

GERHARD BANDEL

ENGENHEIRO - AGRÔNOMO

Instrutor junto à Cadeira n.º 19 (Citologia e Genética) da Escola  
Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», com exercício no  
Instituto de Genética

# METODOLOGIA DA INDUÇÃO DE MUTAÇÕES EM EUCALIPTO

Tese apresentada à Escola Superior  
de Agricultura «Luiz de Queiroz», da  
Universidade de São Paulo, para obten-  
ção do título de «Magister Scientiae».

Piracicaba - São Paulo  
1970

À minha esposa e

aos meus pais

dedico este trabalho

## AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar os nossos agradecimentos a todos aquêles que contribuíram para a realização dêste trabalho, especialmente às seguintes pessoas:

Prof. J.T.A.Gurgel, nosso orientador, pelo incentivo que nos proporcionou durante o desenvolvimento da pesquisa e pela revisão desta tese.

Prof. A.Blumenschein, diretor do Instituto de Genética, pelo incentivo e facilidades concedidas, sem o que teria sido impossível a realização dêste trabalho.

Prof. R.Vencovsky, pelas sugestões e críticas construtivas nos aspectos da análise estatística.

Srs. A.Cangiani e L.Próspero, funcionários do Instituto de Genética, pelo auxílio na coleta dos dados.

Srs. J.Zandoval, W.Bortolazzo e J.Broglio, pela colaboração na impressão desta tese.

•••

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1. Efeitos da radiação gama .....	3
2.2. Efeitos dos mutagênicos químicos .....	6
2.3. A radiosensitividade e o volume nuclear .....	11
2.4. A obtenção de mutantes na geração $M_1$ .....	13
3. MATERIAL .....	14
4. MÉTODO .....	16
4.1. Efeitos da radiação gama .....	16
4.1.1. Efeitos da radiação gama sobre a sobrevivência das plantas .....	17
4.1.2. Efeitos da radiação gama sobre o desenvolvimento das plantas .....	19
4.2. Efeitos dos mutagênicos químicos .....	20
4.3. A radiosensitividade e o volume nuclear .....	23
4.4. A obtenção de mutantes na geração $M_1$ .....	24
5. RESULTADOS OBTIDOS .....	26
5.1. Efeitos da radiação gama .....	26
5.1.1. Efeitos sobre a sobrevivência das plantas ..	26
5.1.2. Efeitos sobre o desenvolvimento das plantas .....	28
5.2. Efeitos dos mutagênicos químicos sobre a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas .....	30
5.2.1. Efeitos do óxido de etileno .....	31
5.2.2. Efeitos da etileneimina .....	32
5.2.3. Efeitos do sulfato de dietilo .....	33

5.2.4. Efeitos do metanosulfonato de etilo .....	34
5.2.5. Efeitos da epícloridrina .....	35
5.3. A radiosensitividade e o volume nuclear .....	36
5.4. A obtenção de mutantes na geração $M_1$ .....	37
6. DISCUSSÃO.....	40
6.1. Efeitos da radiação gama .....	40
6.2. Efeitos dos mutagênicos químicos .....	42
6.3. A radiosensitividade e o volume nuclear .....	45
6.4. A obtenção de mutantes na geração $M_1$ .....	46
7. RESUMO E CONCLUSÕES .....	49
8. SUMMARY .....	53
9. LITERATURA CITADA .....	56
10. TABELAS E FIGURAS .....	59

•••

## 1. INTRODUÇÃO

A indução de mutações constitui um método de melhoramento relativamente recente; o emprêgo de mutações induzidas é recomendado quando novos caracteres que precisam ser introduzidos não ocorrem nas populações naturais ou quando se deseja aumentar a variabilidade genética em populações já estabilizadas.

Com o aumento das mutações induzidas por agentes mutagênicos, a probabilidade de se encontrar mutações de valor econômico também aumenta.

Muitos trabalhos já realizados indicam a possibilidade de o melhorista vir a lançar mão da mutação induzida nos seus programas de melhoramento. Algumas variedades de plantas cultivadas obtidas por êste método são empregadas atualmente na Agricultura, o que pode ser constatado nos trabalhos de DUBININ (1964) e CARVALHO, MÔNACO e KRUG (1966).

Os povoamentos de eucalipto apresentam geralmente uma grande variabilidade natural. A indução de mutações no eucalipto é recomendada para que sejam introduzidos novos caracteres que não ocorrem nas populações existentes.

As pesquisas com a indução de mutações em essências florestais ainda estão em fase inicial; poucos resultados positivos são conhecidos até a presente data, pois o período de rotação das espécies florestais é longo, o que afasta muitos pesquisadores dêste campo.

O eucalipto apresenta algumas características que poderiam ser melhoradas, tais como: comprimento de fibra, rachamento da madeira, resistência ao frio etc.. A mutação induzida talvez possa ajudar nesse sentido.

Em vista das considerações acima, iniciou-se no Instituto de Genética um programa de melhoramento do eucalipto por meio de mutações induzidas, utilizando a radiação gama e os mutagênicos químicos.

Todavia neste trabalho são apresentados somente os re-

sultados da metodologia utilizada; a maioria dos mutantes, provavelmente aparecerá na geração  $M_2$ .

As três espécies de Eucalyptus foram escolhidas neste experimento por serem largamente empregadas no florestamento e re florestamento em todo o Brasil.

O presente trabalho apresenta quatro tópicos principais:

1. Efeitos da radiação gama sobre a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas.

2. Efeitos dos mutagênicos químicos sobre a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas.

3. Estudos da relação do volume nuclear das três espécies de Eucalyptus com a radiosensitividade.

4. Obtenção de mutantes na geração  $M_1$ .

...

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

As pesquisas sôbre as mutações induzidas em plantas têm merecido a atenção de cientistas de muitos países. O número de trabalhos publicados neste campo sôbre a radiação gama é bem maior do que aquêle referente aos trabalhos publicados sôbre os mutagênicos químicos.

TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1934), citado em YAMAGUCHI (1968), fez uma revisão dos trabalhos conhecidos até aquela época. O autor chamou a atenção para os cinco requisitos básicos que devem ser levados em consideração num experimento para a obtenção de mutações induzidas.

Êstes cinco requisitos básicos são até hoje considerados os mais importantes para um programa de mutações induzidas:

1. pureza do material.
2. número suficientemente grande de testemunhas e de indivíduos que receberam tratamento com agentes mutagênicos.
3. métodos genéticos capazes de detectar mutações induzidas.
4. análise de variação das plantas na geração  $M_2$ .
5. conhecimentos sôbre a maneira pela qual o agente mutagênico usado age sôbre as células germinativas do material tratado.

Apresentamos a seguir uma revisão dos trabalhos publicados relacionados as nossas pesquisas. Nesta revisão os quatro tópicos principais dêste trabalho são analisados separadamente.

### 2.1. EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA

Uma revisão dos trabalhos sôbre as mutações induzidas por radiação gama foi feita por DUBININ (1964). Nesta revisão são relatados trabalhos desenvolvidos desde 1930, principalmente por pesquisadores russos.

Os trabalhos de DUBININ (1964) e CARVALHO, MÔNACO e



KRUG (1966) indicam que já se conseguiu melhoramento na produtividade (amendoim, ervilha, nabo, tomate, arroz, uva, trigo etc.), na precocidade (feijão, ervilha, lúpulo, nabo, tomate, arroz, cevada, maçã etc.), resistência às doenças e pragas (cevada, trigo, linho, amendoim, feijão etc.), e em outros caracteres.

A revisão feita por DUBININ mostra, de um modo geral, que a sensibilidade à radiação gama varia com as diferentes espécies vegetais. A radiosensibilidade (ou sensibilidade à radiação) é expressa pela dosagem letal (LD). Suponhamos que 100 sementes de uma determinada espécie foram irradiadas com uma dosagem de radiação gama de 1.000 R (R = roentgen); se sobreviverem quarenta plantas, concluiremos que a dosagem de 1.000 R corresponde a LD<sub>60</sub> (dosagem letal 60%).

Na Suécia e nos Estados Unidos os radio-geneticistas usam a LD<sub>50</sub> para obterem resultados satisfatórios em seus programas de indução de mutações. No entanto, DUBININ acredita que as dosagens ideais de radiação gama para se obter o máximo de mutações induzidas estão situadas entre as LD<sub>33</sub> e LD<sub>50</sub>, de acordo com os resultados dos experimentos de pesquisadores russos.

Segundo DUBININ, o importante em um programa de indução de mutações é escolher-se uma dosagem de radiação gama que produza um número suficiente de plantas viáveis, sendo também indispensável um efeito mutagênico considerável.

JOHNSTONE e KLEPINGER (1957) verificaram que as dosagens de radiação gama correspondentes a LD<sub>50</sub> causam um estímulo no crescimento das plantas de Yucca brevifolia Engl.; os autores não dão uma explicação para este fato.

SARIC (1958) verificou que com o aumento das dosagens de radiação gama recebidas pelas sementes há um decréscimo gradativo do crescimento das plantas de milho, trigo, centeio e cevada. Parece não haver uma relação entre a taxa de mutações induzidas e o desenvolvimento das plantas.

DUBININ (1964) e YAMAGUCHI (1968) apresentaram listas completas das espécies cultivadas de plantas e a sua radiosensibilidade. Diferenças marcantes na radiosensibilidade das sementes das di-

versas variedades e espécies de plantas foram encontradas.

Uma revisão dos trabalhos sôbre os efeitos da radiação nas sementes de essências florestais, encontrada no trabalho de LYNN (1967), indica que a porcentagem de germinação das sementes e o desenvolvimento das plantas variam com as dosagens de radiação gama recebida pelas sementes, com a espécie e com as condições do tratamento (temperatura, pré-tratamentos, pós-tratamentos, condições fisiológicas da semente etc.).

Segundo LYNN (1967), vários trabalhos realizados indicam que há um estímulo da germinação e do crescimento das plantas, pelos tratamentos com baixas dosagens de radiação gama, em várias espécies florestais. No entanto, o autor cita que há mais evidências de efeitos desfavoráveis do que favoráveis.

SPARROW, ROGERS e SCHWEMMER (1968) analisaram a radiosensitividade de trinta e três espécies florestais. Os dados referentes à sobrevivência das plantas foram colhidos através de contagens em plantações com dois anos de idade; verificaram que a LD<sub>50</sub> variou de 0,5 KR a 1 KR para as ginóspERMAS estudadas; as espécies folhosas são menos radiosensíveis, sendo que sua LD<sub>50</sub> variou entre 1 a 20 KR.

Os autores mostraram que várias espécies pertencentes a um mesmo gênero podem apresentar radiosensitividades bem diferentes; assim, por exemplo, a Buddleia alternifolia Maxim. apresenta uma LD<sub>50</sub> = 7,0 KR enquanto que a B. davidii Franch. tem uma LD<sub>50</sub> = 17,5 KR.

BANDEL (1967) e BANDEL, GURGEL e ANDO (1968) verificaram que a LD<sub>50</sub> do Eucalyptus alba, E. tereticornis, E. citriodora e E. maculata é de aproximadamente 25 a 30 KR. A LD<sub>50</sub> do E. saligna corresponde a uma dosagem de radiação gama situada entre 10 e 20 KR. Os autores verificaram que as dosagens de 10 a 40 KR devem ser usadas para um programa de indução de mutações em E. tereticornis, E. citriodora e E. maculata, pois as LD<sub>50</sub> correspondem à dosagens de radiação gama situadas entre êsses limites.

KERR e GUIMARÃES (1961) irradiaram sementes de Eucalypt-

tus robusta, E. punctata, E. saligna e E. tereticornis, mas as dosagens de radiação gama empregadas no experimento não foram suficientes para se estimar a LD<sub>50</sub> aproximada.

## 2.2. EFEITOS DOS MUTAGÊNICOS QUÍMICOS

KONZAK et al. (1965), numa brilhante revisão sôbre trabalhos referentes a ação de mutagênicos químicos em plantas, mostraram os mais importantes detalhes sôbre o assunto: êstes detalhes são analisados a seguir.

Os autores citam vários trabalhos, mostrando que diferentes agentes mutagênicos químicos produzem diferentes efeitos biológicos em plantas. Os efeitos dos diferentes mutagênicos químicos variam de espécie para espécie.

A taxa de mutações induzidas depende de dois fatores principais: a escolha do mutagênico químico mais eficiente e a escolha do material a ser tratado. A seguir são analisados êstes dois fatores, baseados na revisão de KONZAK et al. (1965).

A eficiência mutagênica de um determinado agente químico é expressa pela frequência de mudanças favoráveis produzidas, sendo que as mudanças desfavoráveis devem estar ausentes; as mudanças favoráveis são as mutações que conferem maior produtividade, precocidade, resistência a doenças etc., e as mudanças desfavoráveis são expressas pelas aberrações cromossômicas, letalidade, esterilidade etc..

A eficiência mutagênica dos agentes químicos depende de uma série de fatores, tais como: a concentração das soluções, o tempo de tratamento das sementes, a solubilidade do agente mutagênico, a toxicidade, a meia-vida etc..

A concentração das soluções de mutagênicos químicos e o tempo de tratamento das sementes influem decisivamente sôbre a taxa de mutações induzidas. Para cada espécie há uma concentração máxima e um tempo máximo de imersão das sementes, acima dos quais aparecem muitas mudanças desfavoráveis (ou efeitos secundários), as

sociados às mutações favoráveis.

A solubilidade dos mutagênicos químicos também influi sobre a taxa de mutações induzidas. A solubilidade dos agentes químicos em solventes de diferentes polaridades, bem como o tamanho de suas moléculas, influem sobre a capacidade de difusão através das membranas celulares.

A toxicidade causada por altas concentrações de soluções de mutagênicos químicos é muito acentuada, causando a morte ou a inibição do crescimento. Muitos mutagênicos químicos não podem ser usados em soluções muito concentradas; as substâncias tóxicas atuam sobre as estruturas intra e extranucleares das células, causando a morte.

Os mutagênicos químicos têm, como no caso das fontes de radiação gama, uma meia-vida; depois de um determinado tempo de preparação das soluções com agentes químicos termina a sua ação mutagênica. A meia-vida varia para os diferentes mutagênicos químicos e também depende da temperatura das soluções. Os mutagênicos químicos com meias-vidas longas atuam durante mais tempo no interior das células, do que aqueles com meias-vidas mais curtas.

A escolha do material a ser tratado com soluções de agentes químicos também influi sobre a taxa de mutações induzidas. Sendo a semente geralmente o material tratado, a sua escolha deve obedecer uma série de critérios, tais como:

O estágio fisiológico da semente, incluindo as condições metabólicas, estágio das divisões celulares e desenvolvimento dos tecidos, afeta sensivelmente as substâncias que reagirão com o mutagênico químico.

A estrutura dos tecidos expostos aos agentes químicos afeta a eficiência dos mutagênicos. As sementes com películas e endospermas menos permeáveis, necessitam de tratamentos mais fortes com soluções de mutagênicos químicos; nestas sementes os efeitos tóxicos manifestam-se mais intensamente do que os efeitos mutagênicos.

A constituição genética da semente influi sobre a taxa

de mutações induzidas. A literatura traz vários trabalhos que mostram que as diferenças genéticas afetam a capacidade de mutação em plantas.

KONZAK et al. (1965) indicam que, de um modo geral, a indução de mutações por agentes químicos ainda não está bem estudada; assim, não foi estabelecido um tratamento ideal, como a LD<sub>50</sub> para a radiação gama, relacionado com a taxa máxima de mutações.

Segundo os mesmos autores, vários agentes químicos têm uma eficiência mutagênica superior à radiação gama, de acordo com os resultados de inúmeros experimentos de indução de mutações realizados com plantas cultivadas.

EHRENBERG, GUSTAFSSON e LUNDQVIST (1961) e NILAN et al. (1963) verificaram que a taxa de mutações induzidas em cevada varia em função das concentrações de vários agentes químicos estudados e em função dos tempos de tratamento.

Segundo os mesmos autores, o importante num programa de mutações induzidas é escolher-se um determinado tratamento com um agente químico que produza um efeito mutagênico considerável mas, também é indispensável haver um número suficiente de plantas viáveis; para a maioria dos mutagênicos químicos estudados não foi estabelecido um tratamento "standard" (concentração e tempo de tratamento) que induza uma taxa máxima de mutação. As LD<sub>30</sub> a LD<sub>50</sub> provavelmente correspondem aos tratamentos indicados para um programa de mutações induzidas.

BANDEL (1967) tratou sementes de cinco espécies de Eucalyptus com soluções de sete mutagênicos químicos. As cinco espécies estudadas foram: E.alba Reinw., E.saligna Sm., E.tereticornis Sm., E.citriodora Hook. e E.maculata Hook.. Os sete mutagênicos químicos testados foram: óxido de etileno, sulfato de dietilo, etileneimina, epicloridrina, metanosulfonato de etilo, glicidol e cloreto de manganês. A semeadura foi realizada em placas de Petri e a porcentagem de germinação serviu para estimar a LD<sub>50</sub> aproximada das cinco espécies de eucaliptos para os sete mutagênicos químicos. Foram testadas várias concentrações dos mutagênicos químicos e vários tempos de tratamento para as espécies de Eucalyptus.

A seguir são mostrados alguns resultados de experimentos de indução de mutações por agentes químicos, encontrados na literatura consultada.

#### Óxido de etileno

NILAN et al. (1963) mostraram que já se conseguiram até 13% de mutações de clorofila em  $M_2$  em cevada, pelo tratamento de sementes com soluções de óxido de etileno, de acordo com uma revisão da literatura por eles realizada.

GUSTAFSSON e GADD (1966) verificaram que a  $LD_{50}$  para o arroz corresponde aproximadamente ao tratamento das sementes com soluções de óxido de etileno a 0,50% durante duas horas.

BANDEL (1967) verificou que o tratamento de sementes de E.alba, E.saligna e E.tereticornis com soluções de óxido de etileno a 0,2% durante 4 horas, correspondia aproximadamente as  $LD_{50}$  a  $LD_{70}$ , num experimento realizado em placas de Petri: para o E.citriodora e o E.maculata este tratamento correspondia aproximadamente a  $LD_{60}$ .

#### Etileneimina

EHRENBERG et al. (1965) obtiveram 28% de mutações de clorofila em  $M_2$  pelo tratamento de sementes de cevada com soluções de etileneimina a 0,07-0,10% durante 4 horas.

GUSTAFSSON e GADD (1966) verificaram que a  $LD_{50}$  para o arroz corresponde ao tratamento das sementes com soluções de etileneimina a 0,30% durante 2 horas.

