
0,375	13	0	0	0	0	0	0	0		
0,500	2	0	0	0	0	0	0	0		

¹ O número de plantas M₁ do controle constitui uma amostra.

² Irrelevante, pois uma amostra de 52 plantas M₁ foi usada para originar a população M₂ controle.

³ Três progênies M₂ segregaram os dois fenótipos mutantes (*xantha* e *albina*).

dos folíolos). As anormalidades foliares ligadas ao número de folíolos foram observadas somente na primeira folha trifoliolada, como observado por PAULA (16). Apenas os tratamentos com 0,125 e 0,250% EMS (Quadro 2) induziram variantes morfológicas, confirmando a maior sensibilidade da variedade 'Ouro' ao EMS, pois, com a variedade 'Milionário 1732', CARNEIRO (5) obteve esses tipos variantes também nos tratamentos com concentrações superiores a 0,250% EMS. Conforme foi observado com os mutantes clorofilianos (Quadro 1), a maior frequência de anomalias morfológicas (Quadro 2) foi obtida com 0,125% EMS.

Percebe-se, pelo Quadro 2, que duas plantas M_1 , provenientes de sementes submetidas apenas à solução-tampão, segregaram variantes morfológicas em M_2 . Baixa frequência de anomalias morfológicas foi também encontrada por SENA e BARBOSA (19) em população não-tratada (controle) da variedade 'Milionário 1732'. Isto, entretanto, não era esperado neste trabalho, pois as sementes utilizadas eram descendentes de uma única planta na tentativa de eliminar possível variabilidade. Assim, a ocorrência de variantes morfológicas no controle dá suporte à hipótese de SENA e BARBOSA (19) de que baixas doses, ou concentrações do mutagênico, ou fatores ambientais não-detectados podem provocar danos celulares que afetam o desenvolvimento da planta. Esses autores propuseram que, em sua maioria, as modificações morfológicas encontradas no feijoeiro na geração M_2 sejam provocadas por danos causados pelos mutagênicos em componentes citoplasmáticos. Isto levaria a esperar a ocorrência dessas anomalias na geração M_1 , o que não tem sido observado em feijoeiro (5, 8, 16, 19). SENA e BARBOSA (19) sugeriram que deve haver alguma(s)

QUADRO 2 – Frequência de progênies M_2 que segregaram variantes morfológicas

Concentração de EMS (% v/v)	Número de plantas M_1 sobreviventes	Progênies M_2 que segregaram variantes morfológicas		
		Nº	% em relação ao número de sementes tratadas	
				plantas M_1
0	52 ¹	2	---	3,85
0,125	195	56	18,67	28,70
0,250	66	15	5,00	22,73
0,375	13	0	0	0
0,500	2	0	0	0

¹ O número de plantas M_1 do controle constitui uma amostra.

² Irrelevante, pois uma amostra de 52 plantas M_1 foi usada para originar a população M_2 controle.

substância(s) nas sementes do feijoeiro que possibilite(m) o desenvolvimento morfológico normal na geração M_1 .

3.3. *Mutantes da Cor do Tegumento*

Apenas três plantas M_1 , todas oriundas de sementes tratadas com 0,125% EMS, segregaram mutantes da cor do tegumento na geração M_2 (Quadro 3). A frequência dessas plantas (1,00% das sementes tratadas ou 1,53% das plantas M_1 sobreviventes) foi superior à frequência das plantas M_1 que segregaram mutantes da cor do tegumento, obtida por BARBOSA *et alii* (2), após aplicarem a mesma concentração de EMS na variedade 'Milionário 1732', o que indica bom potencial de mutabilidade da variedade 'Ouro'. Entretanto, foi inferior à frequência (2,33% das sementes tratadas ou 3,13% das plantas M_1 sobreviventes) obtida por aqueles autores com a concentração 0,250% de EMS. Isto, outra vez, confirma a maior sensibilidade relativa da variedade 'Ouro' ao EMS. Foram obtidas somente três plantas mutantes da cor do tegumento (Quadro 3), uma em cada uma das três progênies M_2 segregantes. Duas delas produziram sementes com tegumento brilhante de cor creme-escura, com listras marrons de formato variado (tipo variegado); e a outra produziu sementes com diferentes intensidades de pigmentação, desde cinza-creme-claro até cinza-escuro, o que raramente se observa em uma única planta.

Em relação ao hábito de crescimento e à morfologia geral da planta, os mutantes obtidos foram semelhantes à variedade original. Os dois mutantes do tipo variegado também não diferiram da variedade original quanto à cor do hipocótilo e das flores. No entanto, o mutante com intensidade variável de pigmentação, obtido na progênie 85 (Quadro 3), apresentou hipocótilo vermelho e flores de coloração rósea. Não foi registrado, entre as plantas M_2 , nenhum outro caso de mudança da cor do hipocótilo ou das flores.

Recentemente, Bhattacharyya *et alii* (1990), citados por HEIM (9), mostraram que a inserção de elemento transponível, em alelo normal, foi o mecanismo que produziu o alelo mutante responsável pelas sementes rugosas (fenótipo recessivo) das ervilhas de Mendel. É possível que tal mecanismo seja responsável pela cor creme do tegumento da variedade 'Ouro', ou seja, a inserção de elemento transponível em algum gene, envolvido na biossíntese dos pigmentos de cor escura, causaria bloqueio na ação do gene, resultando no fenótipo creme. A ativação destes elementos, pelo EMS, como proposto por BARBOSA e GUIMARÃES (4), poderia resultar no fenótipo variegado. Este é também o fenótipo comumente apresentado em milho, em razão da ativação de elementos transponíveis (12, 13, 14, 20). Entretanto, transposons análogos ao do sistema "supressor-mutator" (Spm)