BANDEL (1967) verificou que a  $LD_{40}$  para o E.alba, E.tereticornis e E.maculata corresponde aproximadamente ao tratamento das sementes com soluções de etileneimina a 0,1% durante 3 horas; a  $LD_{50}$  do E.saligna corresponde ao tratamento com soluções a 0,05% durante 6 horas, e a  $LD_{50}$  do E.citriodora, ao tratamento com soluções a 0,1% durante 6 horas. Estes dados foram obtidos num experimento realizado em placas de Petri.

KERR e GUIMARÃES (1961) submeteram sementes de Eucalyptus citriodora, E.grandis, e E.saligna, ao tratamento com soluções de etileneimina a 0,05%, durante 1, 2, 3, 4 e 5 horas. A porcentagem de sobrevivência das plantas de E.citriodora e E.saligna foi igual ao controle nos diversos tratamentos. O tratamento das sementes de E.grandis com soluções de etileneimina a 0,05% durante 5 horas reduziu em aproximadamente 60% a sobrevivência das plantas com relação ao controle.

Os autores verificaram que duas plantas de E.saligna originadas de sementes tratadas com etileneimina durante 3 e 4 horas, apresentaram uma frutificação precoce; as plantas floriram com 5 meses de idade e 7 meses, respectivamente.

#### Sulfato de dietilo

Segundo KONZAK et al. (1965), a meia-vida das soluções de sulfato de dietilo, a 20°C, é de 200 minutos e, a 30°C, é de 60 minutos.

EHRENBERG, GUSTAFSSON e LUNDQVIST (1959) obtiveram 27% de mutações de clorofila em  $M_2$ , pelo tratamento de sementes de cevada com soluções de sulfato de dietilo a 0,04% durante 2 horas; os autores citam trabalhos realizados onde se conseguiram taxas de mutação até 43%, utilizando sulfato de dietilo.

BANDEL (1967) verificou que a  $LD_{50}$  para o E.tereticornis, E.saligna e E.citriodora corresponde aproximadamente ao tratamento de sementes com soluções de sulfato de dietilo a 0,60% durante 2 horas; para o E.maculata, o tratamento das sementes com soluções a 0,30% durante 4 horas, corresponde aproximadamente a  $LD_{40}$ . Estes dados foram obtidos num experimento realizado em placas de Petri.

#### Metanosulfonato de etilo

Segundo KONZAK et al. (1965), a meia-vida das soluções de metanosulfonato de etilo, a 20°C, é de 93 horas e, a 30°C, é de

26 horas.

NILAN et al. (1963) mostraram em seu trabalho que o tratamento de sementes de cevada com soluções de metanosulfonato de etilo a 0,25% durante 5 horas, induzem 28% de mutações de clorofila em  $M_2$ . Com esse tratamento obteve-se uma sobrevivência de 84% das plantas, em relação ao controle.

Segundo os mesmos autores, o metanosulfonato de etilo é o mais poderoso agente mutagênico conhecido, pois já se conseguiram em cevada índices de 50-60% de mutações de clorofila em  $M_2$ .

BANDEL (1967) verificou que o tratamento de sementes de E. maculata com soluções de metanosulfonato de etilo a 0,4% durante 12 horas, corresponde aproximadamente a  $LD_{50}$ . O tratamento de sementes de E. citriodora e E. tereticornis com soluções a 0,4% durante 24 horas, corresponde aproximadamente as  $LD_{20}$  e  $LD_{50}$ , respectivamente. Estes dados foram obtidos num experimento realizado em placas de Petri.

### Epicloridrina

EHRENBERG, GUSTAFSSON e LUNDQVIST (1961) mostraram que os tratamentos de sementes de cevada com soluções de epicloridrina a 0,10% durante 5 horas, induzem 14% de mutações de clorofila em  $M_2$ .

BANDEL (1967) verificou que a  $LD_{40}$  para o E. maculata corresponde aproximadamente ao tratamento de sementes com soluções de epicloridrina a 0,2% durante 2 horas. O tratamento de sementes de E. tereticornis e E. citriodora com soluções a 0,4% durante 2 horas, corresponde aproximadamente as  $LD_{50}$  e  $LD_{70}$ , respectivamente. Estes dados foram obtidos num experimento realizado em placas de Petri.

## 2.3. A RADIOSENSITIVIDADE E O VOLUME NUCLEAR

Segundo YAMAGUCHI (1968), inúmeros dados radio-biológicos coletados mostraram que, quanto maior for o volume nuclear de células meristemáticas, tanto mais radiosensível será o organismo;



por outro lado, foi demonstrado também que espécies com núcleos maiores contém maior quantidade de DNA por núcleo.

SPARROW, ROGERS e SCHWEMMER (1968) mostraram ser possível estimar a radiosensitividade de uma espécie vegetal com base nas medições do volume nuclear de células meristemáticas de raízes. Os autores estimaram a radiosensitividade para 190 espécies de essências florestais; baseados nas medições dos volumes dos núcleos interfásicos de células meristemáticas de raízes, foram estimadas as LD<sub>50</sub>, baseadas numa regressão determinada experimentalmente. A LD<sub>50</sub> estimada para o Eucalyptus obliqua L. Her. foi de 4,3 KR, sendo que o volume nuclear médio foi de 88 micra.

CAPELLA e CONGER (1967) verificaram que existe uma estreita correlação entre a LD<sub>50</sub> e o volume nuclear de células meristemáticas de raízes, de acordo com um estudo realizado em 5 ginospermas.

No entanto, MYKSCHÉ e RÜDOLPH (1968) mostraram experimentalmente que não há uma correlação entre a radiosensitividade e o volume nuclear de células de raízes, em 9 ginospermas estudadas. Segundo os autores, esta conclusão não invalida o método do volume nuclear para estimar a radiosensitividade de angiospermas.

OSBORNE e LUNDEN (1965) verificaram que o volume nuclear médio de células iniciais de gêmulas do embrião de sementes de doze angiospermas é uma constante que pode ser relacionada com a radiosensitividade. Os autores encontraram uma melhor correlação do volume nuclear de células iniciais do embrião com a radiosensitividade, do que a correlação obtida por SPARROW, ROGERS e SCHWEMMER (1968) que estudaram o volume nuclear de células meristemáticas de raízes.

Segundo OSBORNE e LUNDEN (1965), as plantas, de um modo geral, têm menos de 10 células iniciais. As células iniciais das gêmulas após inúmeras divisões mitóticas dão origem às células, aos tecidos e aos órgãos da parte aérea da planta adulta. O número de células iniciais do eucalipto não é conhecido, segundo a literatura consultada.

Segundo os mesmos autores, as células iniciais das gêmu-

las apresentam algumas características pelas quais se pode distingui-las das outras células: o volume das células e de seus núcleos é maior nas células iniciais, que apresentam um citoplasma sem vacúolos e sem outras inclusões citoplasmáticas visíveis ao microscópio.

#### 2.4. A OBTENÇÃO DE MUTANTES NA GERAÇÃO M<sub>1</sub>

Segundo BRITO DA CUNHA (1966), as mutações são em geral deletérias e recessivas. As mutações induzidas raramente se manifestam na geração M<sub>1</sub> e geralmente são detectadas em M<sub>2</sub>.

MICKE (1958) relatou que as quimeras albinas e as fôlhas e ramos retorcidos de plantas M<sub>1</sub> são provavelmente modificações morfológicas e não consequência de mutações gênicas. Segundo o autor, modificações morfológicas são simples alterações fenotípicas causadas por mudanças nas estruturas extra-nucleares do material submetido ao tratamento com agentes mutagênicos.

O mesmo autor cita que as mutações que ocorrem em M<sub>1</sub> devem ser dominantes. MICKE trabalhando com Melilotus albus Bok., autofecundou plantas M<sub>1</sub> com quimeras albinas e obteve em M<sub>2</sub> uma pequena porcentagem de plantas com quimeras albinas; daí o autor concluir que muitas plantas M<sub>1</sub> com quimeras albinas na realidade não tinham sofrido mutações gênicas.

∴

### 3. MATERIAL

As sementes das três espécies de Eucalyptus utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela Secção de Genética do Hôrt Florestal "Navarro de Andrade" de Rio Claro. As sementes foram co lhidas de árvores de três espécies de eucaliptos: o E.citriodora Hook. e o E.maculata Hook. pertencem a série Corymbosae, sub-sec- ção Eudesmieae, secção Macrantherae, família Myrtaceae, ordem Myr- tiflorae, classe Dicotyledonae e divisão Angiospermae; o E.tereti- cornis Sm. pertence a série Exsertae, subsecção Tereticornes, sec- ção Macrantherae e família Myrtaceae. Esta classificação botânica foi baseada no trabalho de PENFOLD e WILLIS (1961).

A coleta das sementes de E.tereticornis foi realizada em várias árvores do lote nº 136, do Hôrt Florestal de Rio Claro. As sementes de E.citriodora foram colhidas na matriz nº 1.309 e as de E.maculata, na matriz nº 1.007, também no Hôrt Florestal de Rio Claro.

As sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus podem ser caracterizadas pelo seu aspecto externo quanto a sua via- bilidade de germinação, segundo NAVARRO DE ANDRADE (1961). As se- mentes aparentemente viáveis são aquelas que se apresentam prêtas ou bem escuras, grandes, brilhantes e ovaladas, enquanto que as sementes aparentemente inviáveis são menores, mais claras e acha- tadas. Tôdas as sementes empregadas neste trabalho foram assim se- lecionadas. As sementes de E.citriodora e de E.maculata são mais ovaladas e apresentam 3-4 mm na sua maior dimensão; as sementes de E.tereticornis são menos ovaladas e têm aproximaçãmente 1 mm de diâmetro.

As três espécies estudadas neste trabalho foram escolhi- das entre várias espécies importantes de Eucalyptus; as três espé- cies são largamente empregadas no florestamento e reflorestamento, principalmente no estado de São Paulo.

Segundo NAVARRO DE ANDRADE (1961), a madeira do E.tere- ticornis é empregada principalmente para obtenção de carvão, moi- rões, postes, vigas e caibros; a madeira do E.citriodora pode ser

empregada para postes, moirões, vigas, caibros, tábuas e na indústria de óleos essenciais; a madeira do E. maculata pode ser empregada para postes, moirões, vigas, caibros, tábuas e na indústria de óleos essenciais. A madeira das três espécies estudadas pode também ser utilizada na indústria de aglomerados, conglomerados, papel e celulose.

As sementes das três espécies de Eucalyptus foram tratadas com soluções dos cinco mutagênicos químicos seguintes:

Óxido de etileno (E.O.):  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  - The British Drug Houses Ltd.

Etileneimina (E.I.):  $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$  - Koch-Light Laboratories.

Sulfato de dietilo (DES):  $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{SO}_4$  - The British Drug Houses Ltd.

Metansulfonato de etilo (E.M.S.):  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$  - Koch-Light Laboratories.

Epicloridrina:  $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2\text{Cl}$  - The British Drug Houses Ltd.

Foram escolhidos estes cinco mutagênicos químicos, pois eles apresentam uma alta eficiência mutagênica, segundo a literatura consultada.

∴

#### 4. MÉTODO

##### 4.1. EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA

As sementes das três espécies de Eucalyptus foram irradiadas com radiação gama no reator atômico do Instituto de Energia Atômica em São Paulo. As dosagens de radiação recebidas pelas sementes foram de 10, 20, 30 e 40 KR; estas dosagens foram escolhidas de acordo com as pesquisas preliminares apresentadas por BANDEL (1967) e BANDEL, GURGEL e ANDO (1968).

O poder germinativo e o teor de umidade das sementes das três espécies de eucaliptos apresentavam-se, na época da semeadura, da seguinte maneira:

<u>Espécie</u>	<u>Germinação (%)</u>	<u>Umidade (%)</u>
<u>E.tereticornis</u>	92,6	
<u>E.citriodora</u>	87,7	
<u>E.maculata</u>	88,1	

Os testes de germinação das sementes foram realizados em placas de Petri com papel chupão umedecido.

Os tratamentos e a quantidade de sementes submetidas à radiação gama são mostrados a seguir, para as três espécies estudadas:

<u>Tratamento</u>	<u>Nº de sementes</u>
10 KR	400
20 KR	400
30 KR	400
40 KR	400
testemunhas	800

O experimento foi delineado de acordo com um delineamento estatístico de blocos ao acaso, com quatro repetições. Em cada um dos quatro blocos foi semeada uma parcela de 100 sementes

dos quatro tratamentos de radiação e duas parcelas de 100 sementes não irradiadas. A distribuição das parcelas dentro dos blocos foi feita de acôrdo com um sorteio. As tabelas nº 1 e 2 mostram um esquema geral do experimento, com a distribuição das parcelas nos blocos após o sorteio.

Imediatamente após a irradiação, as sementes foram submersas em água durante 15 horas. Não foi realizado nenhum pré-tratamento das sementes. As sementes úmidas foram sécas com talco neutro e papel chupão para facilitar a operação da sementeira.

A sementeira foi realizada em caixas coletivas de madeira de 60 x 40 x 10 cm com uma mistura de terra, areia e estêrco esterilizados. O experimento foi instalado na casa de vidro do Instituto de Genética, em Piracicaba. Em cada caixa coletiva semearam-se 200 sementes, ou seja, duas parcelas. As sementes foram distribuídas de tal forma, que cada plantinha dispunha de uma área aproximada de 12 cm<sup>2</sup>.

#### 4.1.1. EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SÔBRE A SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS

Os efeitos da radiação gama sôbre a sobrevivência das plantas foram estimados por contagens do número de mudas vivas aos 60 dias após a sementeira; o experimento foi encerrado após êsse período.

De acôrdo com o delineamento estatístico do experimento e com os resultados das contagens do número de mudas vivas aos 60 dias após a sementeira, foi realizada uma análise preliminar da variância, que obedeceu ao esquema mostrado a seguir. A análise da variância foi realizada com os valores da porcentagem média de sobrevivência das plantas em relação a testemunha, transformados em logarítmos.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
entre blocos	3	SQ <sub>1</sub>	QM <sub>1</sub>	QM <sub>1</sub> /QM <sub>3</sub>
entre tratamentos	14	SQ <sub>2</sub>	QM <sub>2</sub>	QM <sub>2</sub> /QM <sub>3</sub>
erro	42	SQ <sub>3</sub>	QM <sub>3</sub>	
total	59	SQ <sub>4</sub>		
entre espécies	2	SQ <sub>5</sub>	QM <sub>4</sub>	QM <sub>4</sub> /QM <sub>3</sub>
entre dosagens	4	SQ <sub>6</sub>	QM <sub>5</sub>	QM <sub>5</sub> /QM <sub>3</sub>
espécies x dosagens	8	SQ <sub>7</sub>	QM <sub>6</sub>	QM <sub>6</sub> /QM <sub>3</sub>

Com os valores das porcentagens médias de sobrevivência das plantas em relação a testemunha, transformados em logaritmos, foi estimada a LD<sub>50</sub> para as três espécies de Eucalyptus. O primeiro passo dado para a estimação da LD<sub>50</sub> foi a análise da variância; em seguida, com os dados experimentais transformados em logaritmos, determinou-se a equação da regressão.

Foram construídos gráficos para se determinar se a relação entre as dosagens de radiação gama e a sobrevivência das plantas era linear, ou não, para as três espécies estudadas de Eucalyptus.

As curvas construídas nos indicaram quais as equações que se adaptaram melhor aos dados experimentais; a determinação destas equações foi feita de acordo com um esquema proposto por STEEL e TORRIE (1960).

Em seguida provou-se estatisticamente que a equação da regressão realmente se adaptava aos dados experimentais. Isto foi demonstrado pela análise da variância da regressão linear entre o logaritmo da sobrevivência média das plantas em relação a testemunha e as dosagens de radiação gama, para as três espécies de Eucalyptus. O esquema da análise da variância é mostrado a seguir:

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
<u>E. tereticornis</u>				
regressão linear	1	SQ <sub>1</sub>	QM <sub>1</sub>	QM <sub>1</sub> /QM <sub>9</sub>
desvios da regressão	3	SQ <sub>2</sub>	QM <sub>2</sub>	QM <sub>2</sub> /QM <sub>9</sub>
<u>E. citriodora</u>				
regressão linear	1	SQ <sub>3</sub>	QM <sub>3</sub>	QM <sub>3</sub> /QM <sub>9</sub>
desvios da regressão	3	SQ <sub>4</sub>	QM <sub>4</sub>	QM <sub>4</sub> /QM <sub>9</sub>
<u>E. maculata</u>				
regressão linear	1	SQ <sub>5</sub>	QM <sub>5</sub>	QM <sub>5</sub> /QM <sub>9</sub>
desvios da regressão	3	SQ <sub>6</sub>	QM <sub>6</sub>	QM <sub>6</sub> /QM <sub>9</sub>
regressão linear x espécies	2	SQ <sub>7</sub>	QM <sub>7</sub>	QM <sub>7</sub> /QM <sub>9</sub>
demais interações	6	SQ <sub>8</sub>	QM <sub>8</sub>	QM <sub>8</sub> /QM <sub>9</sub>
erro	42	SQ <sub>9</sub>	QM <sub>9</sub>	

Foram determinadas, em seguida, as equações da regressão exatas para as três espécies de Eucalyptus, de acordo com os dados experimentais. O cálculo destas equações baseou-se no trabalho de STEEL e TORRIE (1960). Nestas equações (do tipo  $\log Y = a + bX$ ) substituíram-se os valores de  $\underline{Y}$  por 50 (50% de sobrevivência das mudas, em relação a testemunha) e se obtiveram os valores de  $\underline{X}$  correspondentes a LD<sub>50</sub>. Outros detalhes sobre este assunto serão vistos no capítulo "Resultados Obtidos".

O cálculo dos desvios da LD<sub>50</sub> foi realizado segundo um processo proposto por GRAYBILL (1961). O erro calculado segundo este processo permite um intervalo de confiança de 70%, que é satisfatório.

#### 4.1.2. EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

Foram realizadas duas medições da altura das plantas, a



primeira aos 45 dias após a semeadura e a segunda aos 60 dias após a semeadura. As medições foram feitas em milímetros, com uma régua comum graduada.

As alturas médias das plantas de cada tratamento foram calculadas, bem como os desvios padrão respectivos. Com os valores das alturas médias das plantas aos 45 e aos 60 dias após a semeadura, foram realizadas duas análises de variância (para as duas medições), segundo o esquema apresentado a seguir:

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
entre blocos	3	$SQ_1$	$QM_1$	$QM_1/QM_3$
entre tratamentos	14	$SQ_2$	$QM_2$	$QM_2/QM_3$
erro	42	$SQ_3$	$QM_3$	
total	59	$SQ_4$		
entre espécies	2	$SQ_5$	$QM_4$	$QM_4/QM_3$
entre dosagens	4	$SQ_6$	$QM_5$	$QM_5/QM_3$
espécies x dosagens	8	$SQ_7$	$QM_6$	$QM_6/QM_3$

Para se determinar se havia uma relação entre a dosagem de radiação gama recebida pelas sementes e o desenvolvimento das plantas, foram construídas as curvas para as três espécies de Eucalyptus.

Os valores das alturas médias das plantas e os respectivos desvios padrão serviram para indicar a amplitude da variabilidade fenotípica na geração  $M_1$ .

#### 4.2. EFEITOS DOS MUTAGÊNICOS QUÍMICOS

As sementes das três espécies de Eucalyptus foram tratadas com soluções de cinco mutagênicos químicos, com concentrações e tempos de tratamento variáveis.

As concentrações das soluções de mutagênicos químicos e os tempos de imersão das sementes foram verificados em ensaios preliminares, conforme foi relatado no capítulo "Revisão da Literatura", segundo BANDEL (1967). Estes testes preliminares de germinação foram realizados em placas de Petri com papel chupão umedecido.

As soluções dos mutagênicos químicos foram preparadas dissolvendo-se as drogas em água destilada ou em soluções alcoólicas, dependendo da solubilidade das mesmas. As soluções de epiclo<sub>ridrina</sub> foram preparadas com álcool a 5% e as soluções de sulfato de dietilo, com álcool a 10%. As soluções de óxido de etileno, metanosulfonato de etilo e etileneimina foram preparadas com água destilada.

As soluções alcoólicas foram usadas para os mutagênicos insolúveis em água. Verificou-se praticamente que as soluções alcoólicas com concentrações até 15% não afetam a germinação das sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus.

A temperatura das soluções de óxido de etileno foi de aproximadamente 10°C, durante o tratamento das sementes; foi usada esta temperatura porque o ponto de ebulição do óxido de etileno é de 14°C. A temperatura das soluções dos outros quatro mutagênicos químicos foi de 15 a 20°C, aproximadamente.

As sementes das três espécies estudadas foram submersas em água para se testar o tempo necessário para a saturação; depois de 24 horas de imersão não houve mais absorção de água pelas sementes, pois as mesmas atingiram um peso constante (as pesagens foram feitas de 3 em 3 horas).

Antes do tratamento das sementes com as soluções de mutagênicos químicos foi realizado um pré-tratamento, que constou da imersão das sementes em água durante 24 horas; o embrião das sementes de eucalipto situa-se no íntimo do endosperma; sabendo-se que depois de 24 horas se atinge a saturação, conclui-se que após este período, a penetração da água atingiu os tecidos internos da semente, inclusive o embrião.

O pré-tratamento das sementes com água é recomendado pa

ra que a penetração das soluções dos mutagênicos químicos se dê rapidamente, pois os tecidos das sementes tornam-se mais permeáveis; alguns dos mutagênicos químicos utilizados neste trabalho têm uma meia-vida curta, segundo KONZAK et al. (1965), de modo que a rápida penetração das soluções até o embrião das sementes é indispensável. O volume das soluções de mutagênicos empregados foi aproximadamente cinco vezes maior que o volume das sementes.

Os testes preliminares de germinação feitos em placas de Petri, indicaram serem estes os tratamentos indicados, segundo BANDEL (1967):

<u>mutagênicos químicos</u>	<u>concentração da solução</u>	<u>tempo de tratamento</u>
óxido de etileno	0,15% e 0,30%	2 e 4 horas
etileneimina	0,04% e 0,08%	3 e 6 horas
sulfato de dietilo	0,30% e 0,60%	2 e 4 horas
metanosulfonato de etilo	0,25% e 0,50%	12 e 24 horas
epicloridrina	0,15% e 0,30%	2 e 4 horas

O experimento foi delineado de acordo com um esquema de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela constou de 100 sementes; foram semeadas quatro parcelas de testemunhas por bloco. O experimento constou de 288 parcelas distribuídas nos quatro blocos, tendo sido semeadas 28.800 sementes. O experimento foi instalado na casa de vidro do Instituto de Genética, em Piracicaba. As tabelas nº 3 e 4 mostram um esquema geral do experimento.

Os quatro blocos foram dispostos na área da casa de vidro, de acordo com um sorteio previamente realizado. A disposição das caixas dentro de cada bloco também obedeceu a um sorteio, sendo que as três espécies de Eucalyptus foram semeadas juntas, isto é, foi feito um único sorteio dentro de cada bloco.

Após o tratamento com as soluções de mutagênicos químicos, as sementes foram imersas em água destilada e lavadas durante uma hora aproximadamente. A seguir as sementes foram secas com talco neutro e papel chupão para facilitar a operação da semeadura.

A sementeira foi realizada em caixas coletivas de madeira de 60 x 40 x 10 cm com uma mistura de terra, areia e estêrco esterilizados; imediatamente após a sementeira foi feita uma rega bem intensa.

Em cada caixa coletiva foram semeadas duas parcelas, ou seja, 200 sementes. As sementes foram distribuídas de tal forma que cada plantinha dispunha de uma área de 12 cm<sup>2</sup> aproximadamente. A germinação das sementes de Eucalyptus iniciou-se 24 horas após a sementeira.

As porcentagens de plantas sobreviventes foram obtidas pela contagem do número de plantas vivas aos 60 dias após a sementeira. Com os valores das porcentagens de sobrevivência das plantas foi realizada uma análise estatística, mediante um teste de qui-quadrado, pelo qual se compararam as médias de cada tratamento com as médias das testemunhas.

Os dados obtidos com as contagens do número de mudas sobreviventes, para os vários tratamentos e para as três espécies de eucalipto, foram empregados para se estimar quais as melhores concentrações das soluções de mutagênicos químicos e os melhores tempos de tratamento a serem utilizados num programa de mutações induzidas.

O efeito dos mutagênicos químicos sobre o desenvolvimento das mudas foi obtido pela medição das alturas das plantas aos 45 e 60 dias após a sementeira. As medições serviram para se ter uma idéia da variabilidade nos valores medidos dentro e entre os tratamentos.

#### 4.3. A RADIOSENSITIVIDADE E O VOLUME NUCLEAR

Foram medidos os volumes de núcleos de dois tipos de células: as células meristemáticas de raízes de sementes recém-germinadas e as células iniciais de gêmulas de embriões de sementes em repouso. O volume nuclear destas células foi medido para se estabelecer se há ou não alguma relação com a radiosensitividade das sementes de eucalipto. A literatura consultada indica que os dois

tipos de células estudados são favoráveis para se comparar a radiosensitividade das sementes com o volume nuclear.

As pontas de raízes foram obtidas de sementes germinadas em placas de Petri com papel chupão umedecido. O embrião foi retirado do endosperma de sementes em repouso com auxílio de uma micro-agulha. Os embriões das sementes das três espécies de Eucalyptus têm um comprimento inferior a 0,5 mm; as pontas de raízes tinham aproximadamente 4 mm de comprimento.

Os embriões e as raízes foram fixadas pelo fixador Gilson; a impregnação do material com parafina foi precedida pelas técnicas usuais de desidratação e impregnação com xilol. O material montado em blocos de parafina foi seccionado longitudinalmente por cortes de 10 micra de espessura do micrótomo.

A hematoxilina férrica de Heidenhain foi o corante empregado, sendo que o material foi contra-corado com safranina e verde-rápido. As dimensões dos núcleos foram obtidas por medições realizadas com o auxílio de uma ocular micrométrica e um microscópio Zeiss (aumento = 1500 vezes).

O diâmetro médio dos núcleos foi utilizado para se calcular o volume nuclear médio, aplicando-se a fórmula da esfera. Nos núcleos não esféricos, o diâmetro médio calculado foi a média dos diâmetros maiores e menores.

Foram medidos vinte núcleos de células do embrião e vinte núcleos de células meristemáticas de raízes, para cada uma das três espécies estudadas de Eucalyptus; foram calculados os volumes nucleares médios dos dois tipos de células.

#### 4.4. A OBTENÇÃO DE MUTANTES NA GERAÇÃO M<sub>1</sub>

As plantas originadas de sementes tratadas com agentes mutagênicos foram analisadas morfológicamente; observaram-se certas alterações fenotípicas não mostradas pelas plantas testemunhas. Anotou-se a presença de quimeras albinas, folhas retorcidas e menores que as normais, ramos retorcidos etc..

A caracterização de prováveis mutantes também foi feita através da observação do número de "seedlings" vivos e o seu posterior desenvolvimento e da variabilidade na altura das plantas originadas de sementes tratadas em relação à variabilidade da altura das testemunhas.

•••

## 5. RESULTADOS OBTIDOS

### 5.1. EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA

De um modo geral, foi observado que, quanto maior a dosagem de radiação gama recebida pelas sementes, menor foi a porcentagem média de sobreviventes e menor a altura média das plantas.

#### 5.1.1. EFEITOS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS

Verificou-se que o aumento gradativo das dosagens de radiação gama recebida pela semente causa um decréscimo gradativo na porcentagem de plantas sobreviventes; os resultados das contagens do número de mudas sobreviventes aos 60 dias após a semeadura estão apresentados nas tabelas nº 5 e 6.

A radiação gama causa um efeito letal pré-germinativo, não chegando as sementes a germinarem; o efeito letal pós-germinativo se manifesta pela morte das plantas. Verificou-se que nos tratamentos com dosagens altas de radiação gama o número de mudas que morreram foi maior do que nos tratamentos com baixas dosagens. Os resultados apresentados neste trabalho dizem respeito somente ao total de mudas vivas aos 60 dias após a semeadura.

Os resultados da análise preliminar da variância, onde se analisaram os efeitos da radiação gama sobre a sobrevivência das plantas, são mostrados na tabela nº 7.

Constatou-se que há diferenças significativas entre os blocos, entre os tratamentos, entre as 3 espécies de Eucalyptus e entre as dosagens de radiação gama; por outro lado, o valor de F também foi significativo para a interação espécies x dosagens, o que indica que a sobrevivência das mudas foi diferente para as três espécies de eucaliptos e para as dosagens de radiação gama recebidas pelas sementes.

Os valores da porcentagem de sobrevivência das mudas em relação as testemunhas foram relacionados com as dosagens de radiação gama recebidas pelas sementes, num gráfico que é mostrado na

figura nº 1; as curvas aproximadas traçadas mostram que elas são diferentes para as três espécies e que a relação entre as dosagens e as sobrevivências não são lineares.

Se a relação entre as dosagens de radiação gama e a porcentagem de sobrevivência média das plantas fôsse linear, teríamos uma equação do tipo:  $Y = a' + b'X$ .

As curvas apresentadas na figura nº 1 nos indicam que uma equação do tipo:  $\log Y = a + bX$  é a que melhor se adapta aos dados experimentais, de acôrdo com o trabalho de STEEL e TORRIE (1960).

Nesta equação,  $Y$  representa os valores da porcentagem da sobrevivência média das mudas em relação as testemunhas, e  $X$  representa os valores das dosagens de radiação;  $a$  e  $b$  são os parâmetros da equação, que foram determinados com os dados experimentais. Nesta equação comparamos, portanto, os valores de  $\log Y$  com os valores de  $X$ .

Em seguida foi provado estatisticamente que a equação  $\log Y = a + bX$  realmente se adaptava aos dados experimentais. Isto foi demonstrado pela análise da variância apresentada na tabela nº 8, onde se estudou a regressão linear entre o logaritmo da sobrevivência média das mudas em relação as testemunhas e as dosagens de radiação gama, para as três espécies de eucalipto.

Os resultados apresentados na tabela nº 8 indicam que:

1. a regressão linear é significativa para as três espécies de Eucalyptus estudadas;
2. os desvios da regressão linear não são significativos;
3. as declividades das três curvas são diferentes;

Estas conclusões nos indicam que as três espécies têm curvas diferentes, com declividades diferentes, mas a equação  $\log Y = a + bX$  é válida para os três Eucalyptus.

Os parâmetros  $a$  e  $b$  da equação acima foram calculados com os dados experimentais, separadamente para cada uma das três espécies de eucalipto, de acôrdo com a metodologia proposta por



STEEL e TORRIE (196C). Foram obtidas as seguintes equações lineares:

$$\underline{E.tereticornis} \quad \log Y = 2,0272 - 0,0248 X$$

$$\underline{E.citriodora} \quad \log Y = 2,0302 - 0,0169 X$$

$$\underline{E.maculata} \quad \log Y = 2,0267 - 0,0130 X$$

Na figura nº 2 são mostradas as curvas construídas de acordo com as três equações acima. Convém ressaltar que não se pode generalizar a validade destas equações para outras condições experimentais.

Nestas equações foi dado um valor de 50 (50% de sobrevivência das plantas em relação as testemunhas) para  $\underline{Y}$  e foram obtidos os valores de  $\underline{X}$  correspondentes as  $LD_{50}$ . Os valores das  $LD_{50}$  com os respectivos desvios, para as três espécies de eucalipto, são apresentados a seguir, sendo os números correspondentes às dosagens de radiação gama em roentgen (R):

$$\underline{E.tereticornis} \quad LD_{50} = 13.202,59 \pm 2.745,97$$

$$\underline{E.citriodora} \quad LD_{50} = 19.585,85 \pm 3.106,04$$

$$\underline{E.maculata} \quad LD_{50} = 25.215,05 \pm 3.205,58$$

#### 5.1.2. EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

As alturas médias das plantas e os desvios padrão para cada tratamento foram calculados. Os resultados das medições das alturas das plantas, aos 45 e 60 dias após a semeadura, são mostrados nas tabelas nºs 9 a 12. Com os dados apresentados nas tabelas nºs 9 e 11 foram realizadas as análises da variância, cujos resultados são apresentados nas tabelas nºs 13 e 14.

As análises da variância das medições das alturas das plantas, aos 45 e aos 60 dias após a semeadura, mostraram, de modo geral os mesmos resultados.

Verificou-se que há diferenças significativas entre os blocos, entre os tratamentos, entre as espécies e entre as dosagens.

gens. Os dados das medições realizadas aos 45 dias após a semeadura mostraram que a interação dosagens x espécies deu um F significativo ao nível de 1% de probabilidade, enquanto que nas medições feitas aos 60 dias após a semeadura, verificou-se que o valor de F foi significativo ao nível de 5% de probabilidade. Estes resultados indicam que as diferentes dosagens de radiação gama atuam diferentemente sobre as sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus e sobre o desenvolvimento das plantas.

Com os dados das tabelas nºs 10 e 12 foram construídas as curvas apresentadas nas figuras nºs 3 e 4. Estas curvas mostraram que há uma relação não linear entre as dosagens de radiação gama e as alturas médias das plantas em relação as testemunhas; verificamos anteriormente que, quanto maior a dosagem de radiação gama, menor será a porcentagem de mudas sobreviventes.

Verificou-se que os tratamentos de sementes com dosagens de 30 KR deram origem a plantas mais desenvolvidas do que as plantas do tratamento cujas sementes foram irradiadas com 20 KR, para as três espécies de Eucalyptus.

As medições das alturas das mudas aos 45 dias e aos 60 dias após a semeadura nos indicam que há uma interação entre os efeitos da radiação gama e a competição entre as plantas. Os tratamentos com dosagens menores de radiação gama tiveram uma porcentagem de germinação maior e, portanto, a competição entre as mudas foi maior.

Nos tratamentos com dosagens maiores de radiação gama a germinação foi menor, de modo que não houve muita competição entre as plantas. Observou-se que a diferença da altura média das plantas entre as medições realizadas aos 45 dias e aos 60 dias após a semeadura, tornou-se maior com o aumento das dosagens de radiação gama. A tabela nº 15 mostra os dados que evidenciam a influência da competição entre as plantas sobre o desenvolvimento das mesmas.

A variabilidade das alturas médias das plantas originadas de sementes irradiadas foi diferente da variabilidade das alturas médias das testemunhas; verificou-se que nos tratamentos de

sementes com dosagens maiores de radiação gama, os desvios padrão das alturas das mudas foram proporcionalmente maiores em relação aos tratamentos com dosagens menores e em relação às testemunhas, segundo os dados das tabelas nº 10 e 12.

## 5.2 - EFEITOS DOS MUTAGÊNICOS QUÍMICOS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

De um modo geral, observou-se que, quanto mais concentradas forem as soluções de mutagênicos químicos, tanto menores serão as porcentagens de sobrevivência média das plantas e menor será seu desenvolvimento médio. No entanto, houve algumas exceções, que serão mencionadas mais adiante.

Do mesmo modo, quanto mais longo fôr o tempo de tratamento das sementes com as soluções de mutagênicos químicos, tanto menor será a porcentagem de sobrevivência média das plantas e menor será o desenvolvimento médio das mesmas.

Os resultados das contagens do número de mudas sobreviventes aos 60 dias após a semeadura são mostrados nas tabelas nºs 16 a 18. Os resultados das medições das alturas das plantas aos 45 e 60 dias após a semeadura são mostrados nas tabelas nºs 19 a 21.

Verificou-se que, nos tratamentos com concentrações elevadas e longos tempos de imersão, o número de plantas que morreram foi maior do que nos tratamentos com concentrações mais baixas e tempos de imersão mais curtos. Os resultados apresentados neste trabalho dizem respeito somente ao total de mudas vivas aos 60 dias após a semeadura.

Os valores das porcentagens médias de sobrevivência das plantas apresentados nas tabelas nºs 16 a 18 foram analisados estatisticamente mediante um teste de qui-quadrado, pelo qual se comparou as médias de cada tratamento com a média das testemunhas.

De um modo geral, as diferenças nas porcentagens médias de sobrevivência das plantas entre as testemunhas e os tratamen-

tos com mutagênicos químicos foram altamente significativas, de acordo com os resultados dos testes de qui-quadrado apresentados na tabela nº 22.

Os resultados das medições das alturas das plantas nos indicaram que, como no caso do tratamento de sementes com radiação gama, houve uma interação entre os efeitos dos mutagênicos químicos e os efeitos da competição entre mudas.

Os dados das tabelas nºs 19 a 21 mostram a variação média das alturas das mudas (desvios padrão). De um modo geral, verificou-se que a variabilidade na altura das plantas, originadas de sementes tratadas com soluções dos cinco mutagênicos químicos estudados, não diferiu da variabilidade na altura das plantas testemunhas.

Em seguida são mostrados os resultados experimentais relativos à sobrevivência e ao desenvolvimento das plantas. Os dados de sobrevivência das plantas referem-se à porcentagem média em relação as testemunhas, considerando-se a porcentagem média das testemunhas igual a 100%.

#### 5.2.1. EFEITOS DO ÓXIDO DE ETILENO

Das três espécies estudadas de Eucalyptus, o E.citriodora mostrou ser a menos sensível ao óxido de etileno, enquanto o E. maculata mostrou-se a mais sensível, de acordo com os resultados das contagens do número de mudas sobreviventes e das medições em altura das plantas.