QUADRO 3 - Frequência de progênies M₂ que segregaram mutantes da cor do tegumento e segregação dos mutantes

Concen- tração de EMS (% v/v)	Número de plantas M ₁ sobre- vives	N°	Progênies M ₂ que segregaram mutantes da cor do tegumento		Identificação da progênie M ₂	Número de plantas M ₂		Cor do tegumento mutante
			% em relação ao número de sementes tratadas	plantas M ₁ sobreviventes		normal	mutante	
0,125	195	3	1,00	1,53	L-25	7	1 ¹	Creme-escuro com listras mar- rons de formato variado
					L-40	9	1 ¹	Creme-escuro com listras mar- rons de formato variado
					L-85	10	1	Diferentes inten- sidades de pig- mentação (desde cinza-creme-claro até cinza-escuro)

¹Apresentaram brilho no tegumento.

em milho (7, 13) também poderiam produzir variação contínua de cores, semelhante à obtida na progênie 85.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Sementes de feijoeiro da variedade 'Ouro' (de tegumento creme), em germinação, foram tratadas com EMS nas concentrações de 0 (controle), 0,125; 0,250; 0,375; e 0,500% (v/v), objetivando avaliar a mutagenicidade do EMS, principalmente, quanto a alterações clorofilianas, morfológicas e da cor do tegumento.

A maioria dos mutantes clorofilianos e das alterações morfológicas e todos os mutantes da cor do tegumento foram induzidos com 0,125% EMS.

Dos três mutantes do tegumento, dois eram de cor creme-escura com listras marrons de formato variado. O outro tinha tegumento com intensidade variável de pigmentação (de cinza-creme-claro a cinza-escuro). Considerando o controle genético da cor do tegumento da semente, que associa cores mais escuras com maior número de alelos dominantes, e que, em sua maioria, as mutações induzidas são recessivas, é possível que os mutantes da cor do tegumento obtidos tenham resultado da ativação, pelo EMS, de transposons latentes.

5. SUMMARY

(CHLOROPHYLL, MORPHOLOGICAL, AND SEEDCOAT COLOR CHANGES INDUCED BY ETHYL-METHANESULPHONATE IN *Phaseolus vulgaris* L., CV.OURO)

Germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Ouro, with cream seedcoat, were treated with 0 (control), 0.125, 0.250, 0.375, and 0.500% EMS solutions. Most of the chlorophyll mutants and morphological deviates, and all three seedcoat color mutants were induced with 0.125% EMS. The color of two seedcoat mutants was dark cream with brown stripes of varying shapes. The other mutant was self-colored with different degrees of pigmentation (from light to dark gray). The possibility that the seedcoat mutants derive from the activation, by EMS, of latent transposons is discussed.

6. LITERATURA CITADA

1. AL-RUBEAI, M.A.F. Radiation induced mutations in *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Bras. Genet.*, 3:503-515. 1982.

2. BARBOSA, H.M.; CARNEIRO, J.E.S. & VIEIRA, C. Ethyl metanesulfonate-induced seedcoat mutants in *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Bras. Genet.*, 11:123-128. 1988.
3. BARBOSA, H.M.; CARNEIRO, J.E.S. & VIEIRA, C. Ethyl methanesulfonate-induced mutations in *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Bras. Genet.*, 11:699-705. 1988.
4. BARBOSA, H.M. & GUIMARÃES, M.A. Inheritance of self-colored and striped seedcoat mutants induced in *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Bras. Genet.*, 12:581-588. 1989.
5. CARNEIRO, J.E.S. *Indução de mutações em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) por radiação gama e etil-metanossulfonato*. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1986. 56p. (Tese M.S.).
6. CARNEIRO, P.C.S. *Indução de mutações em Phaseolus vulgaris L., cv. Ouro, com etil-metanossulfonato*. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1994. 47p. (Tese M.S.).
7. FEDOROFF, N. Transposable genetic elements in maize. *Sci. Amer.*, 250:65-75. 1984.
8. GENTER, C.F. & BROWN, H.M. X-ray studies on the field bean. *Jour. Hered.*, 32:39-41. 1941.
9. HEIM, W.G. What is a recessive allele? *Amer. Biol. Teacher*, 53:94-97. 1991.
10. HUSSEIN, H.A.S. & DISOUKI, I.A.M. Mutation breeding experiments in *Phaseolus vulgaris* (L.) I. EMS and gamma-ray-induced seed coat colour mutants. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 76:190-199. 1976.
11. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. *Induced mutations for disease resistance in crop plants II*. Vienna, 1983. 150 p.
12. McCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 16:13-47. 1951.
13. McCLINTOCK, B. The control of gene action in maize. *Brookhaven Symp. Biol.*, 18:162-184. 1965.
14. McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 226:792-801. 1984.
15. MOH, C.C. Mutation breeding in seed-coat colors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 20:119-125. 1971.
16. PAULA, C.C. *Estrutura química de feijoeiros (Phaseolus vulgaris L.) provenientes de sementes tratadas com radiação gama*. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1992. 57p. (Tese M.S.).
17. RIBEIRO JR., J.I.; BARBOSA, H.M. & ZAMBOLIM, L. Resistência a *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. em mutantes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Ceres*, 40:305-313. 1993.
18. SENA, J.S.P. *Indução de mutações em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) com radiação gama*. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1990. 60p. (Tese M.S.).
19. SENA, J.S.P. & BARBOSA, H.M. Chlorophyll and morphological changes induced by gamma rays in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Ceres*, 39:84-89. 1992.
20. WALBOT, V. Reactivation of the mutator transposable element system following gamma irradiation of seed. *Mol. Gen. Genet.*, 212:259-264. 1988.