E.tereticornis - os tratamentos das sementes desta espécie com soluções de óxido de etileno a 0,15% durante 2 e 4 horas, e com soluções a 0,30% durante 2 horas, acarretaram uma ligeira queda na porcentagem de mudas sobreviventes, em relação a testemunha. Nos tratamentos mencionados, a sobrevivência média das plantas foi de 93%, 85% e 83%, respectivamente. O tratamento com solução de óxido de etileno a 0,30% durante 4 horas, matou praticamente todas as sementes, pois a taxa de sobrevivência das plantas foi de apenas 2%.

Verificou-se que os tratamentos das sementes com soluções de óxido de etileno a 0,15% causam um crescimento das plantas superior às testemunhas. Nos tratamentos com soluções a 0,30%, o desenvolvimento das plantas foi inferior às testemunhas.

E.citriodora - a porcentagem de plantas sobreviventes foi de 104%, em relação à testemunha, após o tratamento das sementes com soluções de óxido de etileno a 0,15% durante 2 horas. Nos outros três tratamentos esta porcentagem variou de 83% a 95%.

As plantas originadas de sementes tratadas com soluções de óxido de etileno a 0,15% durante 2 horas, mostraram um desenvolvimento inferior às testemunhas. A altura média das plantas nos outros três tratamentos foi maior que as testemunhas.

E.maculata - a sobrevivência média das plantas desta espécie, após o tratamento das sementes com soluções de óxido de etileno a 0,15% durante 2 e 4 horas, foi de 105% e 99%, respectivamente. As soluções a 0,30% causaram um efeito diferente, já que as porcentagens de sobrevivência média foram de 94% e 86%, para os tratamentos de 2 e 4 horas, respectivamente.

A altura média das plantas nos tratamentos com soluções a 0,15% durante 2 horas, e com soluções a 0,30% durante 4 horas, foi inferior à altura média das testemunhas. No tratamento com soluções a 0,15% durante 4 horas, a altura média das plantas foi superior às testemunhas, enquanto que no tratamento com soluções a 0,30% durante 2 horas, o desenvolvimento das plantas foi semelhante às testemunhas.

#### 5.2.2. EFEITOS DA ETILENEIMINA

Verificou-se que o E.tereticornis é, das três espécies estudadas, a mais sensível aos tratamentos com soluções de etileneimina, e o E.citriodora, a menos sensível. Estas afirmativas estão de acordo com os resultados das contagens do número de plantas sobreviventes. As medições das alturas das plantas indicam que a etileneimina estimula o crescimento das plantas; verificou-se que

nos tratamentos das sementes por 6 horas, a altura média das plantas foi superior à altura média das plantas dos tratamentos por 3 horas. Além disso, verificou-se que a altura média das plantas de quase todos os tratamentos, nas três espécies estudadas, é superior à altura média das testemunhas.

E.tereticornis - a porcentagem média das plantas sobreviventes foi semelhante para os quatro tratamentos, pois a variação foi de 63% a 74%.

A altura média das plantas foi superior à altura média das testemunhas, em três tratamentos; somente o tratamento com soluções de etileneimina a 0,08% durante 3 horas, deu origem a mudas menores que as testemunhas.

E.citriodora - a sobrevivência média das plantas desta espécie, nos tratamentos com soluções de etileneimina a 0,04%, foi superior às testemunhas; a sobrevivência média das plantas originadas de sementes tratadas com soluções a 0,08% foi aproximadamente 90%.

A altura média das plantas foi inferior à altura média das testemunhas somente no tratamento com soluções a 0,08% durante 3 horas; nos demais tratamentos, a altura média das plantas foi superior às testemunhas.

E.maculata - a sobrevivência média das plantas foi de 94% no tratamento com soluções de etileneimina à 0,04% durante 3 horas, e de 101% no tratamento por 6 horas; nos tratamentos com soluções a 0,08%, as sobrevivências médias foram de 97% e 84%, para os tratamentos de 3 e 6 horas, respectivamente.

A altura média das plantas foi inferior à altura média das testemunhas, somente no tratamento com soluções de etileneimina a 0,04% durante 3 horas; nos outros 3 tratamentos, observou-se que a altura média das plantas foi superior às testemunhas.

### 5.2.3. EFEITOS DO SULFATO DE DIETILO

Verificou-se que o E.maculata é, dentre as três espécies

estudadas, a mais sensível ao sulfato de dietilo, sendo que as outras duas espécies são menos sensíveis.

E.tereticornis - a sobrevivência média das plantas do tratamento com soluções a 0,30% durante 2 e 4 horas, foi de 93% e 18%, respectivamente. A sobrevivência média foi de 29% nos tratamentos com soluções a 0,60% durante 2 horas; o tratamento com soluções a 0,60% durante 4 horas matou todas as sementes.

A altura média das plantas do tratamento com soluções a 0,30% durante 2 horas, foi superior à altura média das testemunhas; nos outros três tratamentos, a altura média foi inferior às testemunhas.

E.citriodora - nos tratamentos com soluções de sulfato de dietilo a 0,30% (durante 2 e 4 horas) e com soluções a 0,60% (durante 2 e 4 horas), a sobrevivência média das plantas foi de 95%, 66%, 14% e 0%, respectivamente.

A altura média das plantas do tratamento com soluções a 0,30% durante 2 horas, foi superior à altura média das testemunhas; nos outros dois tratamentos, a altura média foi inferior às testemunhas.

E.maculata - a sobrevivência média das plantas nos tratamentos com soluções a 0,30% durante 2 e 4 horas, foi de 99% e 66%, respectivamente; nos tratamentos com soluções a 0,60% durante 2 e 4 horas, a sobrevivência média foi de 3% e 0%, respectivamente.

A altura média das plantas do tratamento com soluções a 0,30% durante 2 horas, foi superior à altura média das testemunhas; nos outros tratamentos, a altura média das plantas foi inferior às testemunhas.

#### 5.2.4. EFEITOS DO METANOSULFONATO DE ETILO

Verificou-se que o E.tereticornis é mais sensível ao tratamento com metanosulfonato de etilo, do que as outras duas espécies estudadas; o E.citriodora mostrou ser a espécie menos sensível a este mutagênico químico.

O desenvolvimento das plantas das três espécies parece ser estimulado pelo tratamento das sementes com soluções de metanosulfonato de etilo, pois quase todos os tratamentos mostraram que a altura média das plantas foi superior às testemunhas.

E.tereticornis - a sobrevivência média das plantas nos tratamentos com soluções de 0,25%, durante 12 e 24 horas, foi de 106% e 108%, respectivamente; nos tratamentos com soluções a 0,50% durante 12 e 24 horas, as sobrevivências médias foram de 79% e 18%, respectivamente.

A altura média das plantas dos quatro tratamentos foi superior à altura média das testemunhas.

E.citriodora - a sobrevivência média das plantas variou entre 82% e 86%, para os quatro tratamentos com soluções de metanosulfonato de etilo. A altura média das plantas de todos os tratamentos foi superior à altura média das testemunhas.

E.maculata - a sobrevivência média das plantas desta espécie foi de 98% e 91%, para os tratamentos com soluções de metanosulfonato de etilo a 0,25% durante 12 e 24 horas, respectivamente; a sobrevivência média nos tratamentos com soluções a 0,50% durante 12 e 24 horas, foi de 77% e 66%, respectivamente.

A altura média das plantas foi superior à altura média das testemunhas, nos quatro tratamentos.

#### 5.2.5. EFEITOS DA EPICLORIDRINA

O E.tereticornis mostrou ser a espécie mais sensível ao tratamento com a epicloridrina, enquanto o E.citriodora mostrou-se a menos sensível. A altura média das plantas em todos os tratamentos foi inferior à altura média das testemunhas, nas três espécies estudadas de Eucalyptus.

E.tereticornis - a sobrevivência média das plantas foi de 95% e 27%, para os tratamentos com soluções de epicloridrina a 0,15% durante 2 e 4 horas, respectivamente. Nos tratamentos com soluções a 0,30% durante 2 e 4 horas, a sobrevivência média foi



de 28% e 0%, respectivamente.

E.citriodora - a sobrevivência média das plantas foi de 92% e 60%, para os tratamentos com soluções de epicloridrina a 0,15% durante 2 e 4 horas, respectivamente; para os tratamentos com soluções a 0,30% durante 2 e 4 horas, a sobrevivência média foi de 78% e 1%, respectivamente.

E.maculata - a sobrevivência média das plantas foi de 99% e 42%, para os tratamentos com soluções de epicloridrina a 0,15% durante 2 e 4 horas, respectivamente; para os tratamentos com soluções a 0,30% durante 2 e 4 horas, a sobrevivência média foi de 33% e 0%, respectivamente.

### 5.3. A RADIOSENSITIVIDADE E O VOLUME NUCLEAR

Os resultados das medições dos volumes dos núcleos de células meristemáticas de raízes e dos volumes nucleares de células iniciais de gêmulas do embrião de sementes dormentes, para as três espécies de Eucalyptus, são mostrados a seguir:

espécie	volume nuclear das células do embrião ( $\mu^3$ )	volume nuclear das células de raízes ( $\mu^3$ )	LD <sub>50</sub> (KR)
<u>E.tereticornis</u>	173,29 $\pm$ 13,51	31,62 $\pm$ 10,51	13,2 $\pm$ 2,7
<u>E.citriodora</u>	119,78 $\pm$ 11,23	18,26 $\pm$ 5,83	19,6 $\pm$ 3,1
<u>E.maculata</u>	308,61 $\pm$ 18,02	16,55 $\pm$ 5,74	25,2 $\pm$ 3,2

Os dados apresentados indicam que não há uma relação entre o volume nuclear das células iniciais do embrião e a radiosensitividade das sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus. O E.maculata apresenta um volume nuclear maior que as outras duas espécies e é menos radiosensível.

O E.tereticornis apresenta um volume nuclear médio das células meristemáticas das raízes de 32  $\mu^3$  e uma LD<sub>50</sub> de 13,2 KR; o E.maculata apresenta um volume nuclear de 17  $\mu^3$  e uma LD<sub>50</sub> e

25,2 KR; o E.citriodora apresenta uma LD<sub>50</sub> intermediária(19,6 KR), em relação às outras duas espécies, mas o seu volume nuclear médio ( $18,3 \mu^3$ ) é menor que a média dos volumes nucleares das outras duas espécies de Eucalyptus.

#### 5.4. A OBTENÇÃO DE MUTANTES NA GERAÇÃO M<sub>1</sub>

Foram observadas dez plantas que apresentaram algumas fôlhas com quimeras albinas. As quimeras albinas apareceram em todas as fôlhas em diversas plantas; outras plantas observadas apresentaram somente algumas fôlhas com quimeras albinas. A figura nº 5, apresentada a seguir, mostra o aspecto de uma planta de E.citriodora com as quimeras albinas nas fôlhas.

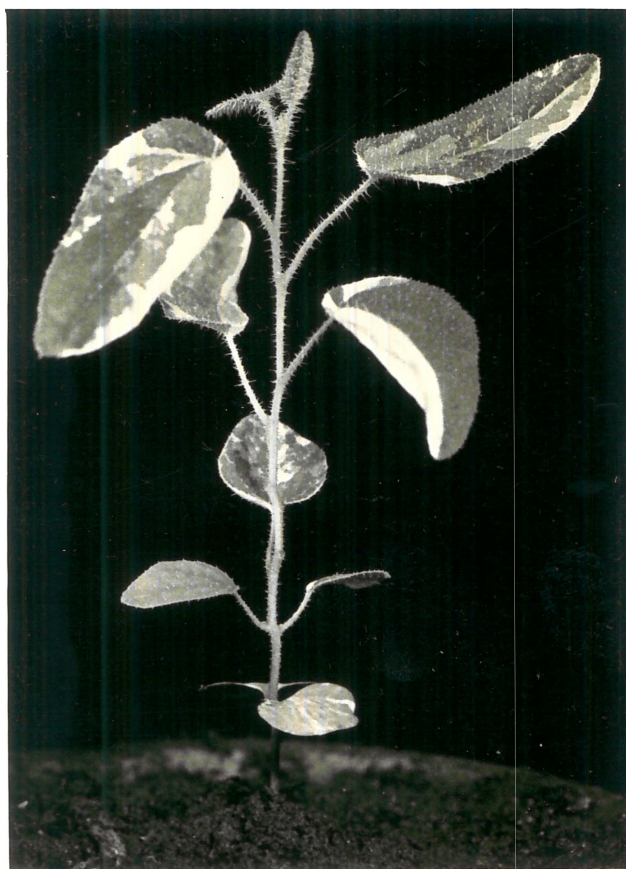


Figura nº 5 - Aspecto de uma planta de E.citriodora apresentando fôlhas com quimeras albinas.

Não foram observadas fôlhas com quimeras albinas nas plantas testemunhas; as dez plantas que apresentaram quimeras albinas pertenciam aos seguintes tratamentos: duas plantas de E.citriodora e uma de E.maculata, do tratamento com metanosulfonato de etilo; uma planta de E.citriodora e uma de E.tereticornis, do tratamento com sulfato de dietilo; uma planta de E.tereticornis e uma de E.maculata, do tratamento com etileneimina; uma planta de E.tereticornis, do tratamento com 40 KR; uma planta de E.tereticornis e uma de E.citriodora, do tratamento com 30 KR.

Foram observadas várias plantas que apresentavam fôlhas com formas e tamanhos diferentes das normais, e ramos retorcidos e menores que os normais; estas alterações fenotípicas foram notadas somente em plantas originadas de sementes tratadas com agentes mutagênicos.

Como já foi citado, o tratamento das sementes das três espécies de Eucalyptus com mutagênicos químicos e radiação gama, causou também um efeito letal pós-germinativo; verificou-se que, nos tratamentos das sementes com altas dosagens de radiação gama, o número das plantas que morreram foi maior que nos tratamentos com dosagens menores; do mesmo modo, os tratamentos das sementes com soluções mais concentradas e por períodos longos, causaram um número maior de plantas mortas.

Muitas sementes germinadas emitiram somente as fôlhas cotiledonares e depois morreram; as fôlhas cotiledonares dessas plantas, mostraram-se mais espessas que o normal; além disso, estas fôlhas cotiledonares saíram diretamente da semente, sem haver a formação do pequeno caulículo normalmente observado. Algumas plantas somente morreram quando atingiram uma altura de 5 a 10cm.

A variabilidade das alturas médias das plantas originadas de sementes irradiadas foi diferente da variabilidade observada nas alturas médias das testemunhas, conforme mostram os dados das tabelas nº 10 e 12.

A variabilidade observada na altura média das mudas originadas de sementes tratadas com soluções de mutagênicos químicos está mostrada nos dados das tabelas nº 19 a 21. Verificou-se que a

variabilidade das alturas médias das plantas originadas de sementes tratadas, não diferiu de um modo geral, da variabilidade das alturas médias das testemunhas.

Comparando-se os desvios padrão observados nos resultados das medições das alturas médias das plantas originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos e radiação, nas três espécies de Eucalyptus, observou-se que, de um modo geral, a variabilidade nas alturas das plantas não diferiu entre as três espécies.

∴

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA

Os trabalhos de vários pesquisadores, segundo DUBININ (1964), indicam que há uma estreita relação entre a taxa de mutações induzidas e a taxa de germinação das sementes; a LD<sub>50</sub> é atualmente empregada para estimar a dosagem ideal de radiação gama para a indução de mutações.

Segundo os dados experimentais, a LD<sub>50</sub> do E. tereticornis é de  $13,2 \pm 2,7$  KR, a LD<sub>50</sub> do E. citriodora é de  $19,6 \pm 3,1$  KR e a LD<sub>50</sub> do E. maculata é de  $25,2 \pm 3,2$  KR. Estas dosagens de radiação gama são indicadas para um programa de indução de mutações, segundo os nossos dados experimentais.

SPARROW, ROGERS e SCHWEMMER (1968) mostraram que várias espécies pertencentes a um mesmo gênero podem apresentar radiosensitividades diferentes; o mesmo foi observado neste experimento, pois as três espécies estudadas de Eucalyptus apresentam diferentes LD<sub>50</sub>.

A capacidade germinativa das sementes e a sobrevivência das plantas, de cada uma das três espécies estudadas, foram afetadas por somente um fator: a radiação gama recebida pelas sementes; os demais fatores que influem sobre a radiosensitividade, enumerados por LYNN (1967), não foram levados em consideração neste experimento.

As medições das alturas das mudas aos 45 e 60 dias após a semeadura, indicaram que as plantas do tratamento com 30 KR apresentaram crescimento médio superior às plantas do tratamento com 20 KR. SARIC (1958) verificou que, com o aumento das dosagens de radiação gama recebida pelas sementes, há um decréscimo proporcional do crescimento das plantas de milho, trigo, centeio e cevada. Provavelmente, o maior crescimento das plantas das três espécies de Eucalyptus originadas de sementes irradiadas com 30 KR, não foi uma consequência dos efeitos da radiação gama. JOHNSTONE e KLEPINGER (1967) não deram uma explicação ao fato das plantas de Yucca

brevifolia Engl., originadas de sementes irradiadas com uma dosagem correspondente a LD<sub>50</sub>, apresentarem um desenvolvimento superior às plantas dos tratamentos com dosagens menores de radiação.

A provável explicação que pode ser dada para o maior desenvolvimento das plantas originadas de sementes irradiadas com 30 KR, é a competição entre as plantas: a competição entre as plantas nos outros tratamentos (0, 10, 20 e 40 KR) foi diferente da competição entre as plantas do tratamento com 30 KR.

Cada parcela do experimento constou de 100 sementes e, se houvesse 100% de germinação, cada plantinha disporia de uma área aproximada de 12 cm<sup>2</sup>. No início do desenvolvimento das plantas não havia, praticamente, uma competição entre as plantas, mas, com o crescimento das mesmas, a competição entre elas foi se manifestando com maior intensidade nos tratamentos onde a taxa de germinação foi maior.

Os resultados apresentados na tabela nº 15 mostram os dados relativos a uma comparação entre as alturas médias das plantas aos 45 e aos 60 dias após a semeadura. Nota-se que, quanto maior a dosagem de radiação recebida pelas sementes, tanto maior foi a diferença percentual entre a altura das plantas nas duas medições realizadas.

Portanto, verificou-se que a competição entre as plantas é mais intensa nos tratamentos onde a porcentagem de germinação foi maior. Verificou-se também, que no tratamento com 40 KR, não chegou a haver uma competição entre as plantas, pois, provavelmente, o efeito da radiação sobre as sementes foi tão acentuado, que as plantas não chegaram a se desenvolver até uma determinada altura a partir da qual se verificaria a competição entre elas.

No entanto, não se pode afirmar categoricamente, que a competição entre as plantas foi a causa do maior desenvolvimento das mudas originadas de sementes tratadas com 30 KR; isto poderia ser provado num outro experimento, onde a semeadura fosse menos densa.

Não encontramos na literatura consultada nenhuma citação para explicar o maior crescimento das plantas originadas de sementes irradiadas com 30 KR, como sendo uma consequência direta dos efeitos da radiação gama.

Os resultados das medições das alturas das plantas indicaram que, quanto maior for a dosagem de radiação gama recebida pelas sementes das três espécies de Eucalyptus, tanto maior será a variabilidade nas alturas das plantas. Provavelmente, esta maior variabilidade é uma consequência dos efeitos causados pela radiação gama nas sementes irradiadas.

## 6.2. EFEITOS DOS MUTAGÊNICOS QUÍMICOS

Os resultados das contagens do número de plantas sobreviventes e das medições das alturas das mudas indicaram as concentrações das soluções de mutagênicos químicos e os tempos de tratamento das sementes a serem empregadas num programa de mutações induzidas.

As pesquisas realizadas por vários cientistas, segundo a literatura consultada, mostraram que não é possível estabelecer uma relação entre a taxa de mutações induzidas e a taxa de germinação das sementes submetidas ao tratamento com soluções de mutagênicos químicos.

Segundo KONZAK et al. (1965), a eficiência mutagênica de um agente químico depende de uma série de fatores; destes fatores, foram analisados, neste experimento, somente os três seguintes: espécies (três), concentrações das soluções de mutagênicos (duas) e tempos de tratamento das sementes (dois).

Para cada um dos cinco mutagênicos químicos estudados, verificou-se que a porcentagem de plantas sobreviventes aos 60 dias após a semeadura, variou para as três espécies estudadas de Eucalyptus, para as duas concentrações das soluções e para os dois tempos de tratamento das sementes.

Em programas de indução de mutações pela radiação gama,

emprega-se a LD<sub>50</sub> como dosagem ideal para se obter uma grande eficiência mutagênica. Os tratamentos indicados para os mutagênicos químicos, correspondem, aproximadamente, as LD<sub>30</sub> a LD<sub>50</sub>, segundo a literatura consultada.

Os tratamentos de sementes das três espécies de Eucalyptus indicados a seguir, para os cinco mutagênicos químicos, baseiam-se na premissa de que as LD<sub>30</sub> a LD<sub>50</sub> correspondem aproximadamente aos tratamentos que produzam uma taxa máxima de mutações:

Óxido de etileno - Os tratamentos das sementes de E. tetricornis com soluções a 0,15% durante 4 horas ou com soluções a 0,30% durante 2 horas, são os indicados, com base nos nossos resultados experimentais. As soluções de óxido de etileno com concentrações maiores que 0,30% e os tempos de tratamento mais longos que 4 horas, provavelmente serão muito tóxicos à semente.

Para o E. citriodora são indicados os tratamentos das sementes com soluções a 0,15% ou 0,30% durante 4 horas. O tratamento das sementes durante 2 horas provavelmente não será eficiente. O tratamento indicado para o E. maculata é com soluções de óxido de etileno a 0,30% durante 4 horas; talvez possam ser usadas soluções um pouco mais concentradas que 0,30%.

Etileneimina - O tratamento das sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus com soluções de etileneimina a 0,08% durante 6 horas é o mais indicado, com base nos nossos dados experimentais. Talvez possam ser empregadas soluções um pouco mais concentradas que 0,08%.

As soluções de etileneimina a 0,05%, utilizadas por KERR e GUIMARÃES (1961), mostraram ser pouco concentradas, pois não houve qualquer efeito sobre a sobrevivência das plantas.

Sulfato de dietilo - O tratamento das sementes de E. tetricornis com soluções a 0,30% durante 2 horas é o indicado; talvez possam ser usadas soluções um pouco mais concentradas que 0,30%.

Para o E. citriodora, o tratamento indicado é com soluções de sulfato de dietilo a 0,30% durante 4 horas. Para o E. macu-



lata é indicado também êste tratamento.

Metanosulfonato de etilo - O tratamento indicado para as sementes de E.tereticornis é com soluções a 0,50% durante 12 horas. Para o E.citriodora, são indicados os tratamentos com soluções a 0,25% ou 0,50% durante 12 ou 24 horas; com base nos nossos resultados experimentais, qualquer um dêstes quatro tratamentos pode ser indicado num programa de indução de mutações. O tratamento das sementes de E.maculata com soluções a 0,50% durante 12 ou 24 horas é o indicado.

Epicloridrina - O tratamento indicado para as sementes de E.tereticornis é com soluções a 0,15% durante 2 horas ou com soluções um pouco menos concentradas que 0,15%. Para o E.citriodora, são indicados os tratamentos com soluções de epicloridrina a 0,15% durante 4 horas ou com soluções a 0,30% durante 2 horas. O tratamento indicado para o E.maculata é com soluções a 0,15% durante 2 horas; talvez possam ser usadas soluções um pouco mais concentradas que 0,15%.

Os tratamentos de sementes de arroz com mutagênicos químicos, indicados por GUSTAFSSON e GADD (1966), são semelhantes àquêles indicados para as três espécies de Eucalyptus, neste experimento.

A etileneimina parece estimular o crescimento das plantas de eucalipto originadas de sementes tratadas, pois com o aumento do período de tratamento aumenta a altura média das plantas, em relação às testemunhas. Da mesma forma, o sulfato de dietilo e o metanosulfonato de etilo parecem induzir um crescimento mais vigoroso das plantas.

Provavelmente, êste estímulo no crescimento das plantas originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos não é causado por fatores genéticos (oriundos de mutações), de acôrdo com MICKE (1958); as soluções de mutagênicos químicos provavelmente aloteram algum processo fisiológico da semente ou do "seedling" o que causa um maior crescimento das plantas.

As medições das alturas das plantas das três espécies de

Eucalyptus, indicaram que a variabilidade das alturas das plantas originadas de sementes tratadas com os cinco mutagênicos químicos, não difere, de um modo geral, da variabilidade das alturas das tes temunhas.

No entanto, os nossos dados não são suficientes para se fazer uma comparação entre as variabilidades acima citadas: foram testadas somente duas concentrações de soluções e dois tempos de tratamento, para cada um dos cinco mutagênicos químicos; além disso, as plantas medidas eram jovens (60 dias) e não apresentavam uma variabilidade grande nas alturas.

Os resultados dos efeitos dos mutagênicos químicos sobre a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas originadas de sementes tratadas, nos indicam que as sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus apresentam diferentes sensibilidades aos cinco agentes químicos empregados neste experimento.

### 6.3. A RADIOSENSITIVIDADE E O VOLUME NUCLEAR

Os resultados das medições dos volumes dos núcleos de células meristemáticas de raízes indicam que há uma relação com as  $LD_{50}$  das três espécies estudadas de Eucalyptus.

Entretanto, comparando-se as radiosensitividades das três espécies com os respectivos volumes nucleares, verificou-se que não há uma relação proporcional entre essas duas variáveis, conforme é mostrado a seguir:

O E.tereticornis, o E.citriodora e o E.maculata apresentam volumes nucleares médios das células meristemáticas de raízes, de  $31 \mu^3$ ,  $18 \mu^3$  e  $16 \mu^3$ , respectivamente; suas  $LD_{50}$  são: 13,2 KR, 19,6 KR e 25,2 KR, respectivamente. Notou-se, portanto, que o E.citriodora apresenta uma  $LD_{50}$  intermediária entre as  $LD_{50}$  das duas outras espécies; no entanto, o volume nuclear do E.citriodora é menor que a média dos volumes nucleares das outras duas espécies.

Segundo os nossos resultados experimentais, as medições dos volumes nucleares de células meristemáticas de raízes não são

suficientes para se predizer as  $LD_{50}$  das três espécies estudadas de Eucalyptus. MYKSCHÉ e RUDOLPH (1968) chegaram a mesma conclusão, baseados num trabalho realizado com nove ginóspérmicas.

O Eucalyptus obliqua apresenta um volume nuclear médio das células meristemáticas de raízes de  $88 \mu^3$ , segundo SPARROW, ROGERS e SCHWEMMER (1968); este volume nuclear observado é bem maior do que aqueles verificados nas três espécies estudadas de Eucalyptus. A  $LD_{50}$  do E.obliqua, segundo os mesmos autores, é de 4,3 KR; esta espécie apresenta, portanto, sementes muito mais radiosensíveis do que as sementes das três espécies estudadas no nosso experimento.

As medições dos volumes dos núcleos de células iniciais de gêmulas do embrião de sementes, indicam que não há uma relação com as  $LD_{50}$ , para as três espécies estudadas de Eucalyptus. Verificou-se que o E.maculata apresenta um volume nuclear e uma  $LD_{50}$  maiores do que nas outras duas espécies.

Segundo os nossos dados experimentais, as medições dos volumes dos núcleos das células iniciais de gêmulas do embrião das sementes, não são suficientes para se predizer as  $LD_{50}$  das três espécies de Eucalyptus. Estes resultados contrariam aqueles obtidos por OSBORNE e LUNDEN (1965); estes autores verificaram que se pode predizer a  $LD_{50}$  com base nas medições dos volumes nucleares de células iniciais, de acordo com um estudo realizado com doze angiospérmicas.

#### 6.4. A OBTENÇÃO DE MUTANTES NA GERAÇÃO $M_1$

As quimeras albinas observadas em folhas de plantas originadas de sementes tratadas com agentes mutagênicos, provavelmente são consequências de simples alterações fenotípicas (e não genotípicas); segundo MICKE (1958) e BRITO DA CUNHA (1966), as mutações raramente se manifestam em  $M_1$ .

Provavelmente, a maioria das modificações observadas nas plantas (folhas e ramos retorcidos e pequenos, deficiências de

clorofila) não foram consequência de alterações genéticas (oriundas de mutações induzidas). Isto poderia ser provado, autofecundando-se as plantas  $M_1$  e observando-se a progênie  $M_2$ .

A morte das plantas originadas de sementes tratadas com altas dosagens de radiação gama e com soluções muito concentradas de mutagênicos químicos, provavelmente foi uma consequência de danos letais causados às estruturas extranucleares, alterando alguns processos fisiológicos vitais às plantas. Talvez algumas plantas morreram em consequência de mutações gênicas letais, mas os nossos resultados experimentais não podem comprovar isto.

Do mesmo modo, a baixa taxa de germinação das sementes submetidas a determinados tratamentos com agentes mutagênicos, também pode ter sido uma consequência de danos letais causados a estruturas extranucleares ou de mutações deletérias induzidas; segundo BRITO DA CUNHA (1966), a maioria das mutações são recessivas.

Os resultados das medições das alturas das plantas indicaram que, quanto maior a dosagem de radiação gama recebida pelas sementes das três espécies de Eucalyptus, tanto maior será a variabilidade das alturas. Provavelmente esta maior variabilidade nas alturas das plantas é uma consequência de alterações fenotípicas e não um efeito de possíveis mutações induzidas, de acordo com o trabalho de MICKE (1958).

A variabilidade das alturas das plantas originadas de sementes tratadas com os mutagênicos químicos estudados, não diferiu da variabilidade das alturas das testemunhas. No entanto, os nossos dados experimentais, são insuficientes para se fazer uma comparação entre as variabilidades das alturas das plantas, entre os tratamentos.

As sementes de E.tereticornis empregadas neste experimento foram colhidas de diversas árvores de um povoamento, enquanto que as sementes de E.citriodora e de E.maculata foram colhidas de uma única árvore. Dever-se-ia, portanto, esperar uma maior variabilidade nas alturas das plantas de E.tereticornis, pois es-

tas, teòricamente, deveriam apresentar uma maior variabilidade ge  
nética. A variabilidade das alturas das plantas não diferiu nas  
três espécies estudadas de Eucalyptus.

∴

## 7. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho tem por finalidade expor a metodologia a ser empregada num programa de indução de mutações por radiação gama e por mutagênicos químicos, em Eucalyptus. As três espécies estudadas foram: E.tereticornis Sm., E.citriodora Hook. e E.maculata Hook.

As sementes das três espécies foram tratadas com as seguintes doses de radiação gama: 0 (contrôle), 10, 20, 30 e 40 KR. Os tratamentos das sementes com soluções de mutagênicos químicos foram os seguintes:

<u>mutagênicos químicos</u>	<u>concentração da solução</u>	<u>tempo de tratamento</u>
Óxido de etileno	0,15% e 0,30%	2 e 4 horas
Etileneimina	0,04% e 0,08%	3 e 6 horas
Sulfato de dietilo	0,30% e 0,60%	2 e 4 horas
Metanosulfonato de etilo	0,25% e 0,50%	12 e 24 horas
Epicloridrina	0,15% e 0,30%	2 e 4 horas

As sementes das três espécies de Eucalyptus tratadas com os agentes mutagênicos foram semeadas em caixas coletivas de madeira com uma mistura de terra, areia e estêrco esterilizados; o experimento foi instalado na casa de vidro do Instituto de Genética, em Piracicaba.

Aos 60 dias após a semeadura foi determinado o número de plantas vivas nos vários tratamentos. Com base nos resultados destas contagens determinaram-se os tratamentos que podem ser indicados para um programa de indução de mutações, para as três espécies estudadas de Eucalyptus.

A LD<sub>50</sub> (dose letal 50%) foi empregada para se estimar o tratamento indicado num programa de mutações induzidas por radiação gama; para os mutagênicos químicos, os tratamentos indicados correspondem aproximadamente as LD<sub>30</sub> a LD<sub>50</sub>.

Aos 45 e 60 dias após a semeadura foram realizadas medições das alturas das plantas. Essas medições serviram para es-

timar se os tratamentos das sementes com agentes mutagênicos aumentam a variabilidade fenotípica em  $M_1$ .

Para se verificar se havia ou não alguma relação do volume nuclear com a radiosensitividade de uma determinada espécie, foram medidos os volumes nucleares médios de dois tipos de células, nas três espécies de Eucalyptus: células meristemáticas de raízes e células iniciais de gêmulas do embrião de sementes.

Verificou-se a presença de algumas plantas com quimeras albinas, fôlhas com colorações diferentes das normais, fôlhas e ramos disformes etc.. Estas alterações fenotípicas foram observadas em plantas originadas de sementes tratadas com agentes mutagênicos.

Os resultados obtidos podem ser resumidos nos seguintes tópicos:

1) Segundo os dados experimentais a  $LD_{50}$  do E.tereticornis é de  $13,2 \pm 2,7$  KR, a  $LD_{50}$  do E.citriodora é de  $19,6 \pm 3,1$  KR e a  $LD_{50}$  do E.maculata é de  $25,2 \pm 3,2$  KR. Estas são as dosagens de radiação gama recomendadas para um programa de indução de mutações, para as três espécies de Eucalyptus, de acôrdo com os nossos resultados experimentais.

2) Quanto maior fôr a dosagem de radiação gama recebida pelas sementes de eucalipto, menor será o desenvolvimento das plantas. O fato das plantas originadas de sementes irradiadas com 30 KR terem um desenvolvimento superior às plantas dos tratamentos com 20 KR, pode ser explicado pela competição entre as mudas, dentro da caixa coletiva.

3) Quanto maior fôr a dosagem de radiação gama recebida pelas sementes, tanto maior será a variabilidade na altura das plantas originadas dessas sementes.

4) Para um programa de mutações induzidas por mutagênicos químicos são indicados os seguintes tratamentos das sementes:

Óxido de etileno - tratamento com soluções a 0,30% durante 2 horas ou com soluções a 0,15% durante 4 horas, para o

E.tereticornis; tratamento com soluções a 0,15% ou 0,30% durante 4 horas, para o E.citriodora; tratamento com soluções a 0,30% durante 4 horas, para o E.maculata.

Etileneimina - tratamento com soluções a 0,08% durante 6 horas, para as três espécies de Eucalyptus.

Sulfato de dietilo - tratamento com soluções a 0,30% durante 2 horas, para o E.tereticornis e tratamento com soluções a 0,30% durante 4 horas para o E.citriodora e para o E.maculata.

Metanosulfonato de etilo - tratamento com soluções a 0,50% durante 12 horas, para o E.tereticornis e para o E.maculata; tratamento com soluções a 0,25% ou 0,50% durante 12 ou 24 horas, para o E.citriodora.

Epicloridrina - tratamento com soluções a 0,30% durante 2 horas, para o E.tereticornis e tratamento com soluções a 0,30% durante 4 horas, para o E.citriodora e o E.maculata.

5) O tratamento das sementes das três espécies de Eucalyptus com soluções de etileneimina, com sulfato de dietilo e com metanosulfonato de etilo estimula o desenvolvimento das plantas, com base nas medições em altura das plantas dos diversos tratamentos, em relação às testemunhas. Convém lembrar que o estímulo no crescimento das plantas causado pelas três drogas citadas talvez não se manifeste em outras condições experimentais.

6) As sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus apresentam diferentes sensibilidades aos cinco agentes químicos empregados neste experimento.

7) A variabilidade na altura das plantas originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos não diferiu da variabilidade na altura das plantas testemunhas.

8) Comparando-se as três espécies estudadas de Eucalyptus, a variabilidade das alturas das plantas originadas de sementes tratadas com radiação gama e com mutagênicos químicos não diferiu entre si.

9) De acordo com os nossos resultados experimentais, não



é possível prever-se a radiosensitividade das sementes das três espécies estudadas de Eucalyptus, com base nas medições dos volumes nucleares de células meristemáticas de raízes e de células iniciais de gêmulas do embrião de sementes.

10) As quimeras albinas, as folhas e ramos deformados observados em plantas originadas de sementes tratadas com agentes mutagênicos, provavelmente são simples alterações fenotípicas e não efeitos de mutações gênicas; as mutações gênicas recessivas manifestam-se na geração  $M_2$ .

•••

8. SUMMARY

Seeds of three Eucalyptus species were treated with gamma rays and chemical mutagens. We studied the following species: Eucalyptus tereticornis Sm., E.citriodora Hook. and E.maculata Hook.

The doses of gamma rays used were: 0 (control), 10, 20, 30 and 40 KR. Seeds of three species were treated with these chemical mutagens solutions:

<u>chemical mutagens</u>	<u>concentration of solution</u>	<u>time of treatment</u>
Ethylene oxide	0,15% - 0,30%	2 and 4 hours
Ethyleneimine	0,04% - 0,08%	3 and 6 hours
Diethyl sulphate	0,30% - 0,60%	2 and 4 hours
Ethylmethane sulphonate	0,25% - 0,50%	12 and 24 hours
Epicloridrine	0,15% - 0,30%	2 and 4 hours

The LD<sub>50</sub> (lethal dose 50%) was employed to estimate the best dose of gamma rays in an induced mutation program. The LD<sub>30</sub> - LD<sub>50</sub> were used for the chemical mutagens. The lethal dose were determined from survival curves fitted by probit approximation.

Survival of seedlings from irradiated seed 60 days after sowing showed E.tereticornis to be the most radiosensitive with a LD<sub>50</sub> of 13,2 ± 2,7 KR and E.maculata the most radioresistant with a LD<sub>50</sub> of 25,2 ± 3,2 KR. E.citriodora showed a LD<sub>50</sub> of 19,8 ± 3,1 KR.

The best treatments for an induced mutation program with five mutagenic agents and two Eucalyptus species were obtained 60 days after sowing. The percentage of survival decreased with increasing concentration and time of treatment with the five chemical mutagens.

Seedling height were measured 45 and 60 days after sowing. This was made to prove that the mutagenic treatment increased the phenotypic variability in M<sub>1</sub>.

Interphase nuclear volumes were calculated from measu-

rements of root meristems nuclei and initial cells of terminal apex region in dormant embryo seed nuclei. No correlation between radiosensitivity ( $LD_{50}$ ) and nuclear volume was found. Thus, more precise radiosensitivity prediction methods for Eucalyptus seed must be devised.

Some plants with chlorotic chimaeras leaves, tortuous branches, etc., were observed.

The following conclusions are afforded:

1) E.tereticornis showed a  $LD_{50}$  of  $13,2 \pm 2,7$  KR; E.citriodora showed a  $LD_{50}$  of  $19,6 \pm 3,1$  KR and E.maculata showed a  $LD_{50}$  of  $25,2 \pm 3,2$  KR. These are the doses of gamma rays for an induced mutation program.

2) The seedlings height decreased proportionally with the increasing doses of gamma rays.

3) The following treatments with chemical mutagens are indicated for an induced mutation program:

Ethylene oxide: 0,30% - 2 hours or 0,15% - 4 hours, for E.tereticornis; 0,15% or 0,30%, 4 hours, for E.citriodora; 0,30% - 4 hours, for E.maculata.

Ethyleneimine: 0,08% - 6 hours, for the 3 species.

Diethyl Sulphate: 0,30% - 2 hours, for E.tereticornis; 0,30% - 4 hours, for E.citriodora and E.maculata.

Ethylmethane sulphonate: 0,50% - 12 hours, for E.tereticornis and E.maculata; 0,25% or 0,50%, 12 or 24 hours, for E.citriodora.

Epicloridrine: 0,30% - 2 hours, for E.tereticornis; 0,30% - 4 hours, for E.citriodora and E.maculata.

4) Treatment of Eucalyptus seeds with ethyleneimine, diethyl sulphate and ethylmethane sulphonate stimulate seedling development.

5) Seeds of three Eucalyptus species showed different

sensitivities to several chemical mutagens.

6) Seedling height variability is greater on the higher gamma rays dose treatments.

7) Seedling height variability is uniform in all treatments with chemical mutagens.

8) No correlation between radiosensitivity ( $LD_{50}$ ) and nuclear volume was found. We cannot use this radiosensitivity prediction method for Eucalyptus.

9) The chlorotic chimaeras and other modifications in  $M_1$  plants are probably phenotypical and not genotypical alterations. Recessive mutations generally appear on  $M_2$  plants.

10) Seedling height variability of the three Eucalyptus species was not different, comparing the treatment with gamma rays and chemical mutagens.

∴

9. LITERATURA CITADA

- BANDEL, G. 1967. Indução de mutações em eucalipto. Relatório semestral nº 2, da bolsa de aperfeiçoamento da FAPESP, Instituto de Genética, Piracicaba, pp. 1 a 22 (não publicado).
- BANDEL, G., J.T.A.GURGEL e A.ANDO. 1968. Indução de mutações pela radiação gama em essências florestais. Resumo mimeografado do trabalho apresentado no I Congresso Florestal Brasileiro, realizado em Curitiba, Paraná, setembro de 1968, 2 pp. (não publicado).
- BRITO DA CUNHA, A. 1966. As bases genéticas da evolução. In: PAVAN, C. e A.BRITO DA CUNHA, Elementos de Genética, 2a. edição, Editora Nacional, São Paulo, pp. 344-375.
- CAPELLA, J.A. e A.D.CONGER. 1967. Radiosensitivity and interphase chromosome volume in gymnosperms. Radiation Botany, 7(1): 137-151.
- CARVALHO, A., L.C.MÔNACO e C.A.KRUG. 1966. Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: PAVAN, C. e A.BRITO DA CUNHA, Elementos de Genética, 2a. edição, Editora Nacional, São Paulo, pp. 587-648.
- DUBININ, N.P. 1964. Problems of radiation genetics. Oliver & Boyd, Edinburgh & London, 445 pp.
- EHRENBERG, L., A.GUSTAFSSON e U.LUNDQVIST. 1959. The mutagenic effects of ionizing radiations and reactive ethylene derivatives in barley. Hereditas, 45(2): 351-369.
- EHRENBERG, L., A.GUSTAFSSON e U.LUNDQVIST. 1961. Viable mutants induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. Hereditas, 47(2): 243-283.
- EHRENBERG, L. et al. 1965. Variation in quantitative and biochemical characters in barley after mutagenic treatments. The use of induced mutation in plant breeding. Suplemento de Radiation Botany, 5: 478-496.

- GRAYBILL, F.A. 1961. An introduction to linear statistical models, vol. I, MacGraw-Hill Book Company, Inc., N.Y., 463 pp.
- GUSTAFSSON, A. e I.GADD. 1966. Mutations and crop improvement - I. the genus Oriza L. Hereditas, 55(2): 273-357.
- JOHNSTONE, G.R. e F.W.KLEPINGER. 1967. The effects of gamma irradiation on germination and seedling development of Yucca brevifolia Engl. Radiation Botany, 7(5): 385-389.
- KERR, W.E. e R.F.GUIMARÃES. 1961. Progresso nas pesquisas de genética e melhoramento em Eucalyptus. Trabalho mimeografado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, de Rio Claro, 9 pp. (não publicado).
- KONZAK, C.F. et al. 1965. Efficient chemical mutagenesis. The use of induced mutations in plant breeding. Suplemento de Radiation Botany, 5: 49-70.
- LYNN, M. 1967. Ionizing radiations in forests and forestry. Forestry Abstracts, 28(1): 1-15.
- MICKE, A. 1958. Mutationszüchtung beim weissen Steinklee (Melilotus albus) mit Hilfe von Roentgenstrahlen. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, 39(4): 419-437.
- MYKSCHE, J.O. e T.D.RUDOLPH. 1968. Use of nuclear variables to investigate radiosensitivity of gymnosperm seeds. Radiation Botany, 8(2): 187-193.
- NAVARRO DE ANDRADE, E. 1961. O Eucalipto, 2a. edição, Cia. Paulista de Estradas de Ferro, Rio Claro, 648 pp.
- NILAN, R.A. et al. 1963. Chemical mutagenesis in barley. Proceedings of the first international barley congress, Wageningen, 35-54.
- OSBORNE, T.S. e A.O.LUNDEN. 1965. Prediction of seed radiosensitivity from embryo structure. The use of induced mutations in plant breeding. Suplemento de Radiation Botany, 5:133-149.

- PENFOLD, A.R. e J.L.WILLIS. 1961. The Eucalyptus. World Crop Series. Leonard Hill Ltd. London. 551 pp.
- SARIC, M.R. 1958. The dependence of irradiation effects in seed on the biological properties of the seed. *Isotopes in Agriculture*, 27: 233-249.
- SPARROW, A.H., A.F.ROGERS e S.S.SCHWEMMER. 1968. Radiosensitivity studies with woody plants - I. Acute gamma irradiation survival data for 190 species. *Radiation Botany*, 8(2): 149-187.
- STEEL, R.G.D. e J.H.TORRIE. 1960. Principles and procedures of statistics. MacGraw-Hill Book Company, Inc. N.Y. 481 pp.
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N.W. 1934. The experimental production of mutation. *Biol. Rev.* 9(4): 411-457. Trabalho não consultado, citado em YAMAGUCHI (1968).
- YAMAGUCHI, H. 1968. Radiação aplicada na agricultura. Publicação Didática nº 12, do Instituto de Genética, Piracicaba, 118 pp.

•••

Tabela nº 1 - Esquema geral do experimento de indução de mutações em eucalipto pela radiação gama. Cada número de tratamento corresponde a uma parcela de 100 sementes.

<u>E.tereticornis</u>		<u>E.citriodora</u>		<u>E.maculata</u>	
Nº do tratamento	tratamento	Nº do tratamento	tratamento	Nº do tratamento	tratamento
1	testemunha	25	testemunha	49	testemunha
2	testemunha	26	testemunha	50	testemunha
3	testemunha	27	testemunha	51	testemunha
4	testemunha	28	testemunha	52	testemunha
5	testemunha	29	testemunha	53	testemunha
6	testemunha	30	testemunha	54	testemunha
7	testemunha	31	testemunha	55	testemunha
8	testemunha	32	testemunha	56	testemunha
9	10.000 R	33	10.000 R	57	10.000 R
10	10.000 R	34	10.000 R	58	10.000 R
11	10.000 R	35	10.000 R	59	10.000 R
12	10.000 R	36	10.000 R	60	10.000 R
13	20.000 R	37	20.000 R	61	20.000 R
14	20.000 R	38	20.000 R	62	20.000 R
15	20.000 R	39	20.000 R	63	20.000 R
16	20.000 R	40	20.000 R	64	20.000 R
17	30.000 R	41	30.000 R	65	30.000 R
18	30.000 R	42	30.000 R	66	30.000 R
19	30.000 R	43	30.000 R	67	30.000 R
20	30.000 R	44	30.000 R	68	30.000 R
21	40.000 R	45	40.000 R	69	40.000 R
22	40.000 R	46	40.000 R	70	40.000 R
23	40.000 R	47	40.000 R	71	40.000 R
24	40.000 R	48	40.000 R	72	40.000 R



Tabela nº 2 - Esquema ilustrativo da distribuição dos tratamentos nos blocos: experimento de indução de mutações em eucalipto pela radiação gama. Cada número de tratamento corresponde a uma parcela de 100 sementes.

<u>E.tereticornis</u>			
1º bloco	2º bloco	3º bloco	4º bloco
1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20
21	22	23	24

<u>E.citriodora</u>			
1º bloco	2º bloco	3º bloco	4º bloco
25	26	27	28
29	30	31	32
33	34	35	36
37	38	39	40
41	42	43	44
45	46	47	48

<u>E.maculata</u>			
1º bloco	2º bloco	3º bloco	4º bloco
49	50	51	52
53	54	55	56
57	58	59	60
61	62	63	64
65	66	67	68
69	70	71	72

Tabela nº 3 - Esquema do experimento de indução de mutações em eucalipto por mutagênicos químicos. Cada número de tratamento corresponde a uma parcela de 100 sementes.

Tratamentos	Número dos tratamentos											
	<u>E. tereticornis</u>			<u>E. citriodora</u>			<u>E. maculata</u>					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Testemunha	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264
	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276
	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288
<u>Óxido de Etileno</u>												
0,15 % - 2 h	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0,15 % - 4 h	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
0,30 % - 2 h	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0,30 % - 4 h	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
<u>Etileneimina</u>												
0,04 % - 3 h	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
0,04 % - 6 h	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
0,08% - 3 h	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
0,08 % - 6 h	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108

(continua)

Tabela nº 3 (continuação)

Tratamentos	Número dos tratamentos			
	<u>E. teretiacornis</u>	<u>E. citriodora</u>	<u>E. maculata</u>	
<u>Sulfato de Dietilo</u>				
0,30 % - 2 h	109 110 111 112	113 114 115 116	117 118 119 120	
0,30 % - 4 h	121 122 123 124	125 126 127 128	129 130 131 132	
0,60 % - 2 h	133 134 135 136	137 138 139 140	141 142 143 144	
0,60 % - 4 h	145 146 147 148	149 150 151 152	153 154 155 156	
<u>Metanosulfonato de Etilo</u>				
0,25 % - 12 h	157 158 159 160	161 162 163 164	165 166 167 168	
0,25 % - 24 h	169 170 171 172	173 174 175 176	177 178 179 180	
0,50 % - 12 h	181 182 183 184	185 186 187 188	189 190 191 192	
0,50 % - 24 h	193 194 195 196	197 198 199 200	201 202 203 204	
<u>Epicloridrina</u>				
0,15 % - 2 h	205 206 207 208	209 210 211 212	213 214 215 216	
0,15 % - 4 h	217 218 219 220	221 222 223 224	225 226 227 228	
0,30 % - 2 h	229 230 231 232	233 234 235 236	237 238 239 240	
0,30 % - 4 h	241 242 243 244	245 246 247 248	249 250 251 252	

Tabela nº 4 - Esquema ilustrativo da distribuição dos tratamentos nos blocos: experimento de indução de mutações em eucalipto por mutagênicos químicos. Cada número de tratamento corresponde a uma parcela de 100 sementes.

---

<u>1º bloco</u>						<u>2º bloco</u>					
265	37	209	213	53	97	98	254	274	206	166	126
249	185	205	117	77	29	78	18	6	118	186	146
149	145	177	229	25	33	26	14	2	178	102	142
121	221	169	101	273	85	94	222	278	170	106	154
245	241	201	73	1	89	66	30	46	190	82	114
243	129	157	81	9	281	70	54	22	194	74	218
125	225	189	105	257	269	58	34	42	162	38	226
217	153	161	49	45	261	270	50	122	202	266	242
141	113	181	65	21	5	282	62	110	182	250	134
237	137	173	57	41	277	10	90	214	198	150	234
109	193	197	69	93	17	262	86	210	158	130	138
233	133	165	285	61	13	258	286	230	174	246	238
<u>3º bloco</u>						<u>4º bloco</u>					
123	227	179	103	275	67	100	48	276	232	168	140
223	131	195	83	7	87	36	40	8	120	188	112
147	155	203	75	263	91	56	24	260	172	108	124
127	115	191	55	259	287	52	16	4	180	104	248
219	139	159	99	255	283	64	76	256	160	84	244
143	235	183	31	267	11	92	28	268	192	32	228
239	211	163	27	39	3	60	80	44	196	224	144
135	111	175	95	252	279	284	96	20	204	148	156
207	215	199	63	15	47	288	68	236	184	132	240
251	119	167	59	79	23	12	72	136	164	128	216
151	231	187	71	35	19	280	88	212	176	116	16
247	171	107	271	51	152	264	272	208	200	220	24

---

Tabela nº 5 - Porcentagem de sobrevivência das plantas originadas de sementes irradiadas, 60 dias após a semeadura.

<u>E. tereticornis</u>		<u>E. citriodora</u>		<u>E. maculata</u>	
Tratamento	sobrevivência (%)	Tratamento	sobrevivência (%)	Tratamento	sobrevivência (%)
1. testem.	87	25. testem.	84	49. testem.	90
2. testem.	89	26. testem.	93	50. testem.	89
3. testem.	90	27. testem.	85	51. testem.	93
4. testem.	86	28. testem.	85	52. testem.	90
5. testem.	90	29. testem.	90	53. testem.	93
6. testem.	87	30. testem.	86	54. testem.	85
7. testem.	92	31. testem.	84	55. testem.	90
8. testem.	86	32. testem.	88	56. testem.	87
9. 10 KR	53	33. 10 KR	78	57. 10 KR	73
10. 10 KR	55	34. 10 KR	70	58. 10 KR	79
11. 10 KR	45	35. 10 KR	66	59. 10 KR	80
12. 10 KR	48	36. 10 KR	69	60. 10 KR	70
13. 20 KR	39	37. 20 KR	45	61. 20 KR	53
14. 20 KR	39	38. 20 KR	38	62. 20 KR	48
15. 20 KR	35	39. 20 KR	33	63. 20 KR	50
16. 20 KR	35	40. 20 KR	42	64. 20 KR	54
17. 30 KR	20	41. 30 KR	34	65. 30 KR	44
18. 30 KR	23	42. 30 KR	37	66. 30 KR	44
19. 30 KR	10	43. 30 KR	26	67. 30 KR	43
20. 30 KR	14	44. 30 KR	30	68. 30 KR	39
21. 40 KR	15	45. 40 KR	20	69. 40 KR	25
22. 40 KR	12	46. 40 KR	23	70. 40 KR	30
23. 40 KR	2	47. 40 KR	12	71. 40 KR	23
24. 40 KR	6	48. 40 KR	19	72. 40 KR	29

Tabela nº 6 - Porcentagem média da sobrevivência das plantas originadas de sementes irradiadas, 60 dias após a semeadura.

<u>E. tereticornis</u>		
tratamento	sobrevivência média (%)	sobrevivência média em relação a testemunha* (%)
testemunha	88,37 ± 2,20	100,00 ± 2,49
10.000 R	50,25 ± 4,58	56,86 ± 5,17
20.000 R	37,00 ± 2,31	41,87 ± 2,61
30.000 R	16,75 ± 5,85	18,95 ± 6,61
40.000 R	8,75 ± 5,85	9,90 ± 6,61
<u>E. citriodora</u>		
testemunha	86,87 ± 3,23	100,00 ± 3,71
10.000 R	70,75 ± 3,36	81,44 ± 3,86
20.000 R	39,50 ± 3,40	45,47 ± 3,91
30.000 R	31,75 ± 4,80	36,55 ± 5,52
40.000 R	18,50 ± 4,65	21,30 ± 5,35
<u>E. maculata</u>		
testemunha	89,62 ± 2,73	100,00 ± 3,06
10.000 R	75,50 ± 4,80	84,24 ± 5,38
20.000 R	51,25 ± 2,76	57,19 ± 3,09
30.000 R	42,50 ± 2,37	47,42 ± 2,65
40.000 R	26,75 ± 3,32	29,85 ± 3,72

(\*) - porcentagem de sobrevivência média das testemunhas = 100,00 %.

Tabela nº 7 - Análise da variância: efeitos da radiação gama sôbre a sobrevivência das plantas.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
entre blocos	3	0,0900	0,0300	6,45**
entre tratamentos	14	3,8084	0,2720	58,44**
erro	42	0,1955	0,0047	
total	59	4,0940		
entre espécies	2	0,4374	0,2187	46,98**
entre dosagens	4	3,0720	0,7680	164,99**
espécies x dosagens	8	0,2989	0,0373	8,03**

(\*\*) - significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela nº 8 - Análise da variância: regressão linear entre o logaritmo da porcentagem da sobrevivência das plantas em relação às testemunhas e as dosagens de radiação gama.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
<u>E. tereticornis</u>				
regressão linear	1	1,9486	1,9486	418,60 <sup>**</sup>
desvios da regressão	3	0,0425	0,0142	3,09 <sup>*</sup>
<u>E. citriodora</u>				
regressão linear	1	0,8586	0,8586	184,45 <sup>**</sup>
desvios da regressão	3	0,0194	0,0065	1,41 ns
<u>E. maculata</u>				
regressão linear	1	0,4898	0,4898	105,22 <sup>**</sup>
desvios da regressão	3	0,0122	0,0041	0,89 ns
regressão linear x esp.	2	0,2521	0,1260	27,07 <sup>**</sup>
demais interações	6	0,0469	0,0078	1,70 ns
erro	42	0,1955	0,0047	

(\*) - significativo ao nível de 5% de probabilidade

(\*\*) - significativo ao nível de 1% de probabilidade

(ns) - não significativo



Tabela nº 9 - Altura média das plantas originadas de sementes irradiadas, 45 dias após a semeadura.

Tratamento	Altura média das plantas aos 45 dias após a semeadura (cm)		
	<u>E.tereticornis</u>	<u>E.citriodora</u>	<u>E.maculata</u>
testemunha	16,55 ± 4,07	11,51 ± 3,70	11,11 ± 4,34
testemunha	12,10 ± 4,14	12,42 ± 2,88	10,29 ± 4,53
testemunha	12,42 ± 5,65	10,65 ± 2,84	10,76 ± 3,98
testemunha	17,45 ± 6,70	10,29 ± 3,67	9,59 ± 3,26
testemunha	15,20 ± 5,60	14,37 ± 3,34	16,64 ± 6,08
testemunha	18,44 ± 6,75	11,92 ± 3,26	10,16 ± 3,42
testemunha	12,41 ± 4,69	12,73 ± 3,52	12,17 ± 5,00
testemunha	13,71 ± 5,97	13,77 ± 3,63	9,70 ± 3,81
10.000 R	10,33 ± 5,19	13,77 ± 4,02	8,51 ± 3,35
10.000 R	10,48 ± 5,26	13,85 ± 3,62	11,19 ± 5,04
10.000 R	10,47 ± 4,19	14,31 ± 4,36	12,07 ± 5,46
10.000 R	7,53 ± 3,10	9,36 ± 2,49	10,07 ± 3,62
20.000 R	8,08 ± 3,97	6,71 ± 3,02	4,70 ± 2,41
20.000 R	4,34 ± 3,30	7,27 ± 3,81	4,31 ± 2,14
20.000 R	3,31 ± 2,22	6,28 ± 3,55	3,91 ± 1,90
20.000 R	2,95 ± 1,66	7,44 ± 3,37	5,41 ± 2,74
30.000 R	5,04 ± 3,95	10,35 ± 4,85	6,78 ± 3,11
30.000 R	6,84 ± 4,46	7,49 ± 2,66	7,29 ± 4,12
30.000 R	9,07 ± 4,66	14,41 ± 5,10	5,79 ± 3,15
30.000 R	7,26 ± 3,61	10,31 ± 2,86	6,58 ± 0,61
40.000 R	4,05 ± 2,94	5,93 ± 4,96	3,64 ± 2,64
40.000 R	3,28 ± 1,77	4,96 ± 4,17	3,03 ± 2,13
40.000 R	5,33 ± 3,88	4,84 ± 3,12	4,31 ± 2,46
40.000 R	3,25 ± 1,71	5,17 ± 2,22	2,97 ± 1,85

Tabela nº 10 - Efeitos da radiação gama sobre o desenvolvimento das plantas: a média das alturas das plantas originadas de sementes irradiadas, 45 dias após a semeadura.

Tratamento	altura média (cm)	altura média em relação à testemunha*
<u>E.tereticornis</u>		
testemunha	14,79 ± 5,53	100,00 ± 37,39
10.000 R	9,70 ± 4,42	65,58 ± 29,88
20.000 R	4,67 ± 2,92	31,58 ± 19,74
30.000 R	7,05 ± 4,19	47,67 ± 28,33
40.000 R	3,98 ± 2,73	26,91 ± 18,46
<u>E.citriodora</u>		
testemunha	12,21 ± 3,37	100,00 ± 27,60
10.000 R	12,82 ± 3,69	104,99 ± 30,22
20.000 R	6,93 ± 3,35	56,76 ± 27,44
30.000 R	10,64 ± 4,02	87,14 ± 32,92
40.000 R	5,23 ± 3,76	42,83 ± 30,79
<u>E.maculata</u>		
testemunha	11,30 ± 4,38	100,00 ± 38,76
10.000 R	10,46 ± 4,46	92,57 ± 39,47
20.000 R	4,58 ± 2,31	40,53 ± 20,44
30.000 R	6,61 ± 3,04	58,50 ± 26,90
40.000 R	3,49 ± 2,29	30,88 ± 20,27

(\*) - altura média das plantas testemunhas = 100,00

Tabela nº 11 - Altura média das plantas originadas de sementes irradiadas, 60 dias após a semeadura.

Tratamento	Altura média das plantas aos 60 dias após a semeadura (cm)		
	<u>E. tereticornis</u>	<u>E. citriodora</u>	<u>E. maculata</u>
testemunha	32,97 $\pm$ 17,98	20,52 $\pm$ 9,96	26,11 $\pm$ 12,18
testemunha	33,63 $\pm$ 15,59	23,91 $\pm$ 9,88	25,97 $\pm$ 15,70
testemunha	30,57 $\pm$ 15,27	19,92 $\pm$ 8,24	21,22 $\pm$ 9,06
testemunha	37,08 $\pm$ 15,83	19,67 $\pm$ 8,15	20,28 $\pm$ 10,25
testemunha	30,10 $\pm$ 12,88	18,78 $\pm$ 8,08	30,54 $\pm$ 14,49
testemunha	35,56 $\pm$ 16,25	21,02 $\pm$ 9,93	21,81 $\pm$ 10,86
testemunha	35,84 $\pm$ 14,32	27,52 $\pm$ 12,78	24,68 $\pm$ 11,92
testemunha	30,31 $\pm$ 14,91	24,26 $\pm$ 10,07	24,57 $\pm$ 13,35
10.000 R	23,11 $\pm$ 11,44	27,37 $\pm$ 11,01	16,64 $\pm$ 9,38
10.000 R	26,09 $\pm$ 15,15	25,19 $\pm$ 7,32	22,84 $\pm$ 15,10
10.000 R	28,02 $\pm$ 12,22	26,80 $\pm$ 10,42	25,00 $\pm$ 14,69
10.000 R	22,79 $\pm$ 10,58	18,94 $\pm$ 5,14	20,67 $\pm$ 10,40
20.000 R	26,83 $\pm$ 15,92	13,84 $\pm$ 6,04	13,98 $\pm$ 8,15
20.000 R	19,21 $\pm$ 18,19	14,05 $\pm$ 10,54	13,81 $\pm$ 7,96
20.000 R	8,63 $\pm$ 6,00	15,00 $\pm$ 8,63	15,14 $\pm$ 9,73
20.000 R	8,86 $\pm$ 8,03	19,31 $\pm$ 11,04	20,09 $\pm$ 10,77
30.000 R	17,80 $\pm$ 12,60	19,70 $\pm$ 9,80	16,68 $\pm$ 9,98
30.000 R	23,78 $\pm$ 14,01	18,54 $\pm$ 9,45	21,52 $\pm$ 13,43
30.000 R	34,20 $\pm$ 12,07	24,54 $\pm$ 10,58	15,28 $\pm$ 9,37
30.000 R	32,86 $\pm$ 23,52	22,90 $\pm$ 11,09	20,67 $\pm$ 11,58
40.000 R	4,60 $\pm$ 3,38	18,75 $\pm$ 16,90	12,96 $\pm$ 10,22
40.000 R	13,92 $\pm$ 7,20	14,65 $\pm$ 10,60	11,07 $\pm$ 11,45
40.000 R	12,00 $\pm$ 8,48	9,42 $\pm$ 5,47	15,83 $\pm$ 9,64
40.000 R	16,83 $\pm$ 5,55	9,79 $\pm$ 6,68	10,83 $\pm$ 8,03

Tabela nº 12 - Efeitos da radiação gama sôbre o desenvolvimento das plantas: a média das alturas das plantas originadas de sementes irradiadas, 60 dias após a sementeira.

Tratamento	altura média (cm)	altura média em re- lação à testemunha*
<u>E. tereticornis</u>		
testemunha	33,26 ± 15,43	100,00 ± 46,39
10.000 R	25,00 ± 12,46	75,17 ± 37,46
20.000 R	15,88 ± 13,08	47,75 ± 39,33
30.000 R	27,16 ± 16,23	81,66 ± 48,80
40.000 R	11,84 ± 6,44	35,60 ± 19,36
<u>E. citriodora</u>		
testemunha	21,95 ± 9,75	100,00 ± 44,42
10.000 R	24,58 ± 8,70	111,98 ± 39,63
20.000 R	15,55 ± 9,27	70,84 ± 42,23
30.000 R	21,42 ± 10,25	97,59 ± 46,70
40.000 R	13,15 ± 10,86	59,91 ± 49,48
<u>E. maculata</u>		
testemunha	24,40 ± 12,41	100,00 ± 50,86
10.000 R	21,29 ± 12,65	87,25 ± 51,84
20.000 R	15,76 ± 9,22	64,59 ± 37,69
30.000 R	18,54 ± 11,20	75,98 ± 45,90
40.000 R	12,67 ± 9,81	55,93 ± 40,20

(\*) - altura média das plantas testemunhas = 100,00

Tabela nº 13 - Análise da variância: efeitos da radiação gama sobre o desenvolvimento das plantas. Medição realizada aos 45 dias após a semeadura.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
entre blocos	3	66,3721	22,1240	23,66**
entre tratamentos	14	734,0573	52,4327	56,07**
erro	42	39,2789	0,9352	
total	59	839,7083		
entre espécies	2	53,8695	26,9234	28,79**
entre dosagens	4	627,1772	156,7943	167,66**
espécies x dosagens	8	54,0800	6,7600	7,23**

Tabela nº 14 - Análise da variância: efeitos da radiação gama sobre o desenvolvimento das plantas. Medição realizada aos 60 dias após a semeadura.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
entre blocos	3	223,1870	74,3957	5,38**
entre tratamentos	14	2.090,2550	149,3039	10,79**
erro	42	581,1407	13,8367	
total	59	2.894,5827		
entre espécies	2	187,9654	93,9827	6,79**
entre dosagens	4	1.618,1776	404,5444	29,24**
espécies x dosagens	8	284,1120	35,5140	2,57*

Tabela nº 15 - Influência das dosagens de radiação gama e da competição entre as plantas, dentro das caixas coletivas, sobre o desenvolvimento das mudas.

Dosagem (KR)	Altura média das plantas aos 45 dias (cm)	Altura média das plantas aos 60 dias (cm)	Diferença porcentual nas alturas das mudas entre as duas medições (%)
<u>E. tereticornis</u>			
0	14,79	33,26	55,53
10	9,70	25,00	61,20
20	4,67	15,88	70,59
30	7,05	27,16	74,04
40	3,98	11,84	66,64
<u>E. citriodora</u>			
0	12,21	21,95	44,37
10	12,82	24,58	47,84
20	6,93	15,55	55,43
30	10,64	21,42	69,32
40	5,23	13,15	60,23
<u>E. maculata</u>			
0	11,30	24,40	53,69
10	10,46	21,29	46,92
20	4,58	15,76	70,94
30	6,61	18,54	64,35
40	3,49	12,67	72,45

Tabela nº 16 - Sobrevivência média das plantas de E. tereticornis originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos, 60 dias após a sementeira.

Tratamento	sobrevivência média (%)	sobrevivência média em relação à testemunha* (%)
<u>testemunha</u>	85,46 ± 9,03	100,00 ± 10,57
<u>óxido de etileno</u>		
0,15% - 2 horas	79,75 ± 4,40	93,31 ± 5,15
0,15% - 4 horas	72,75 ± 16,46	85,13 ± 19,26
0,30% - 2 horas	71,00 ± 14,07	83,08 ± 16,46
0,30% - 4 horas	1,75 ± 2,02	2,05 ± 2,36
<u>etileneimina</u>		
0,04% - 3 horas	54,00 ± 4,76	63,19 ± 5,56
0,04% - 6 horas	64,00 ± 2,16	74,89 ± 2,53
0,08% - 3 horas	55,25 ± 19,05	64,65 ± 22,29
0,08% - 6 horas	57,25 ± 4,11	66,99 ± 4,81
<u>sulfato de dietilo</u>		
0,30% - 2 horas	79,25 ± 12,97	92,73 ± 15,18
0,30% - 4 horas	15,33 ± 6,24	17,94 ± 7,30
0,60% - 2 horas	25,00 ± 24,58	29,25 ± 28,76
0,60% - 4 horas	0,00 -	0,00 -
<u>metanosulfonato de etilo</u>		
0,25% - 12 horas	91,00 ± 5,80	106,48 ± 6,79
0,25% - 24 horas	92,25 ± 6,94	107,94 ± 8,12
0,50% - 12 horas	67,25 ± 8,77	78,69 ± 10,26
0,50% - 24 horas	15,00 ± 4,24	17,55 ± 4,96
<u>epicloridrina</u>		
0,15% - 2 horas	81,25 ± 8,38	95,07 ± 9,80
0,15% - 4 horas	23,00 ± 10,43	26,91 ± 12,20
0,30% - 2 horas	24,00 ± 4,83	28,08 ± 5,65
0,30% - 4 horas	0,00 -	0,00 -

(\*) - porcentagem de sobrevivência média das testemunhas = 100,00 %.

Tabela nº 17 - Sobrevivência média das plantas de E.citriodora originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos, 60 dias após a sementeira.

Tratamento	sobrevivência média (%)	sobrevivência média em relação à testemunha* (%)
<u>testemunha</u>	85,20 ± 9,03	100,00 ± 10,73
<u>óxido de etileno</u>		
0,15% - 2 horas	89,00 ± 2,31	104,46 ± 2,71
0,15% - 4 horas	72,00 ± 8,29	84,51 ± 9,73
0,30% - 2 horas	80,50 ± 9,33	94,48 ± 10,95
0,30% - 4 horas	70,50 ± 3,70	82,75 ± 4,34
<u>etileneimina</u>		
0,04% - 3 horas	87,00 ± 3,83	102,11 ± 4,49
0,04% - 6 horas	89,50 ± 1,73	105,05 ± 2,03
0,08% - 3 horas	76,25 ± 9,98	89,49 ± 11,71
0,08% - 6 horas	79,00 ± 5,34	92,72 ± 6,27
<u>sulfato de dietilo</u>		
0,30% - 2 horas	80,75 ± 5,38	94,78 ± 6,31
0,30% - 4 horas	56,50 ± 7,05	66,31 ± 8,27
0,60% - 2 horas	12,00 ± 5,19	14,08 ± 6,09
0,60% - 4 horas	0,00 -	0,00 -
<u>metanosulfonato de etilo</u>		
0,25% - 12 horas	73,00 ± 16,57	85,68 ± 19,45
0,25% - 24 horas	72,25 ± 6,29	84,80 ± 7,38
0,50% - 12 horas	70,75 ± 10,34	83,04 ± 12,14
0,50% - 24 horas	69,50 ± 6,03	81,57 ± 7,08
<u>epicloridrina</u>		
0,15% - 2 horas	78,25 ± 8,05	91,84 ± 9,45
0,15% - 4 horas	51,50 ± 18,36	60,45 ± 21,55
0,30% - 2 horas	66,33 ± 10,41	77,85 ± 12,22
0,30% - 4 horas	0,75 ± 1,73	0,88 ± 2,03

(\*) - porcentagem de sobrevivência média das testemunhas = 100,00 %.



Tabela nº 18 - Sobrevivência média das plantas de E.maculata originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos, 60 dias após a semeadura.

Tratamento	sobrevivência média (%)	sobrevivência média em relação à testemunha* (%)
<u>testemunha</u>	81,19 ± 6,16	100,00 ± 7,59
<u>óxido de etileno</u>		
0,15% - 2 horas	85,25 ± 3,86	105,00 ± 4,75
0,15% - 4 horas	80,00 ± 7,35	98,53 ± 9,05
0,30% - 2 horas	76,25 ± 21,54	93,91 ± 26,53
0,30% - 4 horas	69,50 ± 9,04	85,60 ± 11,13
<u>etileneimina</u>		
0,04% - 3 horas	76,50 ± 7,05	94,22 ± 8,68
0,04% - 6 horas	82,25 ± 4,57	101,31 ± 5,63
0,08% - 3 horas	78,50 ± 5,07	96,69 ± 6,25
0,08% - 6 horas	68,00 ± 2,94	83,75 ± 3,62
<u>sulfato de dietilo</u>		
0,30% - 2 horas	80,25 ± 5,31	98,84 ± 6,54
0,30% - 4 horas	53,33 ± 7,48	65,68 ± 9,21
0,60% - 2 horas	2,50 ± 3,32	3,08 ± 4,09
0,60% - 4 horas	0,00 -	0,00 -
<u>metanosulfonato de etilo</u>		
0,25% - 12 horas	79,75 ± 5,50	98,23 ± 6,77
0,25% - 24 horas	73,50 ± 1,73	90,53 ± 2,13
0,50% - 12 horas	62,50 ± 4,12	76,98 ± 5,07
0,50% - 24 horas	53,75 ± 15,99	66,20 ± 19,69
<u>epicloridrina</u>		
0,15% - 2 horas	80,25 ± 2,88	98,84 ± 3,55
0,15% - 4 horas	34,00 ± 10,83	41,87 ± 13,34
0,30% - 2 horas	27,00 ± 11,41	33,26 ± 14,05
0,30% - 4 horas	0,00 -	0,00 -

(\*) - porcentagem de sobrevivência média das testemunhas = 100,00%.

Tabela nº 19 - Altura média das plantas de E.tereticornis originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos, 45 e 60 dias após a semeadura.

Tratamento	Altura média aos 45 dias (cm)	Altura média aos 60 dias (cm)
<u>testemunha</u>	3,34 ± 1,32	8,29 ± 3,22
<u>óxido de etileno</u>		
0,15% - 2 horas	3,85 ± 1,24	8,21 ± 3,03
0,15% - 4 horas	5,94 ± 2,11	12,99 ± 4,58
0,30% - 2 horas	2,64 ± 0,98	5,98 ± 2,19
0,30% - 4 horas	1,63 ± 0,67	5,42 ± 2,66
<u>etileneimina</u>		
0,04% - 3 horas	4,46 ± 1,30	8,70 ± 3,39
0,04% - 6 horas	5,06 ± 1,72	11,25 ± 3,79
0,08% - 3 horas	2,71 ± 0,87	5,62 ± 2,40
0,08% - 6 horas	3,56 ± 1,55	8,85 ± 4,28
<u>sulfato de dietilo</u>		
0,30% - 2 horas	4,34 ± 1,35	10,32 ± 3,66
0,30% - 4 horas	1,60 ± 0,80	5,56 ± 3,14
0,60% - 2 horas	3,18 ± 1,01	4,36 ± 1,64
0,60% - 4 horas	0,00 -	0,00 -
<u>metanosulfonato de etilo</u>		
0,25% - 12 horas	6,60 ± 1,73	13,04 ± 3,52
0,25% - 24 horas	7,29 ± 1,87	13,21 ± 4,67
0,50% - 12 horas	3,23 ± 1,10	7,48 ± 2,73
0,50% - 24 horas	1,81 ± 1,04	4,49 ± 2,81
<u>epicloridrina</u>		
0,15% - 2 horas	3,44 ± 1,30	7,87 ± 2,62
0,15% - 4 horas	1,37 ± 0,72	3,53 ± 2,19
0,30% - 2 horas	1,37 ± 0,51	2,39 ± 1,33
0,30% - 4 horas	0,00 -	0,00 -

Tabela nº 20 - Altura média das plantas de E.citriodora originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos, 45 e 60 dias após a sementeira.

Tratamento	Altura média aos 45 dias (cm)	Altura média aos 60 dias (cm)
<u>testemunha</u>	4,24 ± 1,08	5,61 ± 1,56
<u>Óxido de etileno</u>		
0,15% - 2 horas	3,42 ± 0,92	4,21 ± 1,44
0,15% - 4 horas	5,59 ± 1,49	8,92 ± 2,68
0,30% - 2 horas	4,68 ± 0,98	6,24 ± 1,77
0,30% - 4 horas	5,35 ± 1,38	8,32 ± 2,19
<u>etileneimina</u>		
0,04% - 3 horas	4,86 ± 1,02	6,06 ± 2,09
0,04% - 6 horas	6,37 ± 1,37	8,88 ± 2,03
0,08% - 3 horas	3,70 ± 1,08	4,49 ± 1,43
0,08% - 6 horas	5,95 ± 1,52	9,87 ± 2,71
<u>sulfato de dietilo</u>		
0,30% - 2 horas	4,33 ± 1,11	5,90 ± 1,75
0,30% - 4 horas	3,49 ± 0,95	5,45 ± 1,53
0,60% - 2 horas	2,82 ± 1,17	4,55 ± 2,02
0,60% - 4 horas	0,00 -	0,00 -
<u>metanosulfonato de etilo</u>		
0,25% - 12 horas	4,95 ± 1,14	6,49 ± 1,56
0,25% - 24 horas	5,71 ± 1,33	8,95 ± 2,60
0,50% - 12 horas	5,07 ± 1,39	8,17 ± 2,23
0,50% - 24 horas	4,75 ± 1,41	8,18 ± 2,26
<u>epicloridrina</u>		
0,15% - 2 horas	2,93 ± 0,86	3,98 ± 1,11
0,15% - 4 horas	3,27 ± 1,10	4,77 ± 1,47
0,30% - 2 horas	3,06 ± 1,10	4,25 ± 1,33
0,30% - 4 horas	1,71 ± 0,91	3,67 ± 0,00

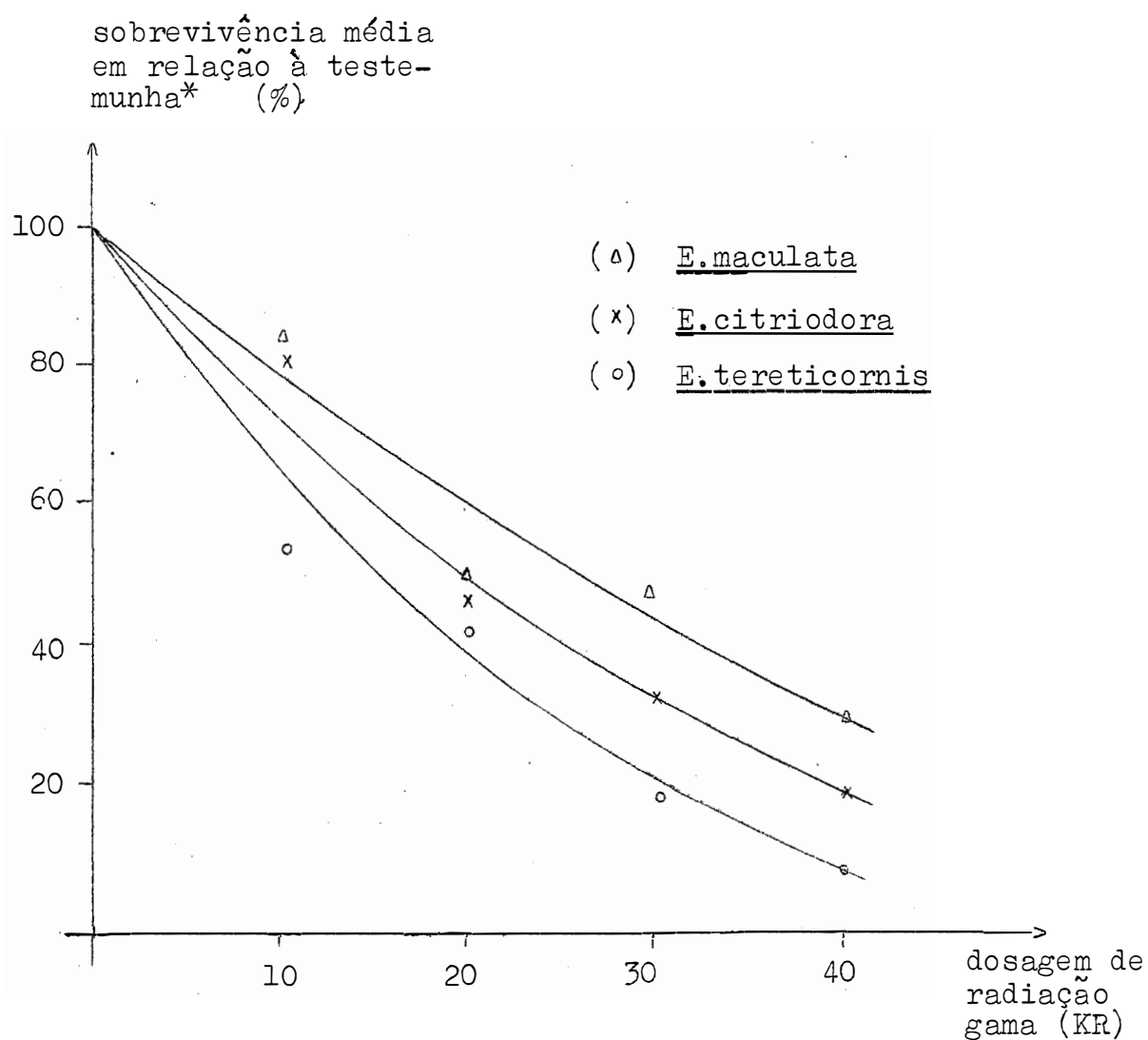
Tabela nº 21 - Altura média das plantas de E.maculata originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos, 45 e 60 dias após a semeadura.

Tratamento	Altura média aos 45 dias (cm)	Altura média aos 60 dias (cm)
<u>testemunha</u>	3,62 ± 1,17	5,32 ± 1,99
<u>óxido de etileno</u>		
0,15% - 2 horas	3,07 ± 1,12	4,15 ± 1,44
0,15% - 4 horas	5,02 ± 1,50	8,99 ± 3,51
0,30% - 2 horas	3,61 ± 1,24	5,58 ± 2,30
0,30% - 4 horas	2,78 ± 0,90	3,61 ± 1,33
<u>etileneimina</u>		
0,04% - 3 horas	3,37 ± 1,15	4,50 ± 1,80
0,04% - 6 horas	5,14 ± 1,58	9,65 ± 2,95
0,08% - 3 horas	4,69 ± 1,75	7,45 ± 3,19
0,08% - 6 horas	5,15 ± 2,06	10,72 ± 4,38
<u>sulfato de dietilo</u>		
0,30% - 2 horas	3,45 ± 1,20	5,79 ± 2,50
0,30% - 4 horas	2,36 ± 0,85	3,57 ± 1,15
0,60% - 2 horas	2,12 ± 0,65	3,00 ± 0,96
0,60% - 4 horas	0,00 -	0,00 -
<u>metanosulfonato de etilo</u>		
0,25% - 12 horas	4,24 ± 1,34	7,79 ± 3,05
0,25% - 24 horas	4,91 ± 1,65	8,94 ± 3,67
0,50% - 12 horas	4,46 ± 1,63	9,27 ± 3,35
0,50% - 24 horas	2,90 ± 1,17	5,49 ± 2,26
<u>epicloridrina</u>		
0,15% - 2 horas	3,13 ± 1,06	5,01 ± 1,86
0,15% - 4 horas	2,12 ± 0,95	4,06 ± 1,75
0,30% - 2 horas	1,96 ± 1,13	3,73 ± 2,17
0,30% - 4 horas	0,00 -	0,00 -

Tabela nº 22 - Teste de qui-quadrado para comparar as porcentagens de sobrevivência das plantas originadas de sementes tratadas com mutagênicos químicos e das testemunhas.

Tratamento	<u>E. tereticornis</u>	<u>E. citriodora</u>	<u>E. maculata</u>
<u>Óxido de etileno</u>			
0,15% - 2 horas	8,49**	3,79ns	3,80ns
0,15% - 4 horas	36,08**	38,09**	0,50ns
0,30% - 2 horas	46,02**	5,31*	5,12*
0,30% - 4 horas	1.014,62**	46,98**	26,40**
<u>etilencimina</u>			
0,04% - 3 horas	187,90**	0,96ns	4,64*
0,04% - 6 horas	94,39**	5,60*	0,45ns
0,08% - 3 horas	175,16**	17,72**	1,69ns
0,08% - 6 horas	154,36**	9,54**	29,38**
<u>sulfato de dietilo</u>			
0,30% - 2 horas	9,22**	5,10*	0,39ns
0,30% - 4 horas	63,59**	157,45**	110,10**
0,60% - 2 horas	492,90**	802,66**	886,41**
0,60% - 4 horas	-	-	-
<u>metanosulfonato de etilo</u>			
0,25% - 12 horas	8,94**	32,93**	0,64ns
0,25% - 24 horas	13,82**	37,02**	11,86**
0,50% - 12 horas	70,31**	44,75**	64,19**
0,50% - 24 horas	756,37**	52,98**	131,10**
<u>epicloridrina</u>			
0,15% - 2 horas	4,50*	10,83**	0,31ns
0,15% - 4 horas	615,43**	210,19**	356,68**
0,30% - 2 horas	598,90**	59,96**	450,59**
0,30% - 4 horas	-	1.025,63**	-

Figura nº 1 - Curvas aproximadas mostrando as relações entre as dosagens de radiação gama e a sobrevivência média das plantas, para as três espécies de Eucalyptus.



(\*) - porcentagem de sobrevivência das testemunhas = 100,00.

Figura nº 2 - Curvas traçadas segundo as equações de regressão relacionando as dosagens de radiação gama recebidas pelas sementes e a sobrevivência média esperada das plantas. São mostrados também os dados observados e as LD<sub>50</sub> esperadas.

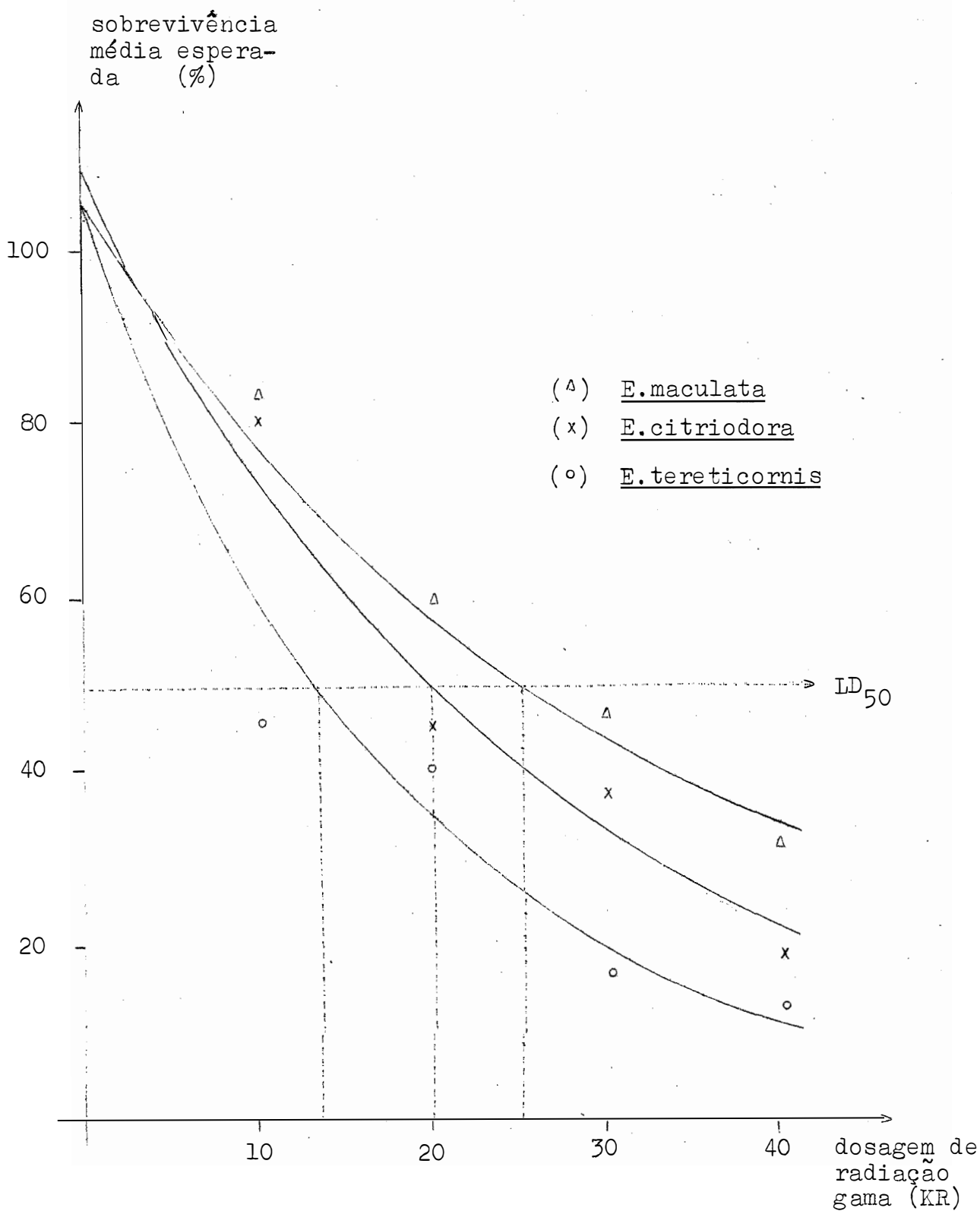


Figura nº 3 - Relação entre dosagens de radiação gama e altura média das plantas em relação às testemunhas (altura média das plantas testemunhas = 100,00). Medição feita aos 45 dias após a semeadura.

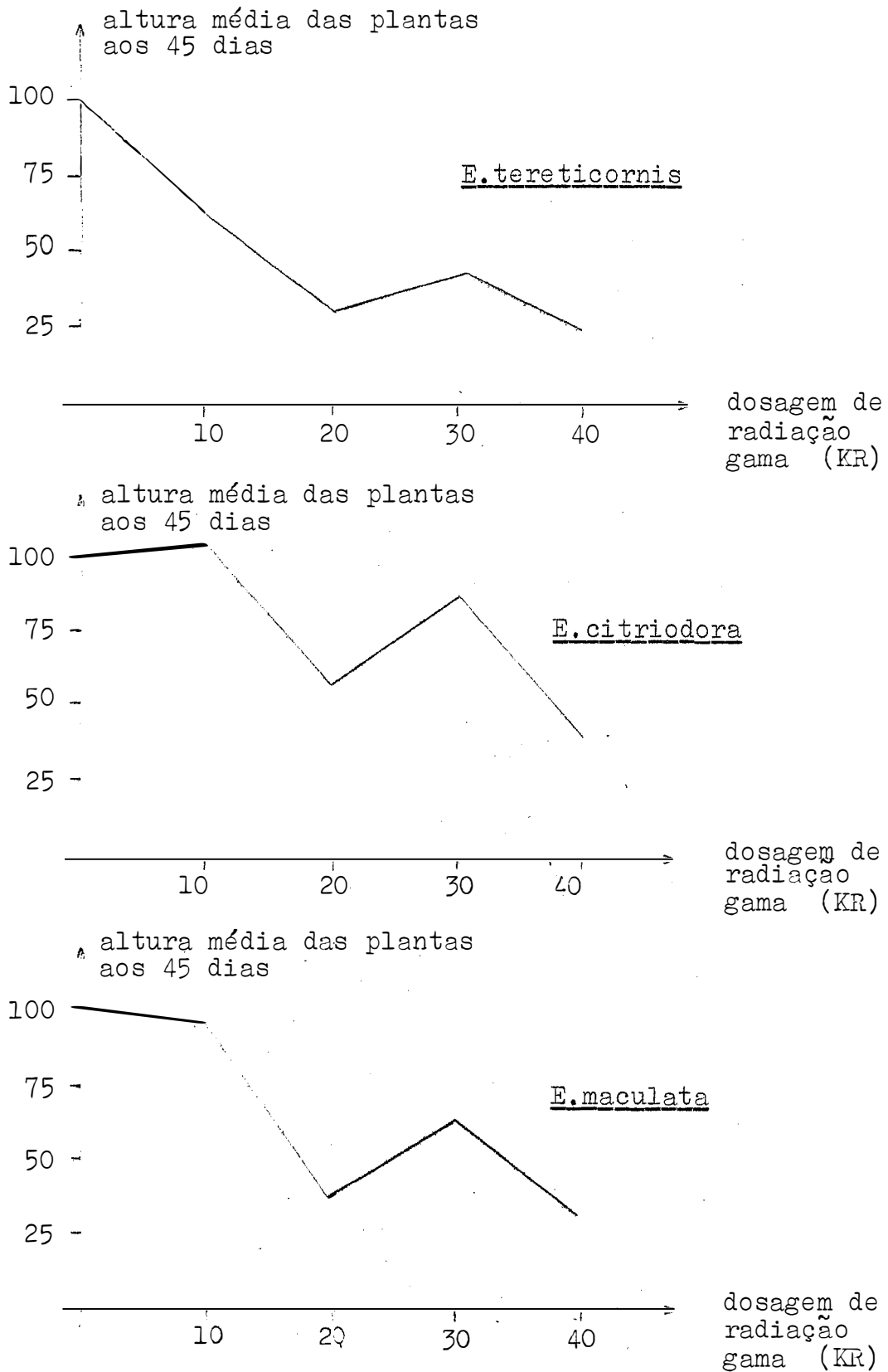




Figura nº 4 - Relação entre dosagens de radiação gama e altura média das plantas em relação às testemunhas (Altura média das plantas testemunhas = 100,00). Medição feita aos 60 dias após a sementeira.

